

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICAS  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICAS Y AMBIENTALES

PROYECTO DE TITULACIÓN

PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:

“MAGÍSTER EN GESTIÓN INTEGRAL DE LABORATORIOS”

TEMA:

DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA PARA LA SEPARACIÓN Y  
CUANTIFICACIÓN DE CARBOXILATOS A PARTIR DE MUESTRAS  
DE FERMENTACIONES ANAERÓBICAS Y EL ESTUDIO DE SU  
POTENCIAL COMO BIOGÁS.

AUTOR:

LUIS ANTONIO VACA SALAZAR

Guayaquil - Ecuador

2023

## RESUMEN

En la actualidad la generación de residuos a nivel local de la industria del agro va en aumento y tan solo un 8,5% del total producido en el Ecuador (de 13400 toneladas anuales de residuos), es recuperado con métodos de digestión y compostaje, existen otras técnicas que permiten aprovechar estos residuos de aquellos productos de mayor demanda como banano, café y cacao.

El presente trabajo se enfoca en desarrollar una metodología para la separación y cuantificación de carboxilatos obtenidos de un proceso de fermentación anaeróbico de residuos agroindustriales (cáscara de banano y pulpa, mucílago de cacao y cáscara de café) después de 21 días a un determinado pH y una temperatura constante de 38°C.

El proceso consiste en una separación en cascada por etapas: filtración mecánica, centrifugación y ultrafiltración; que han sido comparadas para verificar las mejores condiciones para recuperar la mayor de cantidad de VFA's de la fracción líquida de los fermentos; los cuales han sido cuantificados mediante cromatografía de gases con detector FID en una columna capilar, además se plantea una forma de verificar el potencial de biogás de las fracciones sólidas recuperadas de los fermentos y analizadas con un cromatógrafo de gases con detector TCD.

**Palabras clave:** filtración, membranas, VFA's, cromatografía de gases.

## ABSTRACT

Currently, the generation of local waste from the agricultural industry is increasing and only 8.5% of the total waste produced in Ecuador (13,400 tons per year) is recovered by digestion and composting methods; there are other techniques that allow the use of these wastes from products in high demand such as bananas, coffee, and cocoa.

The present work focuses on developing a methodology for the separation and quantification of carboxylates obtained from an anaerobic fermentation process of agro-industrial wastes (banana peel and pulp, cocoa mucilage, and coffee husk) after 21 days at a determined pH and a constant temperature of 38°C.

The process consists of a cascade separation by stages: mechanical filtration, centrifugation and ultrafiltration; which have been compared to verify the best conditions to recover the highest amount of AFV's from the liquid fraction of the ferments; which have been quantified by gas chromatography with FID detector in a capillary column, in addition a way to verify the biogas potential of the solid fractions recovered from the ferments and analyzed with a gas chromatograph with TCD detector is proposed.

**Key words:** filtration, membranes, VFA's, gas chromatography.

## **DEDICATORIA**

Este trabajo está dedicado a mi mamá, mi papá y mi hermano por ser mi motivación principal para seguir adelante en cada meta propuesta y apoyarme siempre en momentos de dificultad, por ser mi soporte y refugio en todo momento.

A mis abuelitos, en especial aquellos que ya no me acompañan en este mundo terrenal y son ahora mis protectores desde el cielo, para seguir adelante en los proyectos que me proponga en vida personal.

A todo el equipo de investigación del Laboratorio de Bioprocesos que, sin su ayuda, colaboración activa, paciencia y valiosos aportes, no fuera posible presentar este trabajo.

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco a Dios de todo corazón por ser mi guía y fortaleza en mi camino hacia el cumplimiento de mis metas profesionales y personales.

A mi padres y hermano por su total apoyo, motivación y comprensión, a lo largo de mis estudios.

A la Dra. María de Lourdes Mendoza por sus constantes y valiosas enseñanzas, su paciencia, guía y consejos, durante el desarrollo de este proyecto.

Al Ing. Pablo Villa por su valioso apoyo y aporte en los análisis desarrollados en el cromatógrafo de gases.

A mis apreciados estudiantes Brithany Loor y José Orellana por su ayuda y colaboración para el desarrollo de pruebas y tratamiento de datos a lo largo de la fase experimental del presente proyecto.

# **DECLARACIÓN EXPRESA**

La responsabilidad por los hechos y doctrinas expuestas en este Proyecto de Titulación me corresponde exclusivamente y ha sido desarrollado respetando derechos intelectuales de terceros conforme las citas que constan en el documento, cuyas fuentes se incorporan en las referencias o bibliografías. Consecuentemente este trabajo es de mi total autoría. El patrimonio intelectual del mismo corresponde exclusivamente a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance del Trabajo de Titulación referido.

---

Luis Antonio Vaca Salazar

# TRIBUNAL DE GRADUACIÓN

---

JOEL VIELMA PhD.

PRESIDENTE

---

MARÍA DE LOURDES MENDOZA PhD.

TUTOR

---

CÉSAR ARAQUE PhD.

DOCENTE EVALUADOR

## ABREVIATURAS O SIGLAS

VFA's: Volatil Fatty acids.

BMP: Biochemical methane potential.

ST: Sólidos totales.

SVT: Sólidos volátiles totales.

TOC: Carbono orgánico total.

pH: Potencial hidrógeno.

m/m: Relación masa-masa.

C/N: Relación Carbono – Nitrógeno.

$\rho$ : densidad.

V: volumen.

m: masa.

RPM: revoluciones por minuto.

TCD: Thermal conductivity detector.

FID: Flame ionization detector.

T: Temperatura.

UF: Ultrafiltración.

TOD: Theoretical Oxygen Demand.



# TABLA DE CONTENIDO

<b>CAPÍTULO 1</b>	<b>1</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1. Antecedentes	1
1.2. Descripción del problema	2
1.3. Objetivos:	4
1.4. Hipótesis	5
1.5. Alcance	5
<b>CAPÍTULO 2</b>	<b>6</b>
<b>2. MARCO TEÓRICO:</b>	<b>6</b>
2.1 Residuos agroindustriales:	6
2.2 Biorrefinerías y plantas de transformación de Biomasa:	7
2.3 Fermentación y digestión anaeróbica de residuos agroindustriales.	11
2.4 Métodos de separación de VFA's.	15
2.5 Métodos de cuantificación de VFA's.	19
<b>CAPÍTULO 3</b>	<b>21</b>
<b>3. Enfoque de la investigación:</b>	<b>21</b>
3.1 Tipo de investigación:	21
3.2 Diseño de investigación:	21
3.3 Metodología:	22
3.4 Materiales, equipos y reactivos:	28
3.5 Análisis estadístico:	29
<b>CAPÍTULO 4:</b>	<b>29</b>
<b>4. Resultados obtenidos:</b>	<b>30</b>
4.1 Caracterización preliminar de los fermentos:	30
4.2 Resultados por etapas:	31
4.2.1 Filtro prensa:	31
4.3 Análisis de resultados por etapas:	44
<b>CAPÍTULO 5</b>	<b>51</b>
<b>5 Conclusiones:</b>	<b>51</b>
5.1 Conclusiones	51
5.2 Recomendaciones:	52
5.3 Bibliografía:	53

## LISTADO DE FIGURAS

FIG. 1: ESQUEMA DE UNA POTENCIAL BIORREFINERÍA ENFOCADA A MAXIMIZAR LA PRODUCCIÓN DE VFA'S. [14]	8
FIG. 2: BIOPRODUCTOS OBTENIDOS DE LA CONVERSIÓN DE BIOMASA LIGNOCELULÓSICA MEDIANTE DIFERENTES MECANISMOS DE REACCIÓN DEL TIPO TERMOQUÍMICO Y BIOQUÍMICO. [12]	12
FIG. 3: DESCRIPCIÓN ESQUEMÁTICA DEL PROCESO ANAERÓBICO DE DIGESTIÓN PARA GENERAR ÁCIDOS VOLÁTILES GRASOS DE CADENA MEDIA Y CORTA. [26]	15
FIG. 4: DESCRIPCIÓN ESQUEMÁTICA DE LA PRODUCCIÓN DE VFA'S Y APLICACIONES DE LOS ÁCIDOS GENERADOS CON SU RESPECTIVO PRECIO A NIVEL MUNDIAL. [27]	16
FIGURA 5: COMPARACIÓN DE LOS TAMAÑOS DE PARTÍCULA CON LOS CAMBIOS DE PRESIÓN DE ACUERDO CON EL TIPO DE FILTRACIÓN. [27]	17
FIGURA 6: DESCRIPCIÓN ESQUEMÁTICA DE UN PROCESO DE SEPARACIÓN Y RECUPERACIÓN DE CARBOXILATOS. [29]	18
FIGURA 7: DIAGRAMA DE FLUJO DE LOS MÉTODOS DE SEPARACIÓN, RECUPERACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE VFA'S.	27

## LISTADO DE TABLAS

TABLA 1	28
MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS EMPLEADOS EN CADA UNA DE LAS ETAPAS.	28
TABLA 2	30
CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS DE LOS VFA'S.	30
TABLA 3	31
CONCENTRACIÓN INICIAL (PPM) DE VFA'S PRESENTES EN LOS FERMENTOS DE LOS AGRORESIDUOS ESTUDIADOS.	31
TABLA 4	31
VALORES DE PH INICIAL Y MASA DE SUSTRATO FRESCO DE LOS FERMENTOS.	31
TABLA 5	31
RESULTADOS DEL CONTENIDO DE SÓLIDOS EN LA FRACCIÓN MÁSICA OBTENIDA CON EL PRENSADO DE LOS FERMENTOS.	31
TABLA 6	32
RESULTADOS DE CARACTERIZACIÓN FRACCIÓN LÍQUIDA OBTENIDA EN EL PRENSADO DE LOS FERMENTOS.	32
TABLA 7	32
RESULTADOS DE LA CONCENTRACIÓN DE VFA'S (PPM) EN EL SOBRENADANTE A 10000 RPM.	32
RECUPERACIÓN (%) DE VFA'S EN EL SOBRENADANTE DE LA CENTRIFUGACIÓN RESPECTO A SU CONCENTRACIÓN INICIAL.	32
TABLA 9	33

CANTIDADES EMPLEADAS EN EL PROCESO DE ULTRAFILTRACIÓN DE LOS FILTRADOS DE LA ETAPA ANTERIOR.	33
TABLA 10	33
CONCENTRACIÓN EN PPM DE VFA'S OBTENIDAS EN EL FILTRADO DE LA ULTRAFILTRACIÓN.	33
TABLA 11	33
RECUPERACIÓN (%) DE VFA'S EN EL FILTRADO DE LA ULTRAFILTRACIÓN RESPECTO A SU CONCENTRACIÓN INICIAL.	33
TABLA 12	34
MASA DE VFA'S OBTENIDA EN CADA ETAPA RESPECTO A 1 KG DE BIOMASA FRESCA EMPLEADA EN LA FERMENTACIÓN.	34
TABLA 13: DATOS PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN DEL DE ÁCIDO ACÉTICO.	36
TABLA 14: ANÁLISIS ESTADÍSTICO ANOVA DE UN SOLO FACTOR DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN DEL ÁCIDO ACÉTICO.	36
TABLA 14: DATOS PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN DEL DE ÁCIDO PROPIÓNICO.	37
TABLA 15: ANÁLISIS ESTADÍSTICO ANOVA DE UN SOLO FACTOR DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN DEL ÁCIDO PROPIÓNICO.	37
TABLA 16: DATOS PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN DEL DE ÁCIDO ISOBUTÍRICO.	38
TABLA 16: ANÁLISIS ESTADÍSTICO ANOVA DE UN SOLO FACTOR DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN DEL ÁCIDO ISOBUTÍRICO.	38
TABLA 17: DATOS PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN DEL DE ÁCIDO BUTÍRICO.	39
TABLA 18: ANÁLISIS ESTADÍSTICO ANOVA DE UN SOLO FACTOR DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN DEL ÁCIDO BUTÍRICO.	39
TABLA 19: DATOS PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN DEL DE ÁCIDO ISOVALÉRICO.	40

TABLA 20: ANÁLISIS ESTADÍSTICO ANOVA DE UN SOLO FACTOR DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN DEL ÁCIDO ISOVALÉRICO.	40
TABLA 21: DATOS PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN DEL DE ÁCIDO VALÉRICO.	41
TABLA 22: ANÁLISIS ESTADÍSTICO ANOVA DE UN SOLO FACTOR DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN DEL ÁCIDO VALÉRICO.	42
TABLA 23: DATOS PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN DEL DE ÁCIDO CAPROICO.	42
TABLA 24: ANÁLISIS ESTADÍSTICO ANOVA DE UN SOLO FACTOR DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN DEL ÁCIDO CAPROICO.	43
TABLA 25: DATOS PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN DEL DE ÁCIDO CAPRÍLICO.	43
TABLA 26: ANÁLISIS ESTADÍSTICO ANOVA DE UN SOLO FACTOR DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN DEL ÁCIDO CAPRÍLICO.	44

## LISTADO DE GRÁFICAS

GRÁFICA 1	34
CONCENTRACIÓN DE VFA'S OBTENIDOS INICIALMENTE PARA CADA MUESTRA.	34
GRÁFICA 2:	35
CONCENTRACIÓN DE VFA'S OBTENIDOS DESPUÉS DE LA CENTRIFUGACIÓN A 10000 RPM.	35
GRÁFICA 3: CURVA DE CALIBRACIÓN ESTÁNDAR DE ÁCIDO ACÉTICO.	36
GRÁFICA 4: CURVA DE CALIBRACIÓN ESTÁNDAR DE ÁCIDO PROPIÓNICO.	37
GRÁFICA 5: CURVA DE CALIBRACIÓN ESTÁNDAR DE ÁCIDO ISOBUTÍRICO.	38
GRÁFICA 6: CURVA DE CALIBRACIÓN ESTÁNDAR DE ÁCIDO BUTÍRICO.	39
GRÁFICA 7: CURVA DE CALIBRACIÓN ESTÁNDAR DE ÁCIDO ISOVALÉRICO.	40
GRÁFICA 8: CURVA DE CALIBRACIÓN ESTÁNDAR DE ÁCIDO VALÉRICO.	41
GRÁFICA 9: CURVA DE CALIBRACIÓN ESTÁNDAR DE ÁCIDO CAPROICO.	42
GRÁFICA 10: CURVA DE CALIBRACIÓN ESTÁNDAR DE ÁCIDO CAPRÍLICO.	43

# CAPÍTULO 1

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Antecedentes

En la actualidad muchos de los productos generados en la industria agrícola tienen alta demanda de consumo (aproximadamente un 80%) a nivel mundial; pero se desperdicia una cantidad muy elevada de legumbres, frutas y cereales que pueden ser aprovechados en algún otro proceso posterior como un producto de valor agregado, permitiendo emplear dichos recursos como materia prima en una biorrefinería cuyo objetivo es el de sintetizar nuevas sustancias que pueden ser empleadas como componentes activos en varios sectores: aprovechamiento energético, combustible alternativo, farmacéutica, control de plagas, recuperación de sustancias orgánicas, entre otros. En el Ecuador, la industria agrícola produce alrededor de 2200 millones de kilogramos de residuos que contienen componentes lignocelulósicos con un potencial de transformación fisicoquímica y biológica capaz de generar nuevos productos de valor agregado para recuperar ácidos orgánicos, polímeros, colorantes naturales e incluso biogás [1].

Esta nueva tendencia hacia el aprovechamiento circular de los recursos del sector del agro ha tomado mayor interés en los últimos años, en regiones europeas ya existen nuevas tecnologías de transformación de residuos de maíz por ejemplo mediante fermentación anaeróbica para producir ácido láctico y otros de cadena media.

A nivel local, en el caso de Ecuador, muchas de las plantaciones de banano y café consideradas como las de mayor exportación nacional no petrolera, siendo un 18% para el banano y 5,2% para el café [2], [3], generan también una considerable cantidad de desperdicios: sus cáscaras, semillas, mucílago, entre otros; los cuales son fuentes de nutrientes que se obtienen como producto de valor agregado, con el respectivo tratamiento biológico de degradación controlada.

## 1.2. Descripción del problema

Los procesos de una planta de transformación de biomasa en la actualidad buscan el aprovechamiento de cualquier tipo de residuo, incluyendo los de la industria agrícola, avícola, porcina, entre otros, que pueden ser transformados en sustancias químicas de un gran valor agregado, tales como ácidos de cadena corta y media desde C2 hasta C12 o en combustibles ecológicos como el biogás, biodiésel o bioetanol; a pesar de implementar ciertas tecnologías para el aprovechamiento de residuos, sigue existiendo una gran brecha respecto al cumplimiento ambiental del tratamiento y disposición final de estos desechos y la actividad antropogénica e industrial respecto a la manufactura de alimentos.

En el país existe un alto porcentaje de residuos generados en la industria agrícola, de acuerdo con los datos extraídos del Libro Blanco de Economía circular en el Ecuador 2020: Con una producción anual de 23 millones de toneladas de los principales productos de exportación: banano, caña, palma, arroz, plátano y naranja; se genera una cantidad de 2,2 millones de residuos agroindustriales, de la cual se podría obtener una taza de 772,3 kW/persona de energía a partir de digestión anaeróbica de estos desechos incluidos los de estiércol porcino y vacuno; es decir que se genera un total anual de 604 ton/día de agro-residuos que corresponde tan solo a un 8,5% del total de residuos orgánicos que pueden ser recuperados mediante digestión anaeróbica o compostaje. [4]

Adicionalmente en el Libro de Cartografía de la basura en el Ecuador, menciona que alrededor de 13400 toneladas diarias de basura se genera a nivel nacional, con una producción promedio por habitante de 0,4 Kg/hb.día. de esta cantidad un 34% es colocado en rellenos sanitarios y celdas emergentes, 22% en botaderos a cielo abierto y en quebradas desoladas y tan solo un 3,7% es aprovechado en compostaje y reciclaje, el restante que corresponde a un 96,3% es llevado a plantas de co-procesamiento o simplemente se los deja bajo tierra; generando un impacto ambiental de producción de gases de invernadero de 2,64 kilotoneladas de gases de invernadero y 0,26 m<sup>3</sup> de lixiviados, que se pueden reducir con un tratamiento mucho más adecuado de la materia orgánica que llega como residuos sólidos.



Para el tratamiento de los desechos orgánicos obtenidos en la industria del agro, es posible emplearlos como sustrato junto con ciertas cepas de bacterias como: Clostridium, Scharomice cereviae, Streptocous, entre otras más; a un pH y temperatura controlados en un proceso de fermentación anaeróbica, para generar ácidos grasos volátiles de cadena corta; considerando la adición de elementos traza como ciertos metales pesados (zinc, hierro, cobre, entre otros) que permitan generar biogás con altas tasas de producción. [5]

Estos estudios realizados en países de primer mundo como Alemania, abren la puerta para diseñar metodologías que permitan aprovechar residuos a nivel local adaptando estos procesos de separación, en el caso particular del Ecuador los productos de alta demanda de exportación como el café, cacao y banano, también son materias primas de una biorrefinería considerando que no se aprovechan en su totalidad como las cáscaras o el mucílago, los cuales contienen un porcentaje entre 11,5 y 15% de sólidos totales en base seca respectivamente [6], [7], que se pueden transformar mediante fermentación anaeróbica con valores de pH ligeramente ácidos para favorecer los procesos de conversión de la materia orgánica (acidogénesis y la metanogénesis respectivamente), identificando la generación de estos productos principales mediante técnicas instrumentales actuales como la cromatografía de gases con diferentes detectores para cada especie. [8]

La literatura muestra varias aplicaciones de diferentes procesos que permiten la separación y cuantificación de ácidos volátiles grasos de cadena corta y media (tales como ácido láctico, acético, butírico, caprílico, entre otros), empleando procesos de separación física como la filtración, tratamiento térmico y con membranas; enfrentando ciertos problemas por la saturación rápida en micro y nano filtros, causando ciertas limitaciones a la hora de separar y cuantificar el rendimiento de cada uno de los componentes mencionados.

[9] Así Braune et al, propone una metodología de separación de un fermento de ensilado de maíz mediante un proceso en cascada de filtración mecánica, ultrafiltración y extracción líquido – líquido con alcohol oleílico, para su posterior cuantificación mediante cromatografía de gases con detector FID. También McDowall et al, [10] considera un proceso de separación para el mismo tipo de fermento con una separación sólido – líquido aplicando filtrado en prensa, luego haciendo una variación con tratamiento térmico comparando el efecto en el flujo de permeado en ultra y nanofiltración, para su posterior cuantificación con derivatización ácida previo a la cromatografía de gases.

Existen varios métodos para cuantificar carboxilatos, pero ninguno referente a la matriz de interés para este proyecto: fermento anaeróbico de los agro-residuos endémicos de la región; por tanto, es imprescindible desarrollar una secuencia metodológica que permita cuantificar y recuperar en un alto porcentaje estos nuevos productos de valor agregado; surgiendo aquí la pregunta: ¿Cuál es la metodología experimental más adecuada para separar el contenido de ácidos volátiles grasos (VFA's por sus siglas en inglés) generados en un proceso de fermentación anaeróbica, de tal forma que permitan su máximo aprovechamiento desde el ámbito ambiental con una relación específica de sustrato (residuo agroindustrial / inóculo bacteriano), obtenidos de una finca agrícola en la ciudad de Milagro, después de 21 días de tratamiento?

### **1.3. Objetivos:**

#### **Objetivo general:**

- Desarrollar una secuencia experimental de laboratorio para la separación y cuantificación de carboxilatos en muestras de dos fermentos agroindustriales mediante cromatografía de gases con detección FID y TCD.

#### **Objetivos específicos:**

- Determinar las condiciones óptimas de separación física de los residuos agroindustriales obtenidos mediante pruebas experimentales.

- Evaluar el potencial de generación de biogás de cada uno de los dos residuos agroindustriales mediante la técnica de cromatografía GC con detector TCD.
- Calcular el porcentaje de recuperación de VFA's en cada residuo para la verificación de la metodología experimental propuesta.

#### **1.4. Hipótesis**

Se puede determinar la concentración de los VFAs' generados de residuos agroindustriales mediante la metodología experimental de un proceso en cascada aplicando y usando técnicas instrumentales adecuadas en condiciones de fermentación y separación óptimas.

#### **1.5. Alcance**

El alcance del proyecto establecerá una metodología aplicable a residuos de: cáscara y pulpa del banano y cáscara de café, extraídos de una finca situada en el área rural de la ciudad de Milagro, después de 21 días de fermentación anaeróbica controlada en el laboratorio a  $38 \pm 1$  °C, presión atmosférica de 1 atm y un pH de  $6,5 \pm 0,1$ .

# CAPÍTULO 2

## 2. MARCO TEÓRICO:

### 2.1 Residuos agroindustriales:

A nivel mundial la producción de la industria agrícola ha aumentado considerablemente con la demanda mundial actual que se ha incrementado a lo largo de los años con la explosión demográfica circundante, debido a problemas migratorios y situaciones naturales tales como inundaciones, terremotos, y similares; provocando mayor necesidad de estos productos en ciertas regiones y en otras se desperdician generando altas tasas de desechos por falta de un aprovechamiento posterior.

Los residuos de la industria del agro se pueden clasificar en dos grandes grupos: los residuos de campo que se obtienen después de la cosecha tales como: hojas, tallos, semillas y vainas, y los industriales son aquellos que persisten hasta que ya termina el procesamiento del producto final, tales como: bagazo, mucílago, cáscara, pulpa, raíces rechazadas, etc.; los cuales se utilizan para alimentación de ganado, aditivos naturales para el suelo, fertilizantes y demás, quedando infravalorados. A estos desperdicios solo se les da un tratamiento básico antes de darles una disposición final, pero no se les da otro aprovechamiento hasta agotar toda su capacidad de generación de recursos. En muchas regiones solo los consideran como fuente de combustible sólido similar al carbón, como en el caso de la India y... [11] Añadir otro ejemplo adicional.

Citando algunos de estos alimentos que se exportan en mayor cantidad a nivel local, se tienen por ejemplo el banano, café, cacao y maíz; de los cuales se obtienen sus principales frutos como fuentes de alimento tras un tratamiento industrializado; pero también se producen desechos con un potencial de aprovechamiento que en otros países como Europa y parte de Latinoamérica están siendo empleados como fuentes de componentes de valor agregado: biogás, biodiésel, ácidos volátiles grasos, entre otros. [12]

Esta nueva tendencia del aprovechamiento de lo que se considera desecho, es parte de los objetivos de desarrollo sostenible, específicamente el número 12: que busca la administración responsable y eficiente de los recursos, tomando en cuenta la reducción considerable de desechos y también toma protagonismo la aplicación de los principios de economía circular para la industria: dándole un nuevo valor a los residuos generados al final de cada etapa de procesamiento, estas son las metas a mediano y largo plazo de las biorrefinerías, que buscan reutilizar materiales de corrientes secundarias o no deseadas, mediante diferentes investigaciones previas y ensayos experimentales a escala de laboratorio, que permitirán luego a escala piloto, transformar esas materias en nuevos productos. [11], [13]

## **2.2 Biorrefinerías y plantas de transformación de Biomasa:**

La industria actual busca la satisfacción de necesidades básicas y mientras esta se desarrolla y técnica a lo largo de los años, también aparecen otros problemas asociados a esta innovación en la producción masiva de recursos transformados: alta demanda de energía, lo que obliga a buscar nuevas fuentes (especialmente renovables), aumento de la empleabilidad, cumplimiento de normativa ambiental y generación de subproductos que no pueden aprovecharse posteriormente y se consideran desechos.

El objetivo de una industria / refinería típica es la de explotar recursos naturales para luego de un proceso de extracción, refinación y purificación generar aquellos necesarios para el desarrollo de la sociedad. El problema con estas refinerías radica en los desechos generados, los cuales requieren de tratamientos costosos para su disposición final y en ciertos casos, muchos de ellos no pueden ser reutilizados, puesto que no todo lo que se desecha puede recibir el mismo tratamiento para un adecuado manejo ambiental, debido a la naturaleza de estos componentes, citando algunos de ellos: raíces, hojas, cáscaras, mucílago, cascarillas, raquis, entre otros. [13]

Una planta de transformación de biomasa permite el tratamiento de una biomasa, facilitando su degradación hasta un punto tal que permita la generación de plataformas químicas, que permitan la síntesis de nuevos compuestos y materiales, dándole una disposición final adecuada, sin dejar de lado la búsqueda de beneficio propio y para la sociedad: el aumento en la eficiencia energética al producir nuevas fuentes de energía que pueden ser recirculadas o aprovechadas en el mismo proceso o en otros secundarios donde sea requerido.

La economía circular se puede verificar de forma mucho más concreta con este tipo de sistemas que no solo buscan degradar materiales sino también generar otros componentes necesarios para su propio desarrollo, tales como: enzimas, sustitutos de abono, proteínas, vitaminas, AVG's, biogás, etc.; tomando moléculas de alto peso molecular como celulosa, hemicelulosa y lignina (lo que se considera como un desecho de ciertos alimentos) que tienen el potencial para ser transformados en moléculas de cadena corta, biogás o como una biomasa degradada; antes de destinarlos a una etapa final. [14]

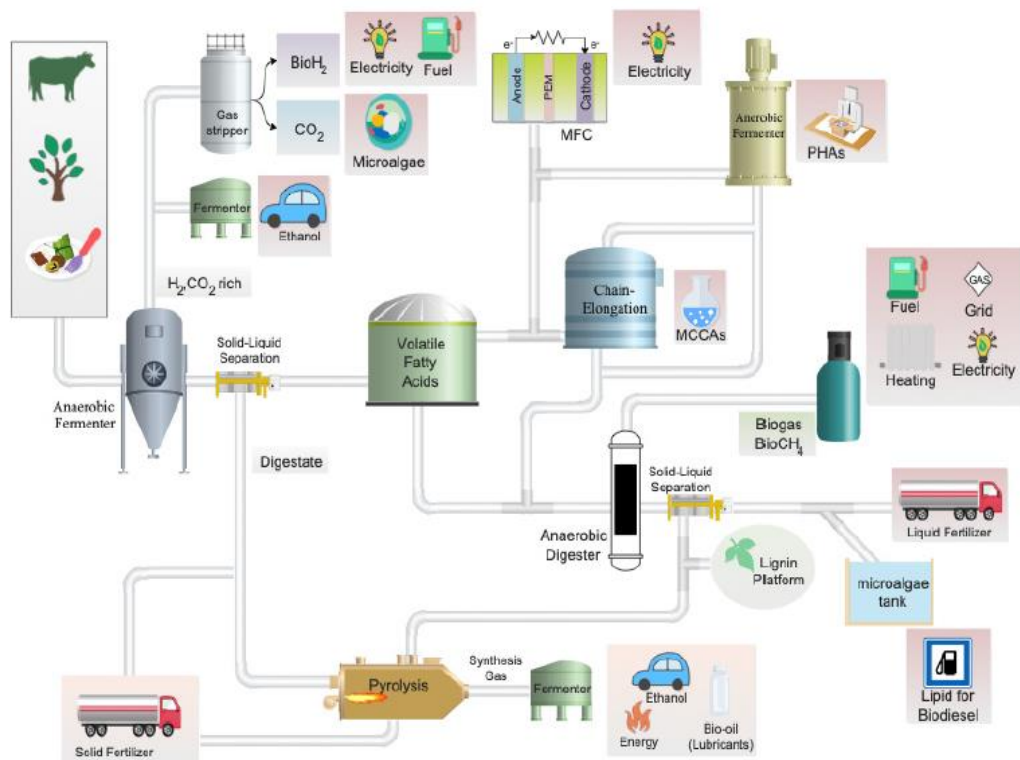


Fig. 1: Esquema de una potencial biorrefinería enfocada a maximizar la producción de VFA's. [15]

Existen diferentes procesos que pueden ser aplicados para la recuperación de estos desechos, clasificados entre procesamiento termoquímico y bioquímico, de los cuales se citan los siguientes:

Mecánico: Como tratamiento previo se emplea la reducción de tamaño del sustrato para aumentar el área de contacto y mejorar la eficiencia.

- a) Peletización: consiste en reducir el tamaño del sustrato en concentrados de similar tamaño para optimizar espacio. Se homogenizan en un determinado equipo que permite su fácil transporte y almacenamiento.
- b) Molienda: consiste en reducir en pequeños trozos el sustrato fresco, empleando equipos como cortadores de disco y filtro, martillos y rodillos. [16]

Termoquímicos: Métodos que involucran la conversión de biomasa en energía, empleando reacciones de oxidación a alta temperatura con presencia o ausencia del oxígeno.

- a) Combustión: transforma la energía química contenida en la biomasa en energía eléctrica, mecánica y térmica, mediante una combustión directa en presencia de aire; además las cenizas se pueden convertir en geo materiales, con un rango de eficiencia de entre 20 y 40%.
- b) Gasificación: involucra la conversión de biomasa en una mezcla de gases que tienen metano, nitrógeno, gas carbónico, los cuales son generados en un rango de temperatura de 700 a 1000°C, dando como resultado la producción de syngas.
- c) Pirólisis: este proceso se lleva a cabo en ausencia de oxígeno, a temperaturas entre 300 y 800°C, dependiente del tiempo de reacción es posible producir biocarbón, biocombustible líquido o syngas, demostrando así el gran alcance de transformación y su aplicabilidad. [17]

Bioquímicos: Métodos que involucran la conversión de moléculas de altos pesos moleculares contenidos en la biomasa empleando microorganismos en condiciones controladas de ciertas variables como pH, temperatura, cepa bacteriana, entre otros.

- a) Transesterificación: en este caso se trabajan con aceites y grasas usadas previamente tratadas con un grupo alcohol, en presencia de un catalizador de hidróxido de sodio o potasio para la producción de biodiésel y glicerina como subproducto.
- b) Fermentación anaeróbica: proceso empleado para la producción de biocombustibles a partir de una biomasa en ausencia de oxígeno, el cual puede ser sustituido por nitrógeno u otro producto secundario, por ejemplo: azúcares, almidón o celulosa, empleando microorganismos, y transformarlos en producto recuperables como el bioetanol, gas carbónico y ácido láctico.
- c) Digestión anaeróbica: a diferencia del caso anterior, este proceso se realiza en ausencia de oxígeno tomado biomasa de alimentos, desechos de animales y mediante un proceso controlado se busca degradar esta materia orgánica con ayuda de microorganismos, con ajustes de pH y temperatura en un rango de 30 a 60°C; generando ácidos volátiles grasos y biogás. [18]
- d) Oxidación beta-reversa: este proceso anaerobio, que consiste en una secuencia cíclica de cuatro reacciones dando como resultado la elongación de una molécula de acetil-CoA, por dos carbonos en cada etapa, esto permite terminar la reacción enzimática o dirigir otra vía para producir una variedad de nuevos productos como: alcoholes, ácidos, ésteres volátiles, etc. [19]

Algunos ejemplos de la aplicación de estos procesos se mencionan a continuación:

Sträuber et al considera en su estudio el efecto del control de pH y la adición de ciertos metales traza como hierro y manganeso en la producción de ácidos orgánicos de cadena media empleando como inóculo las bacterias de tipo clostridium, identificadas como *Enterobacter cloacae* (con gran capacidad fermentativa para generar hidrógeno) y *Methanosarcina* (con gran potencial para generar biogás), junto con desechos orgánicos de maíz ensilado, obteniéndose como resultado altos rendimientos en la producción de la elongación del ácido láctico a ácido n-butírico. [20]



McDowall et al, considera una continuación de este estudio anteriormente citado con el mismo residuo de ensilado de maíz y el mismo inóculo bacteriano en una fermentación Batch para generar otro producto de valor agregado como el biogás; donde también se forman VFA's los cuales fueron analizados mediante técnicas de separación que incluyen un tratamiento térmico previo a procesos de nano y ultrafiltración en cascada y aplicando cromatografía GC, junto con un análisis estadístico multivariante, para la identificación del comportamiento molecular de la comunidad bacteriana y su cinética de crecimiento en las diferentes etapas de metanogénesis y acidogénesis. [9]

Foncillas et al, considera entre los métodos de recuperación de carboxilatos, una nueva opción para la cuantificación efectiva, estableciendo una secuencia experimental donde se trabaja con ácidos volátiles orgánicos de cadena corta (de C4 a C8), empleando una resina de intercambio aniónico seguido de una desorción con gas carbónico y metanol expandido, observándose una mayor desorción con los ácidos de cadena media (hexanoato y heptanoato), respecto al acetato; siendo este un método de recuperación para concentrar estos ácidos entre 14.6 a 20.7 veces respectivamente. [21]

### **2.3 Fermentación y digestión anaeróbica de residuos agroindustriales.**

Los procesos bioquímicos que tienen como objetivo la degradación de la materia orgánica, se llevan a cabo de manera controlada respecto a la presencia de oxígeno, ajuste de pH y temperatura: entre ellos tenemos a la digestión y la fermentación anaeróbica se llevan a cabo en múltiples etapas donde la materia orgánica es descompuesta y estabilizada en determinados productos de valor agregado: su semejanza consiste en la ruptura y conversión de moléculas de gran tamaño en biocombustibles o sustancias orgánicas como ácidos o alcohol. Ambos procesos difieren en el mecanismos de transformación de dichas biomoléculas: en el caso de la fermentación se lleva a cabo por una descomposición microbiana de azúcares de dos etapas (glicólisis y fermentación de etanol o también la del tipo láctica) para producir gas carbónico, ácido láctico y etanol; y en el caso de la digestión las macromoléculas del sustrato que incluyen proteínas, carbohidratos y lípidos son transformados mediante un mecanismo de 4 etapas (hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis) en biogás, hidrógeno y ácidos volátiles grasos. [22]

Esta metodología de tratamiento tiene una amplia aplicabilidad en la sociedad desde tiempos antiguos, iniciando como un proceso de fermentación de desechos animales en los biodigestores con el objetivo de producir biogás y obtener una fuente renovable de energía. [23]

En los últimos años, los avances tecnológicos han permitido escalar diferentes procesos de aprovechamiento de residuos de la industria del agro, que contienen una biomasa con una capacidad de transformación (materia orgánica biodegradable), generando productos de valor agregado de manera directa o en forma de corriente secundaria. Los estudios que se han realizado parten de investigaciones en laboratorio para establecer las condiciones de proceso más adecuada para su escalamiento. [24]

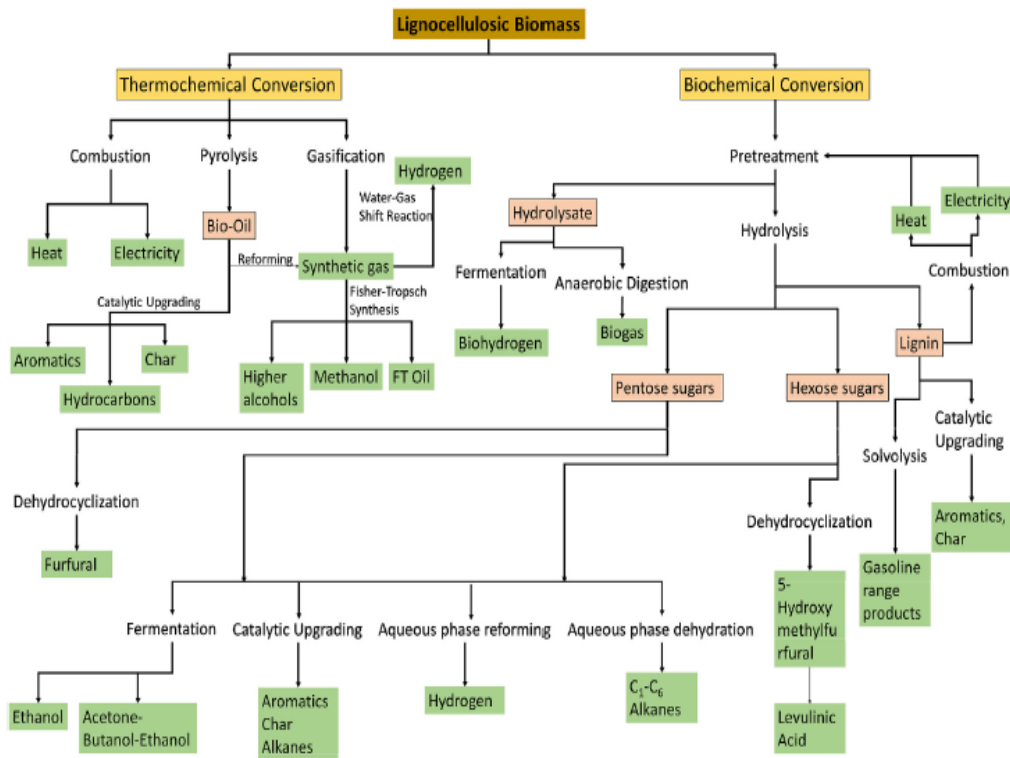


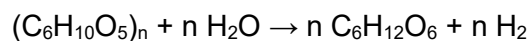
Fig. 2: Bioproductos obtenidos de la conversión de biomasa lignocelulósica mediante diferentes mecanismos de reacción del tipo termoquímico y bioquímico. [13]

Previamente al proceso de fermentación es imprescindible la caracterización de la materia prima a utilizar para considerar las posibles rutas de transformación en función de la cantidad de materia orgánica, nutrientes disponibles e inclusive el tipo de inóculo bacteriano que puede ser utilizado. Entre los parámetros fisicoquímicos a considerar para una fermentación óptima, se mencionan a continuación:

- pH: acidez del sustrato que debe ser ajustada previamente.
- Demanda química de oxígeno (COD por sus siglas en inglés): contenido de materia orgánica degradable disponible.
- Relación carbono-nitrógeno (C/N): establece una relación entre la cantidad de carbono y nitrógeno necesarios para una adecuada generación de metano.
- Contenido de SVT: indica la materia orgánica volátil que contiene el sustrato.
- Potencial Redox: establece la capacidad del inóculo bacteriano para oxidar la materia orgánica disponible en el sustrato.

El proceso de fermentación tiene varias etapas de manera general, que dependen de las condiciones de degradación del sustrato:

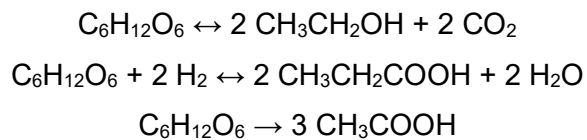
- a) Hidrólisis: es el paso inicial de la fermentación anaeróbica, donde existe una modificación en el pH (partiendo de un valor de entre 6,5 a 5,5) para favorecer la escisión de enlaces H-O; las bacterias hidrolíticas degradan la materia orgánica polimérica como lípidos, polisacáridos y grasas en monómeros (azúcares, aminoácidos) de menor peso molecular empleando enzimas; esto se convierte en un sustrato adecuado para el crecimiento bacteriano. [25]



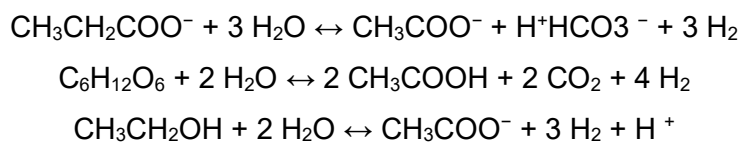
En la reacción mostrada, la celulosa en presencia de agua se hidroliza para generar moléculas de glucosa como producto primario y además de hidrógeno, esta reacción puede ser catalizada por ácidos homogéneos o heterogéneos, que permiten incrementar el rendimiento en la producción de monosacáridos fermentables, gracias a la presencia de iones  $H^+$  y  $OH^-$  de los catalizadores, responsables del rompimiento de enlaces glicosídicos.

- b) Acidogénesis: los monómeros de la etapa anterior son transformados gracias a las bacterias facultativas acidogénicas o fermentativas, dando como resultado la producción de ácidos volátiles de cadena media y corta: ácidos propanoico, butírico, alcoholes, gas carbónico y adicional con el hidrógeno gas que actúa como intermediario, siendo el ácido acético el más importante de todos puesto que es el principal sustrato de las bacterias generadoras de metano. [26]

La producción de estos ácidos se ve favorecida a un pH ligeramente superior a 5, pero la generación de alcohol se da a un pH cercano a 4, como se muestra en las reacciones a continuación:



- c) Acetogénesis: el sustrato de las bacterias acetogénicas convierten los VFA's y alcoholes, en acetatos, formiatos, hidrógeno y ácido carbónico, en esta etapa se asocia la producción como subproducto del gas hidrógeno, como una deshidrogenación, en las reacciones propuestas se observa que los ácidos producidos de la etapa anterior son degradados a acetato e hidrógeno que pueden ser empleados por las bacterias metanogénicas en la siguiente etapa, siendo fuente de electrones el agua disponible en el sistema. [25]



- d) Metanogénesis: finalmente los productos de la etapa anterior son transformados por las bacterias metanogénicas en biogás: con una mezcla de metano y gas carbónico en una proporción aproximada de 65 al 70% de CH<sub>4</sub>, donde la carga orgánica del sustrato es reducida considerablemente. En las reacciones mostradas se observa que el ácido acético es transformado en metano y gas carbónico, y finalmente el hidrógeno se emplea en la descarboxilación del etanol, mostrando así diferentes vías de reacción para obtener un mismo producto. [27]

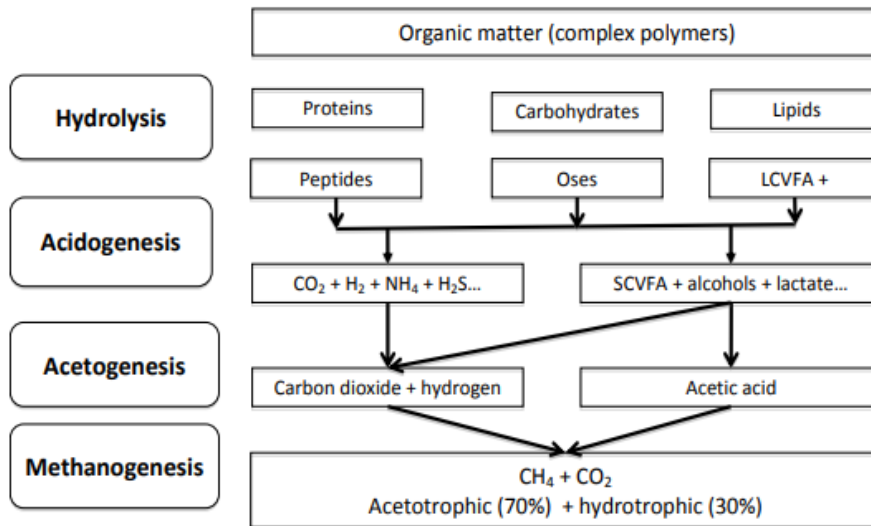
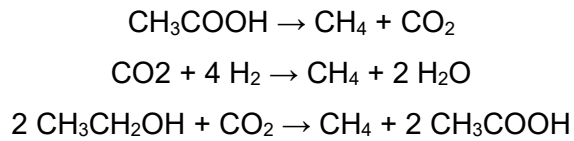
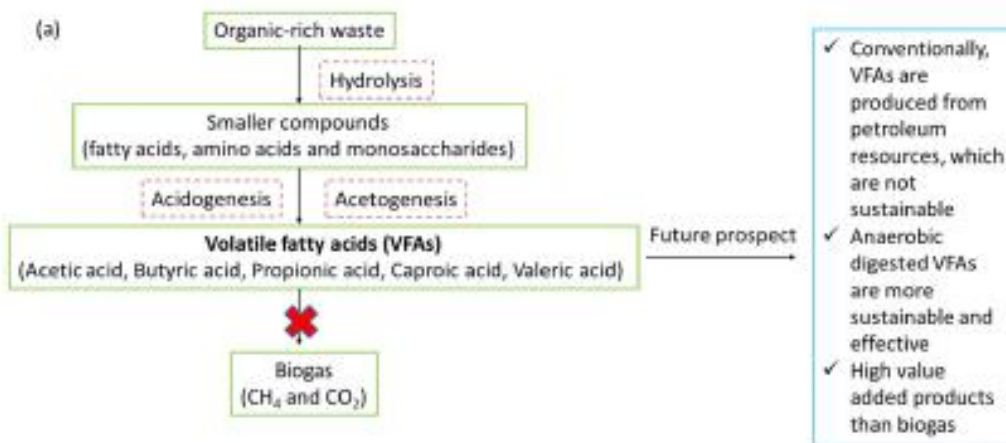


Fig. 3: Descripción esquemática del proceso anaeróbico de digestión para generar ácidos volátiles grasos de cadena media y corta. [27]

Una vez obtenidos los productos de la fermentación, es importante su recuperación y cuantificación, existen diversos métodos dependiendo de la factibilidad de aplicación y la concentración de VFA's obtenidos.

## 2.4 Métodos de separación de VFA's.

En la actualidad existen algunos estudios que han permitido desarrollar ciertas metodologías para la recuperación de los productos de valor agregado de la fermentación, enfocándose en la producción de ácidos carboxílicos de cadena corta, a continuación, se mencionan algunos procedimientos experimentales, los cuales pueden considerarse en diferentes etapas del proceso de fermentación, como se muestra en el diagrama adjunto:



(b)

**Volatile fatty acids (VFAs)**

	Acetic acid (Mw: 60 g/mol)	Butyric acid (Mw: 88 g/mol)	Propionic acid (Mw: 74 g/mol)	Valeric acid (Mw: 102 g/mol)	Caproic acid (Mw: 116 g/mol)
Market size (kton/year)	14,000 – 17,000	90 - 105	350 - 470	10-12	25-26
Market price (€/ton)	400 – 800	1,500 – 1,650	2,000 – 2,500	2,200-2,300	1,900-2,100
Application	Textile	Food additive	Food preservation	Food additive	Paint additives
	Food additive	Textile	Herbicide synthesis	Lubricants	Plant growthier
	Cosmetic industry	Pharmaceutical	Perfume intermediate	Plasticizer	Pharmaceutical
	Vinyl acetate monomer	Flavouring agent	Pharmaceutical	Flavouring agent	Flavouring agent

Fig. 4: Descripción esquemática de la producción de VFA's y aplicaciones de los ácidos generados con su respectivo precio a nivel mundial. [28]

- a) Filtración: Empleando un filtro prensa en forma de canasta similar al empleado en el procesamiento de frutas para obtener vino, con una tela de lienzo que permita separar la fracción líquida del sólido fermentado, de esta forma el tamaño de partícula obtenido se encuentra alrededor de 250  $\mu\text{m}$  y luego almacenando a 4°C la fase líquida que contiene los VFA's. La presión empleada para este proceso es de 3 bar aproximadamente. [29]
- b) Centrifugación: Del filtrado de la etapa anterior se emplea una centrifuga a 10000 RPM para separar a un tamaño de partícula de 0,65  $\mu\text{m}$  en el sobrenadante, empleando tubos de centrifuga de 50 mL. [21]

- c) Uso de membranas Ultrafiltración y Nanofiltración: Del sobrenadante de la etapa anterior se emplea un sistema con membrana de ultrafiltración para separar partículas entre 0,1 y 0,01  $\mu\text{m}$  de tamaño y la de nanofiltración para obtener rango 10 veces menor al anterior, esto depende de la presión ejercida y el tamaño de poro de la membrana, para obtener como corrientes principales y el retenido y el filtrado. [9]

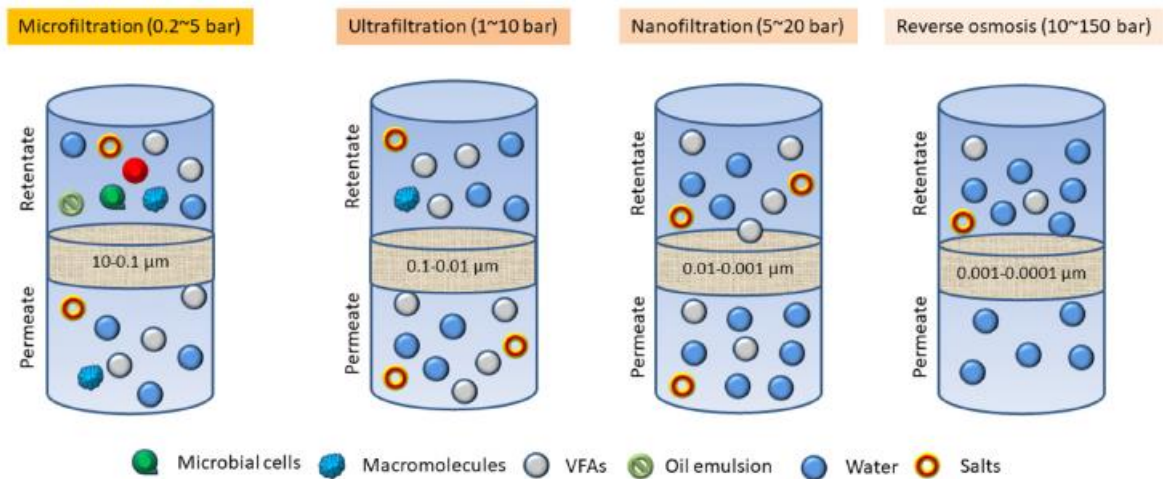


Figura 5: Comparación de los tamaños de partícula con los cambios de presión de acuerdo con el tipo de filtración. [28]

- d) Extracción con solvente: esta técnica con un solvente adecuado permite la separación de los VFA's en solución acuosa, empleando un alcohol de alto peso molecular, soluble con los ácidos e insoluble en agua, con alto punto de ebullición para su posterior recuperación, empleando un sistema de etapas múltiples, los cuales presentan altas tasas de recuperación. [29]
- e) Adsorción: Es posible la separación por intercambio iónico mediante adsorción de los VFA's en una columna aniónica con un flujo controlado a una temperatura constante de proceso, es posible hacer diferentes variaciones para estudiar la isoterma de adsorción de la resina en el punto de equilibrio del ensayo alcanzando un valor de 50 mg de VFA's adsorbidos por g de adsorbente. También es posible emplear otros agentes de adsorción como carbón activado o algún otro que se a fin a la naturaleza de los ácidos volátiles. [30]

- f) Destilación: Se emplea esta técnica de purificación considerando un aporte de energía para la separación de mezclas con puntos de ebullición de diferencia considerable entre el soluto y el solvente. Teniendo en cuenta este principio es posible la separación de VFA's a bajas concentraciones, puesto que, si aumenta, se vuelve más complicada la separación al llegar al punto azeotrópico de la mezcla. [29]

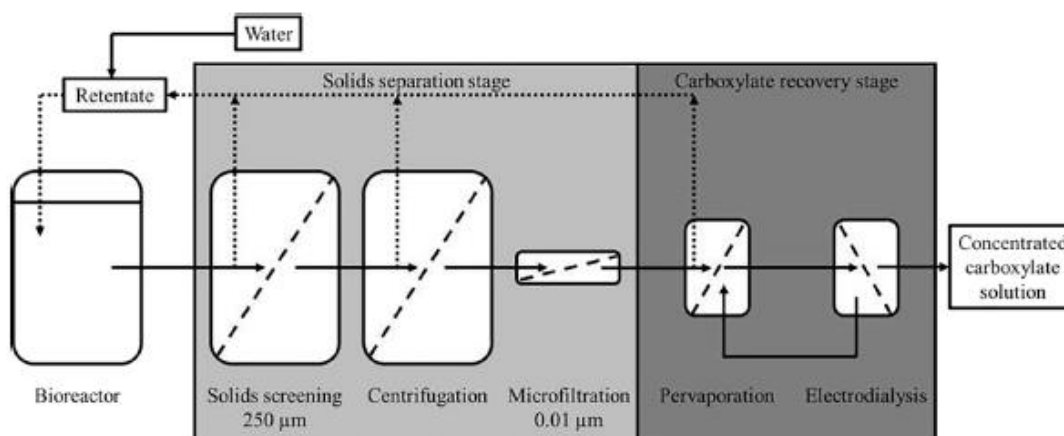


Figura 6: Descripción esquemática de un proceso de separación y recuperación de carboxilatos. [30]

- g) Pervaporación: El término de este método de separación corresponde a la combinación entre una evaporación y permeación, mediante un diferencial de potencial químico a través de la membrana con la ayuda de un gas inerte a una determina presión para lograr que los analitos se adsorban en la membrana y luego cambien a fase vapor una vez que desorben de la superficie. Las membranas de pervaporación se pueden clasificar en dos grandes grupos de acuerdo con su afinidad con las moléculas objetivo: son hidrofílicas para un rápido transporte del agua y organofílicas adecuadas para moléculas orgánicas con las VFA's. [31]
- h) Electrodiálisis: Es un proceso de separación con membranas, altamente utilizado en escala industrial y de laboratorio, consiste en el transporte de solutos iónicos de una solución a través de una membrana de intercambio aniónico – catiónico separadas por un espaciador que está conectado a una fuente de poder con un voltaje aproximado de 18 V con dos electrodos para permitir dicha separación, una de las condiciones para lograr una óptima separación es el pH que debe ser mayor al pKa de dichos VFA's. [31]



## 2.5 Métodos de cuantificación de VFA's.

Entre los métodos de cuantificación de VFA's indistintamente del proceso de fermentación desarrollado para su obtención; se destacan tres análisis detallados a continuación:

a) Cromatografía de gases (GC): Las columnas que usualmente se emplean en este análisis específico para VFA's son del tipo capilar con las siguientes características:

- Contienen dimetilpolisiloxano (PMDS) en la fase estacionaria.
- Son no polares.
- Permite la separación de una gran gama de componentes en función de sus puntos de ebullición en un amplio rango de temperaturas (200 a 300°C).
- Sus dimensiones oscilan entre 15 - 60 m de largo; 0,1 – 0,3 mm de diámetro interno y espesor de película de 0,25  $\mu\text{m}$ .

En este análisis se emplea como gas Carrier helio o nitrógeno, a una temperatura inicial de 30 - 40°C hasta 150 - 200°C con incrementos de 10°C por minuto, el flujo de inyección de muestra es controlado de forma automatizada, se puede emplear un detector FID (con un límite de detección de 0,1 ppm, ideal para sustancias orgánicas volátiles excepto formaldehído y ácido fórmico) o uno TCD (con un límite de detección de 10 ppm, permite detectar todos los compuestos de la muestra excepto el gas portador).

La columna se mantiene a una temperatura de 40°C, emplea una cantidad de muestra bastante baja alrededor de 1  $\mu\text{L}$ , los tiempos de retención son evaluados con una curva de calibración y el cromatograma respectivo.

Una de las ventajas de este método es la rapidez con la que se pueden analizar una mezcla de VFA's de forma simultánea, las concentraciones de trabajo no suelen ser tan elevadas por lo que los resultados se obtienen con mayor facilidad. Respecto a las desventajas de este ensayo con el pretratamiento de la muestra siempre debe ser filtrada previamente para que no ocurran taponamientos en los inyectores y en la columna, reduciendo significativamente su resolución. [32]

b) HPLC: La columna empleada de HPLC es más pequeña en comparación con GC: sus dimensiones oscilan entre 20 y 30 cm y un diámetro interno de 4 a 7 mm, dependiendo del analito es posible combinar con otros procesos, por ejemplo:

- Intercambio iónico: la columna contiene un revestimiento de una resina de intercambio con grupos iónicos (sulfónicos o tetra-alquilo-amonio) y en su fase estacionario un buffer acuoso, lo que permite su interacción con el analito en diferentes.
- Derivatización: la muestra es tratada mediante una reacción química para formar un éster de carboxilato, que posteriormente es tratado y purificado, para que esta nueva especie obtenida tenga una mayor capacidad de interacción con la columna, siendo mucho más estable que un ácido orgánico en solución acuosa.

Se pueden emplear detectores como el UV-DCD (ultravioleta con arreglo de diodos) el cual determina la cantidad de luz que absorbe, esta variación en la intensidad de luz es cuantificada con una señal eléctrica; otro detector que es posible usar es el RID (detector de índice de refracción), el cual permite cuantificar la cantidad de luz que se desvía a causa de la concentración del analito considerando una celda de referencia en la fase móvil.

La muestra es inyectada en cantidades de entre 1 a 0,5 uL junto con el solvente que consiste en un ácido fuerte diluido (por ejemplo, ácido sulfúrico), a una temperatura de 50 – 60 °C con un flujo constante entre 0,6 a 0,8 mL por minuto.

Una de las ventajas de este análisis es que necesita inyectarse sin necesidad de hacer una rampa de temperaturas conservando de esta forma el contenido de VFA's en el solvente, uno de los problemas es el pretratamiento inicial al que se debe someter la muestra para estabilizarla y evitar altas pérdidas por volatilización del analito. [32]

c) NMR: Se emplea directamente la muestra sin tratamiento alguno, trabajando con un estándar interno de concentración absoluta (mM) y analizándola de manera comparativa con una base de datos para dar como resultado la identificación de cada uno de los analitos en un pico específico para luego determinar la concentración de cada uno de los ácidos. [32]

# CAPÍTULO 3

## 3. Enfoque de la investigación:

### 3.1 Tipo de investigación:

Esta investigación propuesta es del tipo experimental y tiene un alcance exploratorio; su objetivo es el de establecer una secuencia consecutiva de diferentes procesos que permitan una separación y recuperación más efectiva de los carboxilatos en medio acuoso y la verificación del potencial de biogás del residuo sólido de dichos fermentos obtenidos mediante pruebas de laboratorio, puesto que existe información del tratamiento de otros residuos, Así detalla Yuan et al (2023) sobre la recuperación de ácidos caproico y caprílico en un proceso en cascada de la fermentación de ensilado de maíz; en donde propone una metodología para la recuperación de estos ácidos de cadena media empleando procesos en filtro prensa, ultrafiltración, extracción líquido - líquido; por otro lado McDowall et al (2022), expone en su escrito una metodología para la recuperación de VFA's de cadena media empleando membranas de ultra y nanofiltración, considerando efectos de atascamiento y etapas en cascada; estas publicaciones se ha tomado como línea base para el diseño experimental de este caso de estudio, pero no existe uno específico para fermentos anaeróbicos de residuos de banano y café. [9], [29]

En cada uno de los casos propuestos, se ha evaluado el porcentaje de recuperación de VFA's en cada etapa empleando cromatografía de gases GC, las muestras fueron sometidas a un proceso de derivatización ácida con metanol para mejorar la estabilidad de los VFA's en medio acuoso como ésteres de ácidos grasos, previo al análisis por triplicado de cada uno, con una columna a fin a los ácidos respectivos (DB-FFAP de 60 m × 0.5 µm de diámetro) junto con el gas carrier Nitrógeno y un detector FID con incrementos de temperatura de 20°C hasta alcanzar un valor de 200°C .

### 3.2 Diseño de investigación:

La metodología empleada para la separación, recuperación y cuantificación de los carboxilatos es del tipo experimental considerando como parámetros principales la concentración de carboxilatos en mg/L y el contenido de materia sólida seca obtenidos en las fracciones residuales de los fermentos de dos residuos agroindustriales en condiciones controladas de temperatura y pH.

En cada una de las etapas propuestas se busca establecer las condiciones más adecuadas para una separación de los VFA's con altas tasas de recuperación:

- Considerando un proceso de varias etapas donde los subproductos también son tratados con el fin de reducir el potencial biodegradable de dichas corrientes y desarrollar una metodología óptima y amigable con el medio ambiente.
- Desarrollando pruebas por duplicado de cada separación para caracterizar los subproductos obtenidos respecto al contenido de materia orgánica volátil, materia seca y VFA's recuperados.
- Cambiando ciertos factores puntuales para analizar el efecto en la recuperación de los analitos ante dicho cambio, puesto que se trabajan con sustancias sensibles a la temperatura por su naturaleza altamente volátil.

### **3.3 Metodología:**

#### **3.3.1 Variables:**

Variable independiente: Tipo de separación física aplicada en cada etapa.

Variable dependiente: Concentración de VFA's en mg/L.

#### **3.3.2 Diseño experimental:**

##### **3.3.2.1 Métodos y técnicas:**

###### **a) Separación por filtro prensa:**

Las muestras desarrolladas en el proceso de fermentación se recibieron caracterizadas. Inicialmente se utilizó una pinza metálica para abrir la tapa de los frascos de fermentación, liberando el exceso de gas a temperatura ambiente; luego se agregó todo el contenido del frasco en el interior del dispositivo filtrante (que contenía una porción de malla de tela plástica) y se prensó su contenido, aplicando una presión de 0,5 bares para separar toda la fracción líquida.

Se colectó el filtrado con un embudo de vidrio en un frasco ámbar con tapa esmerilada. Se agregaron 50 mL de agua tipo 1 al sólido agotado y se prensó por segunda vez su contenido, después se guardó la fracción líquida colectada en el mismo frasco ámbar y se almacenó en refrigeración a 4°C; de forma similar se procedió con la fracción sólida: se remueve de la malla para colocarla en un cristizador con ayuda de una espátula y se guardó en refrigeración a 4°C.

**b) Separación por centrifugación:**

Los filtrados colectados de la etapa anterior fueron colocados fuera del refrigerador hasta alcanzar una temperatura cercana a los 10°C. Se tomo una alícuota de 2 mL del filtrado previamente homogenizado y se colocaron en tubos Ependorff. Se programo la centrífuga a 10000 RPM durante 20 minutos a 10°C y se colocaron los tubos en su interior guardando el contrapeso respectivo de las muestras, se cerró la centrífuga y se arrancó el equipo. Posterior a la centrifugación se guardaron los tubos Ependorff en refrigeración a 4°C.

**c) Separación por membranas de ultrafiltración:**

Se procedió a cortar la membrana de ultrafiltración en círculos de 5 cm de diámetro y se pesaron previamente en una balanza, luego se colocaron las membranas en un sistema de filtración al vacío y se agregaron 3 mL de filtrado de la etapa anterior, se encendió la bomba y se colecto el nuevo filtrado en un kitasato.

Posteriormente se guardaron los filtrados en tubos de ensayo con tapa rosca para guardarlos en refrigeración a 4°C, las membranas se guardaron en un desecador a temperatura ambiente y se analizaron los VFAS's en los filtrados mediante cromatografía de gases.

**d) Separación por extracción con solventes:**

Se emplearon tubos de ensayo tapa rosca de 12 mL y se colocaron 2 mL de filtrado de la etapa anterior con 1 mL de 1-octanol a temperatura ambiente. Se taparon los tubos y se colocaron en un vortex a 200 RPM a temperatura ambiente durante 5 min y luego se colocaron en embudos de decantación y se dejaron reposar durante 20 minutos.

Se separaron las fases con ayuda de un embudo de plástico pequeño y un tubo tapa rosca de 12 mL para cada una, se procedió con la fase acuosa y en ambos casos se analizó en el cromatógrafo su contenido de VFA's. Se prepararon las curvas de calibración de los VFA's de cadena media (ácido hexanoico y octanoico) empleando como solvente 1-octanol, partiendo de una concentración madre de 500 ppm y diluyendo con alcohol a los siguientes puntos de medición: 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200 ppm. Los extractos y refinados fueron guardados en tubos de ensayo con tapa rosca en refrigeración a 4°C.

**e) Cuantificación de carboxilatos por cromatografía GC:**

Se realizó una curva de calibración de los VFA's, para esto, se diluyó los estándares de los VFA's utilizados en agua tipo 1; siendo estos estándares ácido acético, propiónico, butírico, iso-butírico, valérico, iso-valérico, caproico y caprílico; hasta alcanzar las siguientes concentraciones: 10, 20, 40, 50, 60, 80, 100 mg/L (VFA/MCFA mix at 99.5 %, Chem Service Inc.).

Los análisis para detección y cuantificación de VFA's se realizaron por duplicados, empleando un cromatógrafo de gases (GC) Shimadzu Nexis GC-2030 equipado con un inyector automático AOCTM-30i, una columna Stabilwax-

DA (Crossbond Carbowax polyethylene glycol, 0.25  $\mu\text{m}$   $\times$  0.53 mm ID  $\times$  30 m, Restek Corporation) y un detector de ionización de llama (FID). Nitrógeno con 99.999 % de pureza fue empleado como gas de arrastre o carrier gas (presión de 100 kPa) con una temperatura de inyección de 220 °C (Splitless mode – 1  $\mu\text{L}$  volume de inyección); temperatura del detector de 250 °C; y una rampa de temperatura que inicia en 70 °C, mantenido for 3 min, seguido de un incremento de temperatura a una tasa de 10 °C min<sup>-1</sup> hasta alcanzar los 200 °C y mantenerse durante 5 minutos más, con un tiempo total de 21 minutos.

Se utilizó el software LabSolutions<sup>TM</sup> (Shimadzu Corporation) para el control instrumental del equipo, la adquisición de datos y el procesamiento de datos. La llama de FID requiere de flujos de aire sintético ultraseco (100 mL/min) e hidrógeno ultrapuro 99.9995% (40 mL/min) para mantenerse encendida. El generador de hidrógeno es de la marca Peak Scientific modelo Precision SL 200. El blanco es agua tipo I.

**f) Caracterización final de las corrientes secundarias:**

Se determinaron los siguientes parámetros de las corrientes sólidas de las primeras etapas:

- **Carbono orgánico total (TOC):** se abrió la válvula de entrada del aire, luego se encendió el equipo TOC y se esperó durante 30 minutos hasta alcanzar las condiciones de temperatura y flujo de aire necesarios para el análisis (T = 670°C y P aire = 0,8 bares). Se tomó una alícuota de 1 mL del filtrado de la primera etapa y se diluyó con 15 mL de agua tipo 1 y se procedió a filtrar a 0,45  $\mu\text{m}$  la muestra; se homogenizó en un tubo con tapa rosca de 15 mL; luego se colocó el tubo en la toma muestra del

analizador y se procede a seleccionar el parámetro a analizar (TOC), se escogen las curvas de calibración del rango de concentración probable en el que se encuentren las muestras y se realiza el análisis: primero colocando el blanco y luego cada una de las muestras.

- **Sólidos totales, volátiles y fijos totales (ST, SVT y SFT):** Se secaron crisoles de porcelana a 105°C durante 2 horas y luego de enfriaron en el desecador durante 1 h, luego se pesaron y se agregaron muestras de 1 gramo de la fracción sólida y 5 mL de la fracción líquida, respectivamente; fueron llevadas a la estufa durante 8 h a 105°C; se sacaron los crisoles se la estufa, se enfriaron en un desecador durante 1 hora y se pesaron para obtener los sólidos totales, después fueron llevados a la mufla a 550°C durante 2 h, se colocaron en el desecador para enfriarlos durante 2 h y finalmente se pesan para obtener los sólidos fijos y por diferencia los volátiles.
- **Densidad:** Se tomó una probeta de 10 mL vacía y se pesó en una balanza analítica, luego se midieron 5 mL del filtrado de la primera etapa y se pesó todo su conjunto, para determinar la masa de la muestra y después su densidad.
- **pH:** Se colocaron 10 mL de muestra homogenizada previamente en un vaso de precipitación y se midió con el sensor de pH del multiparámetro a temperatura ambiente.



### 3.3.3 Diagrama de proceso:

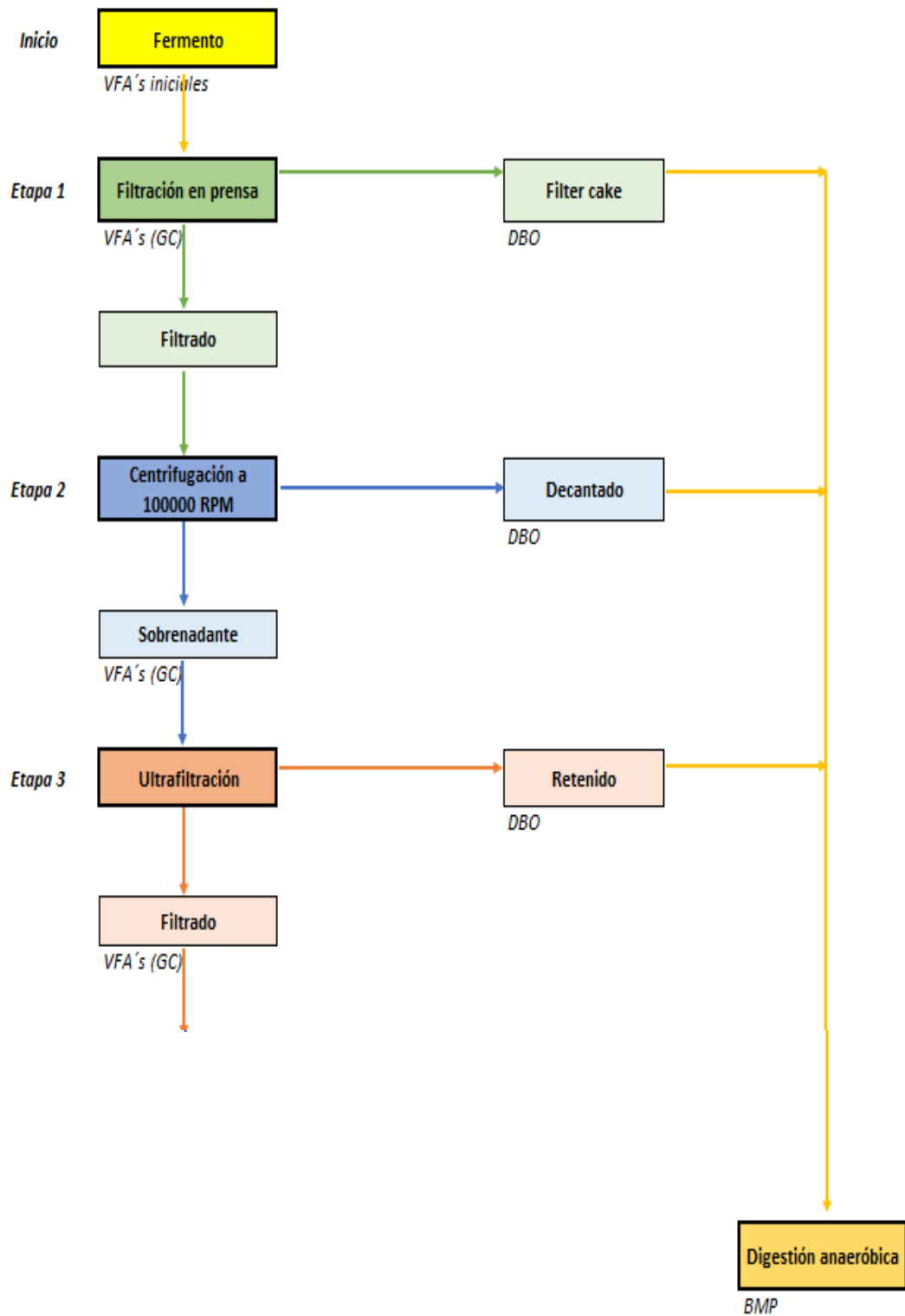


Figura 7: Diagrama de flujo de los métodos de separación, recuperación y cuantificación de VFA's.

### 3.4 Materiales, equipos y reactivos:

Tabla 1

Materiales, equipos y reactivos empleados en cada una de las etapas.

	<b>Materiales</b>	<b>Equipos</b>	<b>Reactivos</b>
Filtración con prensa	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vaso de acero grado alimenticio de 25 mL de capacidad.</li> <li>• Probetas de vidrio de 25±0,5 mL</li> <li>• Tela plástica de 1 mm de diámetro de poro.</li> <li>• Papel parafilm.</li> <li>• Frascos ámbar de 25 mL</li> <li>• Pisceta de 500 mL.</li> <li>• Pinza metálica.</li> <li>• Embudos de vidrio</li> <li>• Cristalizadores de 50 mm de diámetro.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Prensa hidráulica Marca MEGA de 15 ton.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• H<sub>2</sub>O tipo 1</li> </ul>
Centrifugación	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tubos Eppendorf de 1 y 2 mL.</li> <li>• Embudo de vidrio</li> <li>• Micropipeta BRAVO rango de 1 a 10 uL y de 100 a 1000 uL.</li> <li>• Puntas de micropipeta.</li> <li>• Viales de cromatografía de 1,5 mL.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Centrifuga Eppendorf de 10000 RPM con regulador de temperatura.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• H<sub>2</sub>O tipo 1</li> </ul>
Análisis de ST, SFT, SVT, TOC y densidad	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cristalizadores de vidrio de 90 mm de diámetro.</li> <li>• Desecador de vidrio con agente desecante sílica gel.</li> <li>• Espátulas metálicas con mango de madera.</li> <li>• Crisoles de porcelana de 30 mL.</li> <li>• Pinza para crisoles</li> <li>• Probetas de 10±0,1 mL.</li> <li>• Tubos Hach de 15 mL.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Balanza analítica con 4 decimales de precisión, marca ADAM.</li> <li>• Analizador TOC, marca Shimadzu</li> <li>• Estufa de secado, marca Quimis.</li> <li>• Mufla marca Thermolyne.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• H<sub>2</sub>O tipo 1</li> </ul>

Ultrafiltración	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Membrana de ultrafiltración: TriSep Flat Sheet Membrane, UB70, PVDF, UF, 1016 x 305mm, 1/Pk, de 5 cm de diámetro.</li> <li>• Vasos de precipitación de 250 mL.</li> <li>• Probetas de 10±0,05 mL</li> <li>• Jeringas de plástico de 3 mL.</li> <li>• Tubos de ensayo con tapa rosca de 10 mL.</li> <li>• Vidrios de reloj.</li> <li>• Pinza metálica.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sistema de filtración al vacío marca Sartorius.</li> <li>• Balanza analítica con cuatro decimales de precisión, marca ADAM.</li> <li>• Bomba de vacío CE de diafragma.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• H<sub>2</sub>O tipo 1</li> </ul>
Cromatografía de gases	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Jeringas de plástico de 3 mL.</li> <li>• Viales de cromatógrafo de 1,5 mL.</li> <li>• Columna de cromatógrafo para VFA's Stabilwax-DA (Crossbond Carbowax polyethylene glycol, 0.25 µm x 0.53 mm ID x 30 m, Restek Corporation)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cromatógrafo de gases Shimadzu Nexis GC-2030 equipado con un inyector automático AOCTM-30i; con detector FID.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gas Carrier N<sub>2</sub>.</li> <li>• Aire.</li> <li>• Metanol.</li> <li>• H<sub>2</sub>O tipo 1.</li> <li>• Estándares de VFA's con 99% de concentración: ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico, ácido isobutírico, ácido valérico, ácido isovalérico, ácido hexanoico, ácido octanoico.</li> </ul>

### 3.5 Análisis estadístico:

Se realizará un análisis ANOVA, con incertidumbre tipo 1 (Desviación estándar y coeficiente de variación), a los resultados obtenidos en el cromatógrafo de gases respecto a las concentraciones de VFA's en cada una de las etapas respecto a valores estándares. Se empleará una curva de calibración de 5 puntos con concentraciones conocidas en ppm de los ácidos disueltos partiendo de estándares en medio acuoso para la determinación del ajuste estadístico de los datos.

# Capítulo 4:

## 4. Resultados obtenidos:

Las muestras de los fermentos analizados tendrán asignados los siguientes códigos de identificación:

- BP1-NC: Banana pulpa – pH no controlado.
- BP2-NC: Banana pulpa – pH no controlado.
- CF1-AC: Café pH = 5.2 (ácido)
- CF2-AC: Café pH = 5.2 (ácido)
- CF1-C: Café pH = 6,6 (controlado)
- CF2-C: Café pH = 6,6 (controlado)
- CA1-C: Cacao – pH = 6,6 (controlado)
- BP-C: Banana pulpa – pH = 6,6 (controlado)
- CB-C: Cáscara banana – pH = 6,6 (controlado)

### 4.1 Características de los ácidos carboxílicos presentes en los fermentos.

Los ácidos carboxílicos presentes en los fermentos a estudiar presentan las siguientes características fisicoquímicas:

Tabla 2

Características fisicoquímicas de los VFA's.

Ácido orgánico	Fórmula molecular	pKa (a 25°C)	Temperatura de ebullición (°C)	Demanda teórica de oxígeno TOD (g/g)	Presión de vapor (a 20°C) (Pa)
Ácido acético	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	4,74	118	1,07	1540
Ácido propiónico	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	4,87	141	1,51	390
Ácido isobutírico	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	4,86	155	1,82	130
Ácido butírico	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	4,82	164	1,82	57
Ácido isovalérico	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	4,86	177	2,04	20
Ácido valérico	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	4,81	186	2,04	20
Ácido hexanoico	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	4,88	205	2,21	27
Ácido octanoico	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	4,89	239	2,44	3,71

Tabla 3

Concentración inicial (ppm) de VFA's presentes en los fermentos de los agroresiduos estudiados.

	BP1-NC	BP2-NC	BP-C	CA1-C	CB-C	CF1-AC	CF2-AC	CF1-C	CF2-C
Ácido acético	615,26	563,65	327,90	448,36	208,33	559,94	610,36	225,03	185,26
Ácido propiónico	94,68	67,87	57,26	60,23	47,74	154,12	162,71	37,76	31,85
Ácido isobutírico	43,94	34,43	58,51	91,79	56,97	250,22	290,31	29,29	36,21
Ácido butírico	781,42	593,11	414,51	1781,30	271,16	645,49	692,61	201,08	177,64
Ácido isovalérico	98,87	80,91	73,42	133,29	58,88	31,62	33,17	44,21	41,30
Ácido valérico	17,31	13,15	10,48	7,59	10,95	16,37	16,49	9,80	10,55
Ácido hexanoico	42,31	38,36	4,11	16,43	5,16	27,47	29,10	17,70	26,64
Ácido octanoico	15,47	9,85	48,89	54,08	40,25	5,26	5,08	63,77	48,57
<b>Total VFA's</b>	<b>1.709,26</b>	<b>1.401,33</b>	<b>995,12</b>	<b>2.593,07</b>	<b>699,45</b>	<b>1.690,50</b>	<b>1.839,83</b>	<b>628,64</b>	<b>558,03</b>

Tabla 4

Valores de pH inicial y masa de sustrato fresco de los fermentos.

Muestras	pH inicial de fermento	Masa del sustrato [g]
BP1-NC	6,63	10,08
BP2-NC	6,63	10,01
CF1-AC	5,21	19,92
CF2-AC	5,23	19,93
CF1-C	6,61	19,97
CF2-C	6,57	19,99
CA1-C	6,60	20,95
BP-C	6,61	10,02
CB-C	6,62	29,92

## 4.2 Resultados de las etapas.

### 4.2.1 Filtro prensa.

Tabla 5

Resultados del contenido de sólidos en la fracción másica obtenida con el prensado de los fermentos.

Muestras	Masa fracción sólida (g)	%ST	%SVT	%SFT
CF1-AC	9,5624	18,44%	87,51%	12,49%
CF2-AC	19,9053	16,39%	86,29%	13,71%
CF1-C	20,7732	14,01%	82,15%	17,85%
CF2-C	18,8194	17,56%	85,42%	14,58%
CA1-C	14,5988	13,51%	77,62%	22,38%
CB-C	14,6122	14,17%	79,89%	20,11%
BP-C	2,4110	24,19%	79,80%	20,20%
BP1-NC	17,3635	13,23%	80,67%	19,33%
BP2-NC	10,0649	15,05%	83,97%	16,03%

Tabla 6

Resultados de caracterización fracción líquida obtenida en el prensado de los fermentos.

Muestras	Volumen total (mL)	Densidad (g/mL)	pH	Temperatura (°C)	TOC (ppm)	ST%	SVT%	SFT%
CF1-AC	129,5	0,9050	5,24	11,5	1882.5	2,60%	1,61%	0,10%
CF2-AC	107,5	0,9680	5,18	17,2	3744.8	2,06%	1,33%	0,72%
CF1-C	127,5	0,9669	7,32	18,8	2676	2,52%	1,63%	0,89%
CF2-C	130,5	0,8700	7,32	16,4	3391.5	3,04%	1,88%	1,15%
CA1-C	118,5	0,9289	7,04	13,6	4137	2,47%	1,44%	1,03%
CB-C	124,0	1,0040	7,29	12,2	1980	2,21%	1,43%	0,78%
BP-C	131,5	0,9760	7,23	14,8	2199	2,33%	1,42%	0,91%
BP1-NC	117,5	0,9151	4,40	13,7	3289.5	1,70%	1,11%	0,59%
BP2-NC	114,5	0,9589	4,72	16,4	1912.5	2,07%	1,40%	0,67%

#### 4.2.2 Centrifugación a 10000 RPM:

Tabla 7

Resultados de la concentración de VFA's (ppm) en el sobrenadante a 10000 RPM.

	BP1-NC	BP2-NC	BP-C	CA1-C	CB-C	CF1-AC	CF2-AC	CF1-C	CF2-C
Ácido acético	461,88	509,87	220,02	331,16	168,30	378,68	420,48	130,51	149,81
Ácido propiónico	22,32	12,18	37,06	47,21	32,16	33,15	36,11	21,94	25,46
Ácido isobutírico	4,41	3,56	51,68	56,91	42,33	117,66	146,52	18,33	32,25
Ácido butírico	213,03	246,76	370,02	806,68	222,34	386,20	444,28	200,61	224,55
Ácido isovalérico	14,39	13,65	66,09	62,22	48,12	18,43	21,03	33,14	37,51
Ácido valérico	8,15	1,57	6,99	4,22	4,45	9,84	8,89	1,11	4,92
Ácido hexanoico	11,06	2,29	2,61	5,96	3,60	16,36	17,28	1,33	35,27
Ácido octanoico	30,09	4,77	48,51	38,76	38,62	3,40	4,02	33,11	29,35
<b>Total VFA's</b>	<b>765,35</b>	<b>794,65</b>	<b>802,99</b>	<b>1353,12</b>	<b>559,93</b>	<b>963,72</b>	<b>1098,61</b>	<b>440,07</b>	<b>539,11</b>

Tabla 8

Recuperación (%) de VFA's en el sobrenadante de la centrifugación respecto a su concentración inicial.

	BP1-NC	BP2-NC	BP-C	CA1-C	CB-C	CF1-AC	CF2-AC	CF1-C	CF2-C
Ácido acético	75,07	90,46	67,10	73,86	80,79	67,63	68,89	58,00	80,86
Ácido propiónico	23,58	17,95	64,71	78,39	67,37	21,51	22,19	58,10	79,93
Ácido isobutírico	10,04	10,33	88,33	61,99	74,31	47,02	50,47	62,57	89,07
Ácido butírico	27,26	41,60	89,27	45,29	82,00	59,83	64,15	99,76	126,40
Ácido isovalérico	14,56	16,87	90,01	46,68	81,72	58,27	63,38	74,95	90,82
Ácido valérico	47,08	11,92	66,68	55,52	40,64	60,08	53,89	11,29	46,61
Ácido hexanoico	26,18	5,97	63,47	36,30	69,74	59,57	59,39	7,50	132,39
Ácido octanoico	194,46	48,47	99,23	71,68	95,95	64,64	79,18	51,92	60,44
<b>Total VFA's</b>	<b>44,78</b>	<b>56,71</b>	<b>80,69</b>	<b>52,18</b>	<b>80,05</b>	<b>57,01</b>	<b>59,71</b>	<b>70,00</b>	<b>96,61</b>

### 4.2.3 Resultados Ultrafiltración:

Tabla 9

Cantidades empleadas en el proceso de ultrafiltración de los filtrados de la etapa anterior.

Muestra	Volumen sobrenadante (mL)	Volumen agua tipo 1 (mL)	Volumen del filtrado (mL)	Po (kPa)	Pf (kPa)	Masa inicial membrana (g)	Masa final membrana (g)	Variación masa membrana (g)
CF1-C	0,9	0,5	0,5	70	80	0,2049	0,2089	0,004
CF2-C	0,9	0,5	0,5	60	70	0,2285	0,2351	0,0066
CB-C	0,9	0,5	0,5	60	70	0,2322	0,237	0,0048
BP1-NC	0,9	0,5	0,6	60	70	0,2189	0,2225	0,0036
BP2-NC	1	0,5	0,6	65	70	0,216	0,2182	0,0022
CF1-AC	0,9	0,5	0,5	60	70	0,2125	0,2192	0,0067
CF2-AC	1	0,5	1,2	55	70	0,2421	0,248	0,0059
CA1-C	1	0,5	0,7	65	70	0,2455	0,2969	0,0514
BP-C	0,8	0,5	0,5	65	75	0,2065	0,2125	0,006

Tabla 10

Concentración en ppm de VFA's obtenidas en el filtrado de la Ultrafiltración.

	BP1-NC	BP2-NC	BP-C	CA1-C	CB-C	CF1-AC	CF2-AC	CF1-C	CF2-C
Ácido acético	186,143	170,562	71,167	148,337	62,566	356,193	167,607	31,530	38,559
Ácido propiónico	37,087	27,602	27,515	26,565	12,530	84,322	33,147	11,038	13,408
Ácido isobutírico	34,920	21,797	26,471	36,303	19,211	208,256	98,303	12,366	12,688
Ácido butírico	246,377	205,299	65,791	262,025	92,476	436,162	181,733	49,199	56,992
Ácido isovalérico	45,457	34,070	33,272	47,711	23,264	84,709	40,427	15,976	20,995
Ácido valérico	20,011	12,840	10,436	10,157	4,966	33,733	12,629	3,622	5,433
Ácido hexanoico	27,570	15,377	10,504	11,165	5,038	40,605	13,676	3,602	9,949
Ácido octanoico	16,870	10,973	32,541	17,703	20,708	20,772	6,974	40,176	31,928
<b>Total VFA's</b>	<b>614,434</b>	<b>498,518</b>	<b>277,696</b>	<b>559,964</b>	<b>240,758</b>	<b>1264,752</b>	<b>554,493</b>	<b>167,509</b>	<b>189,953</b>

Tabla 11

Recuperación (%) de VFA's en el filtrado de la ultrafiltración respecto a su concentración inicial.

	BP1-NC	BP2-NC	BP-C	CA1-C	CB-C	CF1-AC	CF2-AC	CF1-C	CF2-C
Ácido acético	30,25	30,26	21,70	33,08	30,03	63,61	27,46	14,01	20,81
Ácido propiónico	39,17	40,67	48,05	44,11	26,25	54,71	20,37	29,23	42,10
Ácido isobutírico	79,47	63,31	45,24	39,55	33,72	83,23	33,86	42,22	35,04
Ácido butírico	31,53	34,61	15,87	14,71	34,10	67,57	26,24	24,47	32,08
Ácido isovalérico	45,98	42,11	45,31	35,80	39,51	267,86	121,87	36,13	50,84
Ácido valérico	115,61	97,65	99,49	133,74	45,34	206,04	76,59	36,97	51,47
Ácido hexanoico	65,16	40,08	255,45	67,95	97,53	147,83	47,00	20,35	37,35
Ácido octanoico	109,02	111,40	66,56	32,74	51,44	395,12	137,22	63,00	65,74
<b>Total VFA's</b>	<b>35,95</b>	<b>35,57</b>	<b>27,91</b>	<b>21,59</b>	<b>34,42</b>	<b>74,82</b>	<b>30,14</b>	<b>26,65</b>	<b>34,04</b>

Tabla 12

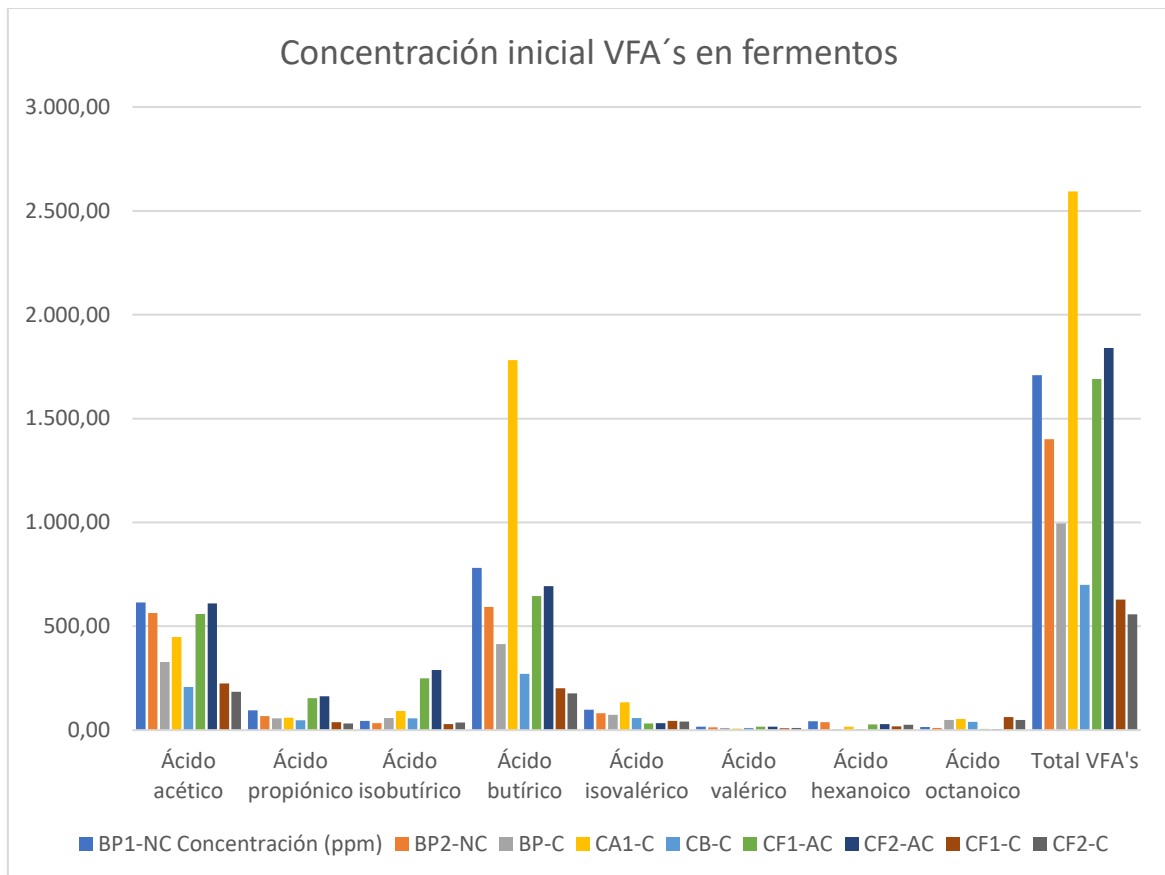
Masa de VFA's obtenida en cada etapa respecto a 1 kg de biomasa fresca empleada en la fermentación.

Muestra	Masa VFA's iniciales (g/kg)	VFA's filtrado (mg/L)	Masa VFA's filtrado (g/kg)	VFA's ultrafiltrado (mg/L)	Masa VFA's ultrafiltrado (g/kg)
BP1-NC	11,43	765,35	5,12	614,43	9,43
BP2-NC	9,03	794,65	5,12	498,52	6,81
CF1-AC	6,74	963,72	3,84	1264,75	19,19
CF2-AC	5,31	1.098,61	3,16	554,49	6,15
CF1-C	2,44	440,07	1,71	167,51	1,77
CF2-C	2,25	539,11	2,171	189,95	2,09
CA1-C	8,47	1.353,12	4,42	559,96	5,45
BP-C	8,09	802,99	6,53	277,70	3,13
CB-C	1,73	559,93	1,38	240,76	2,44

#### 4.2.3 Gráficas de los resultados de VFA's por Cromatografía GC:

Gráfica 1

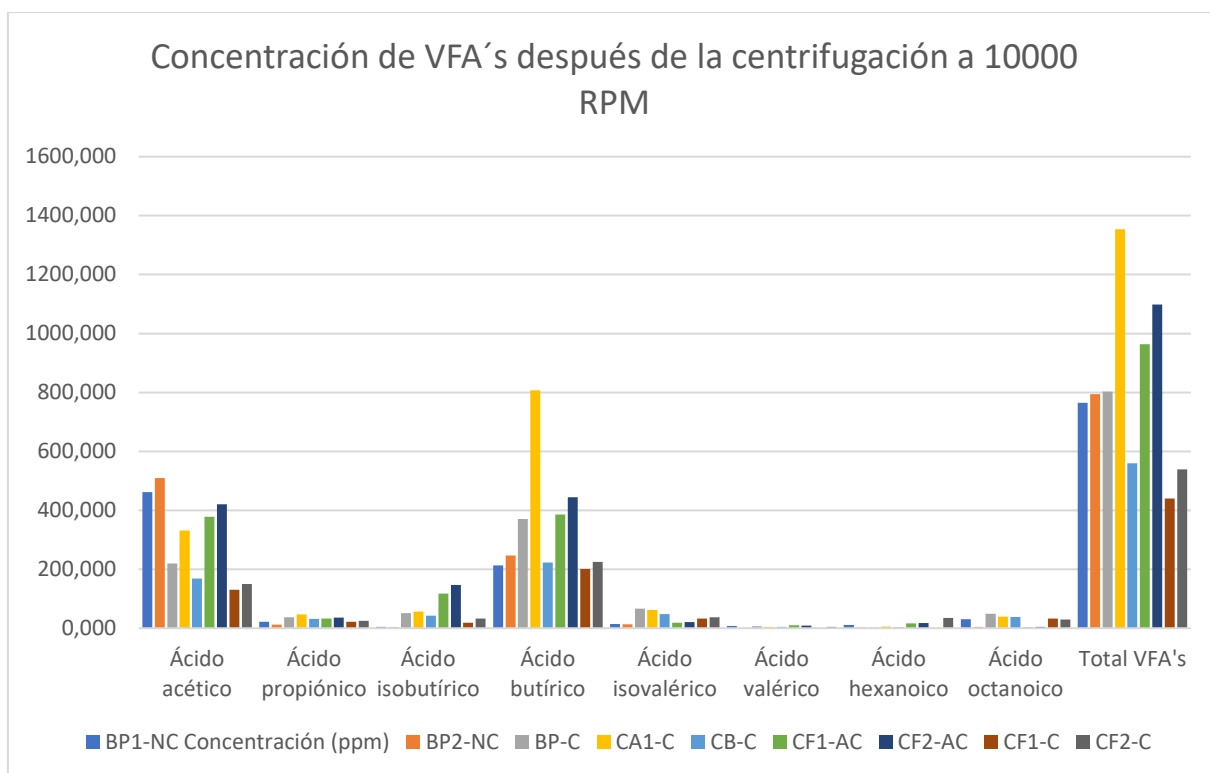
Concentración de VFA's obtenidos inicialmente para cada muestra.





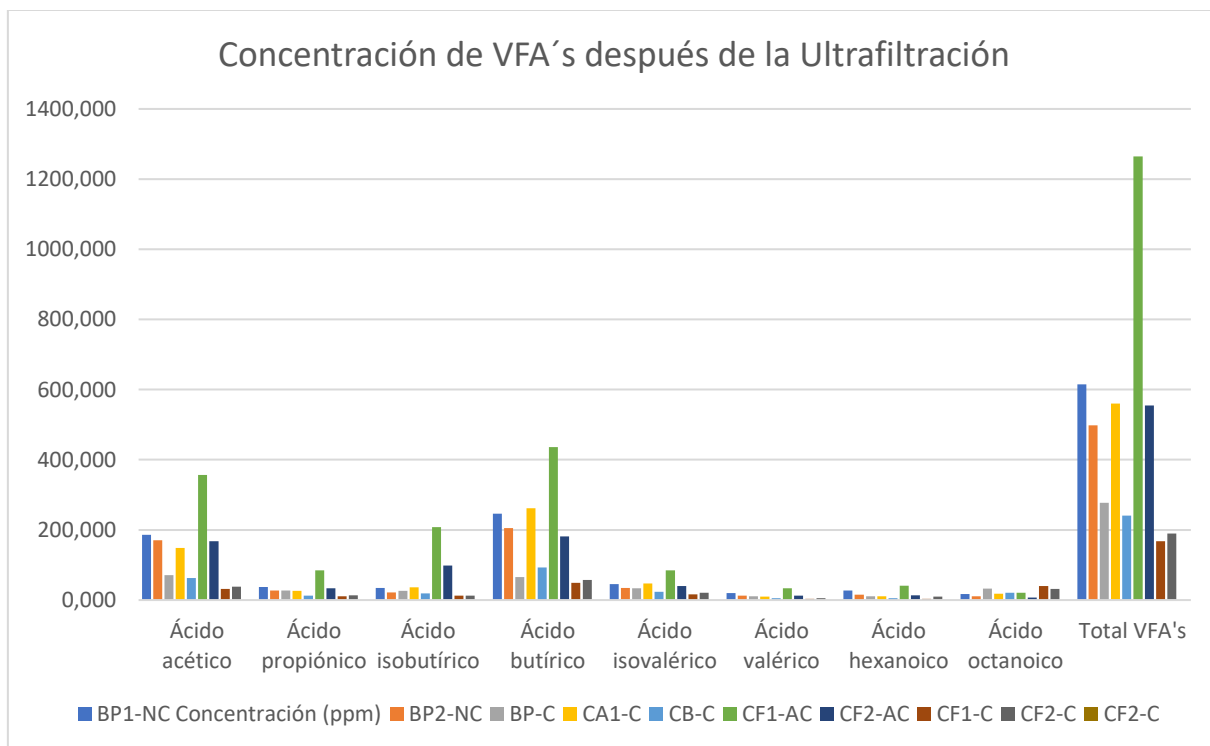
Gráfica 2:

Concentración de VFA's obtenidos después de la centrifugación a 10000 RPM.



Gráfica 3:

Concentración de VFA's obtenidos después de la ultrafiltración.



#### 4.2.4 Curvas de calibración empleadas y su análisis estadístico:

Tabla 13: Datos para la curva de calibración del de ácido acético.

Concentración de ácido acético (ppm)	Área
30	615905
70	1127072
100	1633938
200	2753534
300	4727627
400	6088207

Gráfica 4: Curva de calibración estándar de ácido acético.

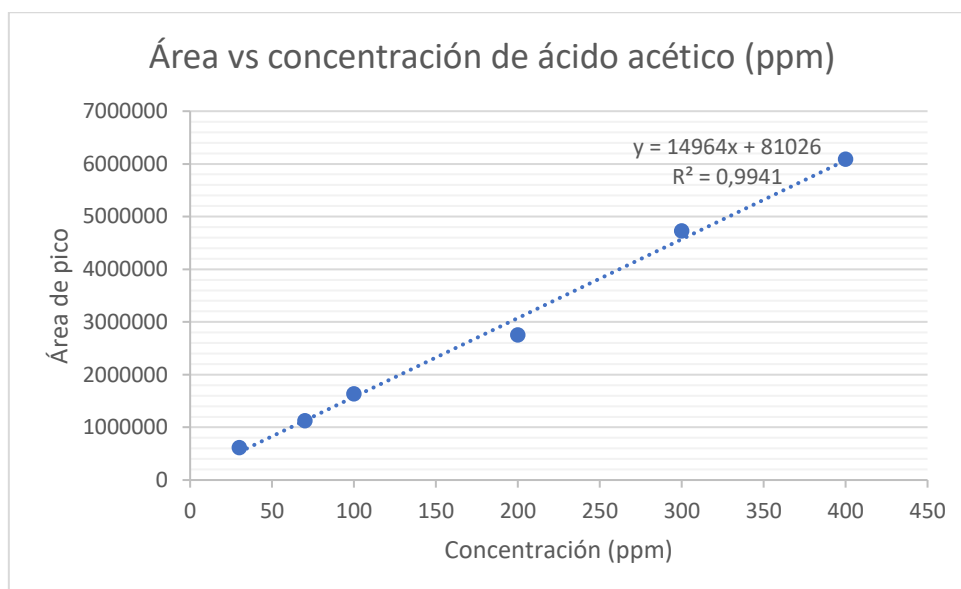


Tabla 14: Análisis estadístico ANOVA de un solo factor de la curva de calibración del ácido acético.

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coefficiente de correlación múltiple	0,99704508
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0,99409889
R <sup>2</sup> ajustado	0,99262361
Error típico	186019,067
Observaciones	6

#### ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	2,33E+13	2,33E+13	673,83	1,31E-05
Residuos	4	1,38E+11	3,46E+10		
Total	5	2,34E+13			

	Coeficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%	Inferior 95,0%	Superior 95,0%
Intercepción	81026,38	130138,46	0,623	0,57	-280295,93	442348,69	-280295,93	442348,69
concentración en ppm	14963,74	576,45	25,96	1,31E-05	13363,26	16564,23	13363,26	16564,23

Tabla 14: Datos para la curva de calibración del de ácido propiónico.

Concentración de ácido propiónico (ppm)	Área
30	942166
70	1900937
100	2619385
200	4523942
300	7665422
400	9676250

Gráfica 5: Curva de calibración estándar de ácido propiónico.

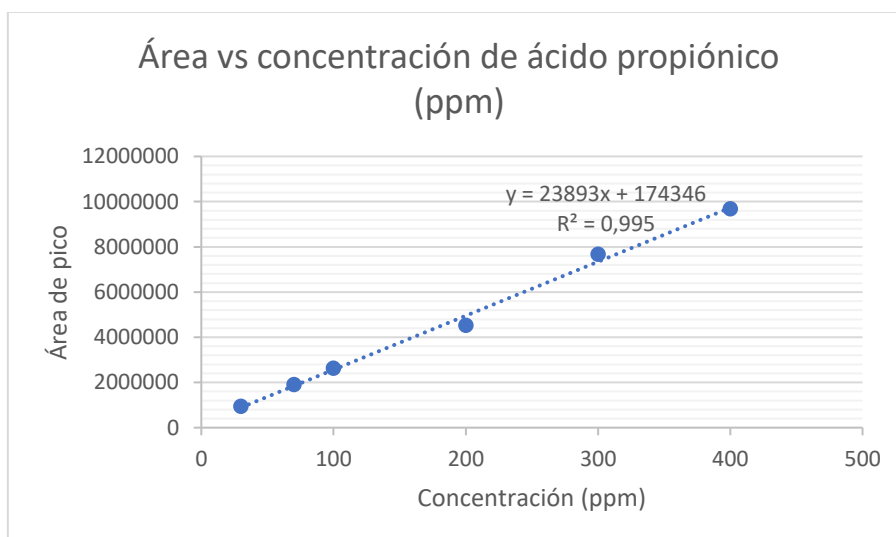


Tabla 15: Análisis estadístico ANOVA de un solo factor de la curva de calibración del ácido propiónico.

Estadísticas de la regresión	
Coeficiente de correlación múltiple	0,9974847
Coeficiente de determinación R <sup>2</sup>	0,99497573
R <sup>2</sup> ajustado	0,99371967
Error típico	273943,625
Observaciones	6

#### ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	5,94E+13	5,94E+13	792,13	9,48E-06
Residuos	4	3,00E+11	7,50E+10		
Total	5	5,97E+13			

	Coeficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%	Inferior 95,0%	Superior 95,0%
Intercepción	174345,57	191650,27	0,91	0,41	-357760,87	706452,02	-	706452,02
concentración en ppm	23892,75	848,92	28,145	9,48E-06	21535,77	26249,73	21535,78	26249,73

Tabla 16: Datos para la curva de calibración del de ácido isobutírico.

Concentración de ácido isobutírico (ppm)	Área
30	1291650
70	2396199
100	3184469
200	5469326
300	9041074
400	11549335

Gráfica 6: Curva de calibración estándar de ácido isobutírico.

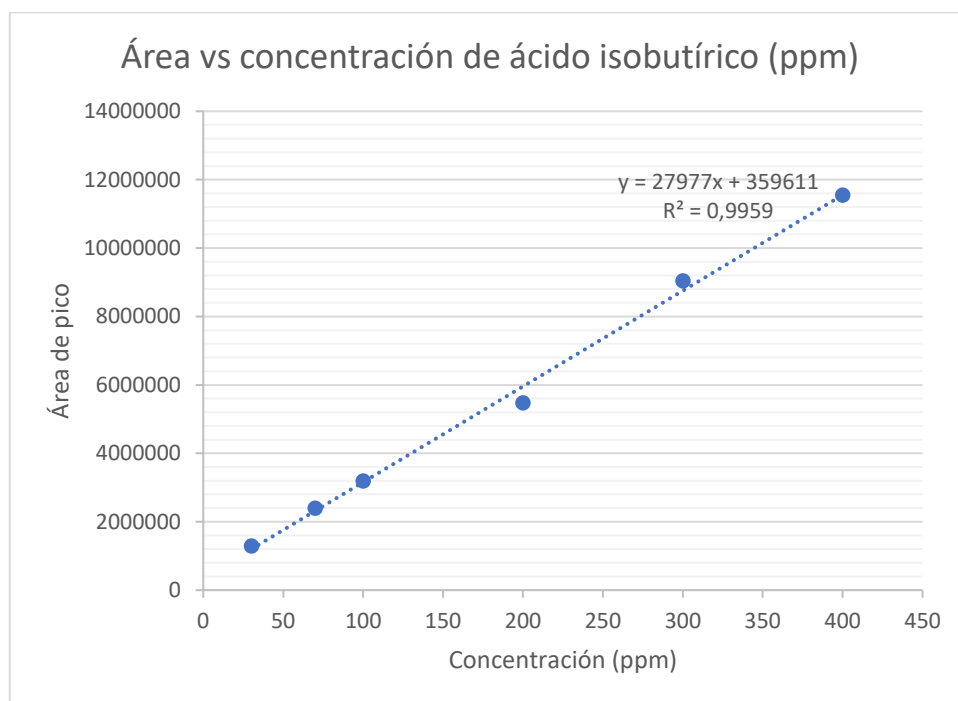


Tabla 16: Análisis estadístico ANOVA de un solo factor de la curva de calibración del ácido isobutírico.

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coeficiente de correlación múltiple	0,9979543
Coeficiente de determinación R <sup>2</sup>	0,99591278
R <sup>2</sup> ajustado	0,99489097
Error típico	289177,897
Observaciones	6

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	8,15E+13	8,15E+13	974,66	6,27E-06
Residuos	4	3,34E+11	8,36E+10		
Total	5	8,18E+13			

	Coeficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%	Inferior 95,0%	Superior 95,0%
Intercepción ácido	359610,92	202308,12	1,78	0,15	-202086,48	921308,32	-202086,48	921308,32
isobutírico	27976,72	896,13	31,22	6,27E-06	25488,66	30464,77	25488,66	30464,77

Tabla 17: Datos para la curva de calibración del de ácido butírico.

Concentración de ácido butírico (ppm)	Área
30	1212798
70	2391518
100	3188833
200	5519140
300	9155523
400	11682453

Gráfica 7: Curva de calibración estándar de ácido butírico.

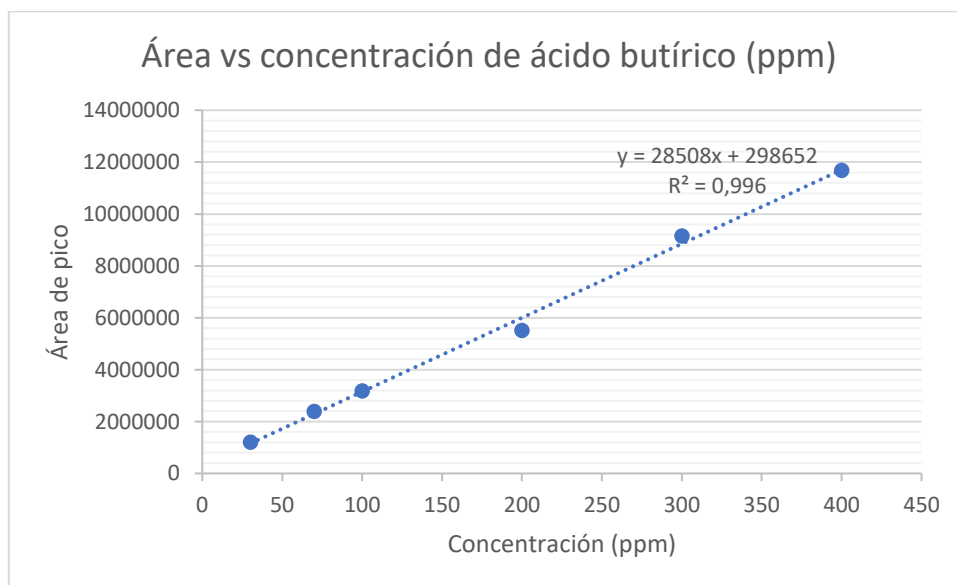


Tabla 18: Análisis estadístico ANOVA de un solo factor de la curva de calibración del ácido butírico.

Estadísticas de la regresión	
Coeficiente de correlación múltiple	0,99800288
Coeficiente de determinación R <sup>2</sup>	0,99600976
R <sup>2</sup> ajustado	0,99501219
Error típico	291134,357

## ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	8,46E+13	8,46E+13	998,444773	5,9787E-06
Residuos	4	3,39E+11	8,48E+10		
Total	5	8,50E+13			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%	Inferior 95,0%	Superior 95,0%
Intercepción	298651,53	203676,86	1,47	0,22	-266846,08	864149,15	-266846,09	864149,15
ácido butírico	28507,60	902,19	31,60	5,98E-06	26002,71	31012,480	26002,712	31012,48

Tabla 19: Datos para la curva de calibración del de ácido isovalérico.

Concentración de ácido isovalérico (ppm)	Área
30	1285231
70	2381562
100	3127780
200	5375368
300	8889470
400	11337312

Gráfica 8: Curva de calibración estándar de ácido isovalérico.

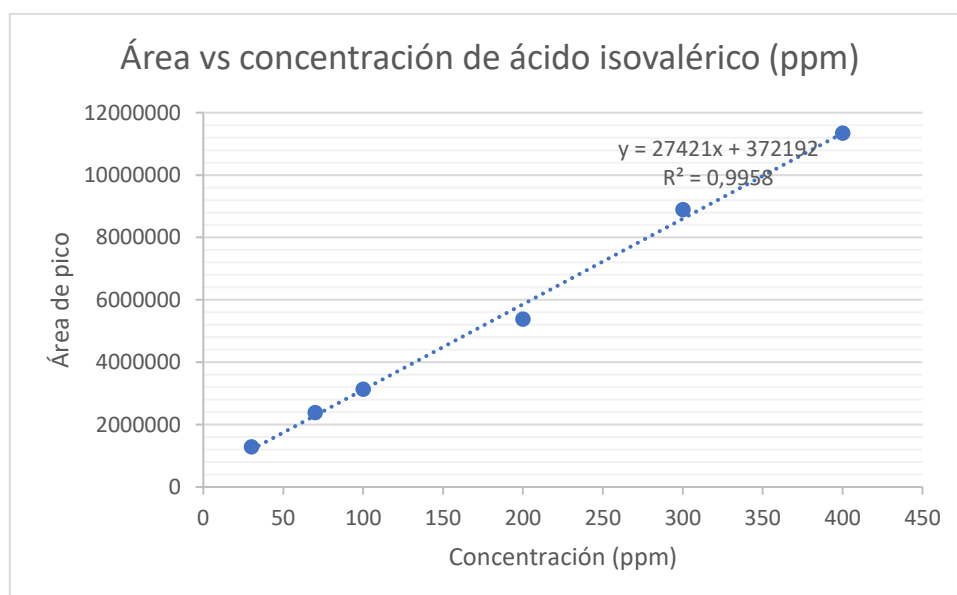


Tabla 20: Análisis estadístico ANOVA de un solo factor de la curva de calibración del ácido isovalérico.

---

Estadísticas de la regresión

---

Coeficiente de correlación múltiple	0,99788353
Coeficiente de determinación R <sup>2</sup>	0,99577154
R <sup>2</sup> ajustado	0,99471442
Error típico	288314,373
Observaciones	6

#### ANÁLISIS DE VARIANZA

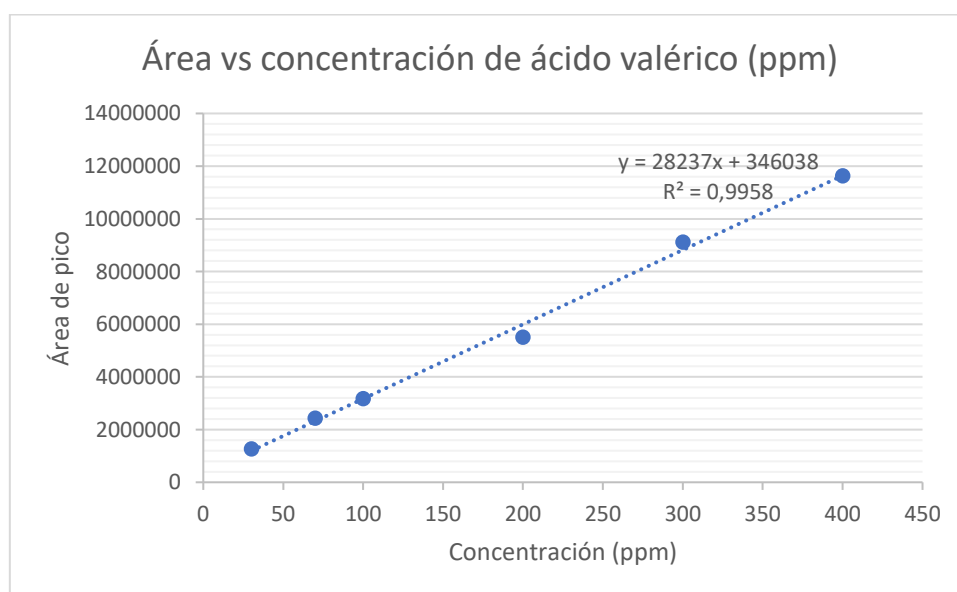
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	7,83E+13	7,83E+13	941,97	6,71E-06
Residuos	4	3,32E+11	8,31E+10		
Total	5	7,86E+13			

	Coeficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%	Inferior 95,0%	Superior 95,0%
Intercepción	372192,47	201704,01	1,84	0,14	-187827,62	932212,57	-187827,63	932212,57
ácido isovalérico	27421,43	893,45	30,69	6,71E-06	24940,804	29902,047	24940,80	29902,05

Tabla 21: Datos para la curva de calibración del de ácido valérico.

Concentración de ácido valérico (ppm)	Área
30	1268473
70	2435116
100	3176990
200	5505627
300	9121381
400	11629580

Gráfica 9: Curva de calibración estándar de ácido valérico.



**Tabla 22: Análisis estadístico ANOVA de un solo factor de la curva de calibración del ácido valérico.**

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coeficiente de correlación múltiple	0,99790477
Coeficiente de determinación R <sup>2</sup>	0,99581392
R <sup>2</sup> ajustado	0,9947674
Error típico	295393,847
Observaciones	6

**ANÁLISIS DE VARIANZA**

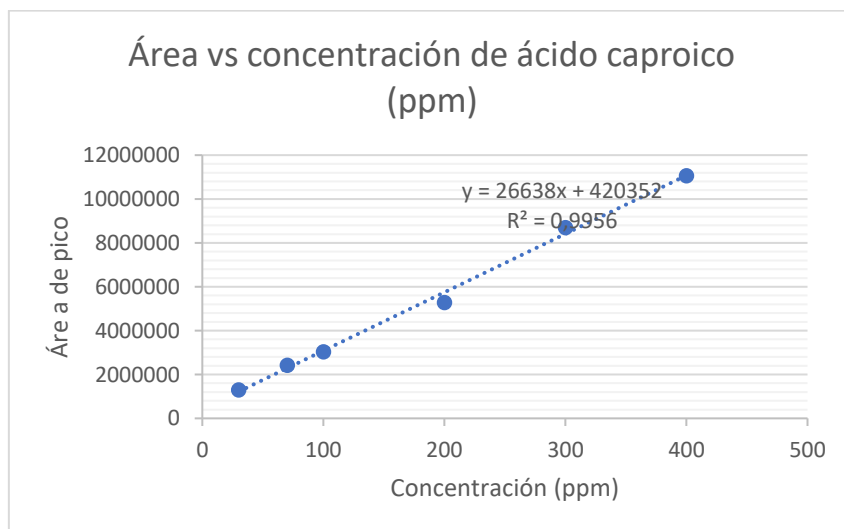
	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	8,30E+13	8,30E+13	951,55	6,58E-06
Residuos	4	3,49E+11	8,73E+10		
Total	5	8,34E+13			

	<i>Coeficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Intercepción	346037,70	206656,79	1,67	0,17	-227733,52	919808,93	-227733,52	919808,93
ácido valérico	28237,22	915,39	30,85	6,58E-06	25695,69	30778,75	25695,69	30778,75

**Tabla 23: Datos para la curva de calibración del de ácido caproico.**

<b>Concentración de ácido valérico (ppm)</b>	<b>Área</b>
30	1302698
70	2428903
100	3033174
200	5288981
300	8700261
400	11070172

**Gráfica 10: Curva de calibración estándar de ácido caproico.**





**Tabla 24: Análisis estadístico ANOVA de un solo factor de la curva de calibración del ácido caproico.**

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coeficiente de correlación múltiple	0,99781382
Coeficiente de determinación R <sup>2</sup>	0,99563243
R <sup>2</sup> ajustado	0,99454053
Error típico	284669,704
Observaciones	6

**ANÁLISIS DE VARIANZA**

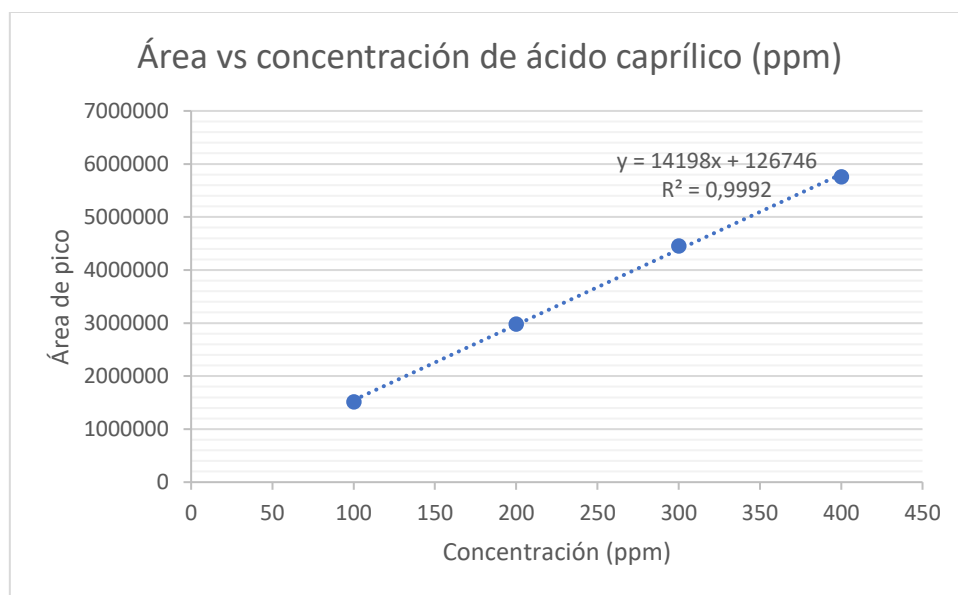
	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	7,39E+13	7,39E+13	911,84	7,16E-06
Residuos	4	3,24E+11	8,10E+10		
Total	5	7,42E+13			

	<i>Coeficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Intercepción ácido caproico	420351,57	199154,20	2,11	0,10	-132589,15	973292,29	-132589,15	973292,29
	26638,25	882,16	30,20	7,16E-06	24188,99	29087,517	24188,99	29087,52

**Tabla 25: Datos para la curva de calibración del de ácido caprílico.**

<b>Concentración de ácido caprílico (ppm)</b>	<b>Área</b>
100	1515396
200	2980778
300	4450971
400	5758078

**Gráfica 11: Curva de calibración estándar de ácido caprílico.**



**Tabla 26: Análisis estadístico ANOVA de un solo factor de la curva de calibración del ácido caprílico.**

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coeficiente de correlación múltiple	0,99961963
Coeficiente de determinación R <sup>2</sup>	0,99923941
R <sup>2</sup> ajustado	0,99885911
Error típico	61936,3142
Observaciones	4

**ANÁLISIS DE VARIANZA**

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	1,01E+13	1,01E+13	2627,53	0,00038
Residuos	2	7672214037	3836107018		
Total	3	1,09E+13			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Intercepción	126746	75856,18	1,67	0,24	-199636,81	453128,81	-199636,81	453128,81
ácido caprílico	14198,24	276,99	51,26	0,00038	13006,46	15390,02	13006,45	15390,02

**4.3 Análisis de resultados por etapas:**

En esta sección se analizan los resultados obtenidos en cada una de las etapas de separación y se consideran los análisis de caracterización realizados en cada caso:

En la tabla n.-1 se observan las principales características de los VFA's a separar y cuantificar en esta secuencia, cada uno de ellos posee valores de pKa bajos (alrededor de 4,8) indicativo de que en un rango de pH por debajo de estos valores, los VFA's permanecen en forma no disociada; también se observa que la presión de vapor de los VFA's decae notablemente a medida que se incrementa el peso molecular, siendo el ácido acético el de mayor volatilidad a una temperatura de 25°C, es decir que sería el ácido con más alta probabilidad de registrar ciertas pérdidas en la fase líquida en la que se encuentra; estas variables en particular son las que principalmente influyen en los resultados obtenidos en cada una de las etapas de separación de los fermentos [33].

Estos ácidos volátiles grasos se obtienen mediante fermentación anaeróbica controlado de residuos agroindustriales con microorganismos, que mediante una serie de reacciones descomponen las moléculas orgánicas de alto peso

molecular como la celulosa y hemicelulosa en moléculas más pequeñas, hasta degradar el sustrato a estos ácidos de cadena corta y media [34].

En la tabla n.-2 se observa el resultados del contenido de VFA's inicial que registran las muestras; que poseen distintos valores de pH para el proceso de fermentación, este parámetro influye directamente en la concentración obtenida al inicio de la secuencia de separación: las muestras fueron ajustadas a un pH controlado (alrededor de 7), no controlado (inferior a 5) y en medio ácido (entre 5 y 6) para analizar la producción de VFA's con la influencia de este factor; se observa una mayor producción de ácidos en las muestras cuyo pH no está controlado y aquel que se mantiene de manera controlada en rango ligeramente ácido, esto ocurre porque si el pH se encuentra lo más cercano al valor del pKa de cada uno de los ácidos, normalmente se encuentran con un bajo grado de disociación en medio acuoso.

La temperatura es otro factor que influye en la conservación de las muestras y estabilidad de los ácidos orgánicos respecto a su volatilidad, considerando su presión de vapor medida a 25°C, esta puede ser una fuente de pérdida si la temperatura es superior a 10°C, un valor promedio de temperatura en el cual la mayoría de las investigaciones realiza el almacenamiento de las diferentes corrientes de separación física previo a los análisis instrumentales que corresponden [35] [36], aunque en ciertos casos la temperatura suele ser más alta considerando aquella a la cual se realiza el proceso de fermentación inicial de la muestra (38 a 40 °C) [37].

En el proceso de filtración en prensa, que consiste en una remoción física por esfuerzo de presión de la fracción líquida de la muestra, quedando el componente sólido con menor cantidad de humedad, fue empleado como primera etapa de separación; es importante resaltar que se utilizó una prensa hidráulica semiindustrial con una pieza adaptable para la separación de los fermentos, puesto que no hay un equipo disponible que trabaje con una cantidad de muestra pequeña (menor a 500 g), por esa razón la pieza adaptable de menor volumen es la ideal para este caso, otros autores emplean prensas para vino cuya capacidad oscila entre 25 y 40 litros con una tela filtrante de algodón debido

a que emplean caudales mucho más grande de forma continua [31] [29], el material de construcción es de acero inoxidable para reducir pérdidas de los VFA's al causar corrosión en los materiales metálicos empleados, a pesar de que su concentración no sobrepasa los 2500 ppm en la muestra con mayor concentración total (cacao en pH controlado).

En la tabla n.-3 se observa la variación en los resultados de la centrifugación a 10000 RPM a una temperatura de 10°C, permitiendo la conservación de los VFA's a baja temperatura, las muestras cuyo pH es controlado tienen una menor concentración total de VFA's respecto a las que no tienen el pH controlado, debido a la capacidad de disociación de los ácidos cuyos valores sean inferiores a su respectivo pKa. Es importante resaltar que este proceso de separación de naturaleza física permite separar la fracción sólida de la líquida gracias a la fuerza centrífuga que genera el rotor del equipo y el tamaño de partícula que se logra sedimentar es de 0,65 u aproximadamente [21].

El porcentaje de recuperación hasta la etapa de centrifugación se detalla en la tabla n.-5, donde hay valores más altos en las muestras de pH controlado de café y banano; y los ácidos con mayor recuperación corresponden al acético y al butírico en esas muestras, que corresponden a los ácidos de cadena corta. Al comparar el contenido de VFA's iniciales respecto con lo obtenido en la centrifugación a 10000 RPM, se observa un incremento en la concentración de carboxilatos en el último caso considerando las condiciones de separación, en ciertas muestras conservan un mayor contenido de VFA's respecto a otras; esto se explica a continuación, considerando los factores que influyen en estas variaciones en los resultados:

- La mayoría de VFA's obtenidos tiene temperaturas de ebullición superiores al del agua (el rango oscila entre 117 a 206°C), pero se volatilizan a baja temperatura por efectos de sus presiones de vapor (entre 0,2 y 20,9 mmHg) y almacenamiento respectivo a temperatura ambiente; una ligera variación en este parámetro puede incrementar considerablemente las pérdidas por volatilización. [38]
- La naturaleza de los ácidos volátiles grasos puede afectar su solubilidad en agua: a mayor peso molecular mayor estabilidad

respecto al grupo no polar de la molécula, lo que reduciría parcialmente su capacidad para disolverse en agua, como ocurre con los ácidos hexanoico y octanoico.

- El tamaño de partícula que permanece en la fracción sólida es aproximadamente superior a 0,65 micras (el equivalente a 10000 RPM) lo que permite que cierta concentración de VFA's se adsorban en la superficie del sólido por efecto del incremento de pH, la temperatura y la naturaleza orgánica del sólido con alto contenido de carbono.
- La falta de homogenización adecuada del filtrado de la primera etapa para asegurar que la composición sea prácticamente la misma en la replicas desarrolladas y no exista variación significativa.
- Pérdidas al trasvasar los filtrados con ayuda de una jeringa, podría arrastrar una pequeña porción de sólidos del precipitado, lo que explicaría porque la concentración de VFA's aumenta en ciertas muestras.
- Cantidad de muestra inyectadas al cromatógrafo que pueden afectar la resolución de la columna debido a contaminación de los liners e inyectores, a mayor cantidad de muestras mayor rapidez de ensuciamiento porque persiste el contenido de sólidos disueltos debido al color que adquiere la muestra una vez que pasa por el microfiltro de 0,45 micras; al cambiar una determinada pieza de la columna, es necesario correr nuevamente el método para ajustar las condiciones iniciales de operación del equipo.

En las tablas 6 y 7 se detallan la concentración y el porcentaje de recuperación respectivamente tras un proceso de ultrafiltración, el cual muestra ciertas variaciones importantes en la composición de las muestras, especialmente en el contenido de ácidos de cadena media (isovalérico, valérico y octanoico); esto puede haber ocurrido por una conservación incorrecta de las muestras y posterior degradación de los ácidos de cadena corta que se mantienen en los tubos empleados en la centrifugación en contacto con la fracción sólida que aun contiene parte del inóculo bacteriano agregado y esto puede producir cierta elongación de cadena para los ácidos anteriormente mencionados, los cuales tienen mayor concentración respecto a los obtenidos en la centrifugación; el

tiempo de contacto de las fracciones líquidas con los precipitados fue superior a una semana, lo que provocaría dicho efecto [5]. La membrana empleada en este caso del tipo Trisep, tiene una estructura constituida por el polímero polifluoruro de vinilo, que le permite mantener un tamaño de poro de 0,03 micras y una película hidrofóbica en la parte superior para dar paso solo de la fase líquida de la muestra, empleando presiones de vacío de entre 0,25 y 0,3 inHg [31], esta membrana tiene excelente desempeño para la separación de ácidos débiles como los VFA's en medio acuoso, sin que ocurra una reacción no deseada en la película polimérica de la membrana y tampoco se vería afectada por el pH, puesto que puede trabajar en un rango de 2 a 11.

Los valores de las curvas de calibración se ajustan bien a una correlación lineal, los valores de  $R^2$  se mantienen por encima de 0,99; a pesar de solo emplear 5 puntos en cada estándar de calibración, excepto en el caso del ácido octanoico el cual solo cuenta con 4 puntos en la curva, debido al manejo de volúmenes muy pequeños para preparar la curva de calibración en viales de 1,5 mL y al tener una solubilidad mucho más baja en agua, se complicó su preparación. El último punto de la solución madre que corresponde a 500 ppm fue eliminado de la curva por generar una desviación más pronunciada respecto a la linealidad y de esta forma se mejoró la resolución y el coeficiente de correlación  $R^2$ . Al desarrollar el análisis ANOVA de cada una de las curvas detalladas en las tablas desde la 13 hasta la 26 se observa que el valor de probabilidad de la última sección de cada una de las tablas es menor al 5% y por tanto existe una correlación lineal para cada curva de calibración, también que el valor estadístico de probabilidad tanto para las pendientes como para el intercepto cumplen con el criterio de mantenerse por debajo del 5% de significancia y de esta manera obtener valores distintos de cero.

Entre las fuentes de error detectadas en las etapas experimentales y en los ensayos de caracterización tenemos los siguientes:

- Problemas para medir los volúmenes y densidades de cada filtrado de los fermentos puesto que el color de las muestras es oscuro y es complicado observar con precisión el valor correcto de la medida.

- La conservación adecuada de estándares y muestras en refrigeración requiere de un control exhaustivo de la temperatura y puede haber ocurrido alguna variación de voltaje en el equipo que haya provocado ciertas pérdidas por volatilización.
- En el tratamiento con la ultrafiltración se requerían de largos tiempos (alrededor de 20 a 30 min) para lograr la filtración de volúmenes de entre 2 a 3 mL de las muestras, puesto que el tamaño de poro de la membrana es muy pequeño y requiere de presiones de vacío muy elevadas para la separación. previas al análisis con el cromatógrafo, algunas de ellas presentaban cierta dificultad para la filtración a 0,45 micras en las jeringas causando pérdidas en volumen necesarias para el análisis.
- Al preparar las diluciones para la curva de calibración, partiendo de una solución madre de 500 ppm, surgieron problemas con el manejo de los volúmenes en micropipetas de 2 a 10 uL, y al ser preparados en viales de 1,5 mL, el sesgo de error aumenta al manejar volúmenes más pequeños, también puede influir la calibración de la micropipeta en el rango empleado.
- Los volúmenes empleados en la etapa de ultrafiltración son cada vez más pequeños (oscilan entre 2 y 3 mL) comparada con la etapa de separación en filtro prensa, por lo que se incrementan las pérdidas al medir la fracción líquida del filtrado y trasvasarla a la membrana.

Las limitaciones de la metodología aplicada radican en ciertas complicaciones para el desarrollo de la fase experimental, las cuales se detallan a continuación:

- Disponibilidad de la prensa hidráulica ubica en otro laboratorio mucho más lejano respecto al que se guardan las muestras, al no mantener una refrigeración y aislamiento adecuado de las muestras pudieron provocar ciertas pérdidas con el cambio de temperatura.
- Problemas con el ajuste de temperatura en la centrífuga a 10000 RPM para realizar este proceso a 10°C y por cuestiones de configuración del equipo, la temperatura se mantenía alrededor de 20°C, lo que también provoca cambios en la composición de los filtrados.
- La preparación de los estándares en la curva de calibración se realizó directamente en los viales de 1,5 mL debido a que no se cuenta con

suficiente cantidad de estas sustancias de referencia y los volúmenes empleados son de uL.

- Manipulación de las membranas de ultrafiltración del tipo plana, que se tuvieron que recortar para adaptarse a la forma del soporte circular para filtrar, pudiendo provocar pequeños cortes en la superficie polimérica al manejarlas con una pinza.
- Dificultades en la manipulación en el filtrado obtenido en la centrifugación, al trasvasar con una jeringa para colocarlo en la membrana de ultrafiltración se pudo arrastrar cierta cantidad de sólidos del precipitado, que pudo provocar cierta contaminación en el contenido de VFA's, esta puede ser la razón por la cual las concentraciones en algunas de las muestras supera el 100% de recuperación.
- Cantidad de muestra requerida para aplicar una extracción con solventes como etapa adicional al proceso principal, depende específicamente de la etapa de ultrafiltración donde se registraron varias pérdidas por trasvase en los materiales empleados y lo que quedaba en la superficie de la membrana.
- Las altas presiones de vacío necesarias para la separación en ultrafiltración establecían rangos de tiempo entre los 20 y 45 minutos para filtrar alrededor de 2 mL de muestra, lo que conlleva a obtener pocas cantidades de filtrado para la siguiente etapa.



# Capítulo 5

## 5 Conclusiones:

### 5.1 Conclusiones

- Se desarrolló una secuencia experimental de laboratorio para la separación y cuantificación de carboxilatos en muestras de fermentos agroindustriales de cáscara y pulpa de banano, cáscara de café y mucílago de cacao; considerando un proceso en cascada en base a operaciones de separación física, las cuales consisten en: Filtración mecánica con prensa hidráulica, centrifugación a 10000 RPM, y ultrafiltración con membrana; lo que permitió una separación mucho más optima de la fracción líquida de las muestras y por ende un mayor porcentaje de recuperación como se detalla en las tablas 8 y 10, lo que permite obtener un filtrado con menor cantidad de sólidos suspendidos, más clarificado, permitiendo una mejor resolución en los cromatogramas, evitando de esta manera el rápido ensuciamiento de componentes sensibles en la columna como el liner o los inyectores.
- Se determinaron las condiciones óptimas de separación física de los residuos agroindustriales obtenidos mediante pruebas experimentales desarrolladas, estableciendo las siguientes condiciones de separación para la fase líquida de los fermentos: temperatura de 10°C, aislamiento de la luz en frascos ámbar, uso de centrifugación a 10000 RPM y dilución al 50% con agua tipo 1, previo al análisis en el cromatógrafo, de esta forma las concentraciones obtenidas de los VFA's no superan el valor máximo de la curva de calibración empleada (rango de 100 a 400 ppm), para el caso de los ácidos de mayor producción obtenidos: ácido acético, butírico e isobutírico, además de la reducción en el uso de grandes cantidades de volumen de muestra. El análisis ANOVA muestra que las curvas de calibración obtenidas para cada ácido orgánico tienen una correlación con alto grado de linealidad, con pendientes e interceptos diferentes de cero, lo que permite asegurar que los resultados se han obtenido con un 95% de confiabilidad.
- Se calculó el porcentaje de recuperación de VFA's detallados para cada etapa en las tablas 5, 7 y 10 para cada residuo respecto a las etapas

evaluadas experimentalmente, en donde se concluye que el pH influye significativamente en la cantidad de VFA's obtenidos; el mayor porcentaje de recuperación se logra con una separación a 10000 RPM que equivale a filtración para obtener un tamaño de partícula de 0,65  $\mu$  y una temperatura de 10°C, esto reduce las pérdidas por volatilidad de los carboxilatos especialmente los de cadena corta como los ácidos acético y butírico.

- La evaluación del potencial de biogás de cada fracción sólida que se obtiene del proceso en cascada propuesto requiere de condiciones que deben ser estudiadas posteriormente, considerando la materia seca obtenida en cada etapa. Algunos autores consideran como Fu et al, 2018 y Rocamora et al, 2020, indican que el contenido de sólidos totales se debe mantener entre 30 y 35% volátiles y materia seca, así como el pH y la relación C/N necesitan incluirse dentro de un rango de valores específicos para que se pueda aplicar una digestión anaeróbica seca. En este caso particular de tratamiento se necesita mantener entre 15 a 30% de humedad en las corrientes sólidas y reactivar en este caso los metanógenos previamente. La limitante para desarrollar este ensayo radica en la cantidad de muestra necesaria para la digestión anaeróbica en seco y el equipo empleado para su determinación, el cual emplea 200 g de muestra como mínimo [39] [40] [41].

## **5.2 Recomendaciones:**

- Para mejorar la metodología de conservación de la muestra se requiere el empleo de un dispositivo a baja temperatura o de una mezcla frigorífica dentro de una hielera para mantener cada fermento en un rango de temperaturas de 4 a 10°C, desde que sale del equipo hasta que se lo guarda en refrigeración.
- Considerar un mayor volumen de muestra a emplearse en la centrifugación el efecto de los sólidos disueltos previo a la filtración en jeringa para la cromatografía, la tonalidad de cada muestra es indicativo de la presencia de estos componentes que pueden afectar la resolución de la columna.

- Se recomienda explorar otras metodologías de separación y asilamiento de los VFA's como la adsorción en resinas de intercambio iónico con sus respectivas isothermas a temperatura ambiente, al trabajar con ácidos débiles es posible una separación más efectiva si las concentraciones son menores a la cantidad máxima de eq/g de la resina. También se puede incluir procesos del tipo químico como una derivatización en medio ácido para estabilizar los ácidos en forma de sales de carboxilatos a temperatura ambiente.
- Respecto a la aplicación de procesos de extracción líquido – líquido, se recomienda trabajar con cantidades de muestras superiores a 50 mL para evitar pérdidas al separar las dos fases, también el solvente a emplear debe ser seleccionado cuidadosamente para obtener el mayor porcentaje de recuperación de los ácidos carboxílicos, como ocurre en el caso del alcohol oleílico que presenta una mayor recuperación de ácidos de cadena media (hexanoico y octanoico). [29]

### 5.3 Bibliografía:

- [1] M. A. Riera, S. Maldonado, and R. Palma, "RESIDUOS AGROINDUSTRIALES GENERADOS EN ECUADOR PARA LA ELABORACIÓN DE BIOPLÁSTICOS," *Revista Ingeniería Industrial*, vol. 17, no. 3, pp. 227–246, Jan. 2019, doi: 10.22320/S07179103/2018.13.
- [2] G. DE Lasso Mendoza MINISTRO AGRICULTURA Y GANADERÍA Bernardo Manzano Díaz, D. DE ANÁLISIS DE, F. Y. COBA PAZ EQUIPO TÉCNICO Víctor Lema Collaguazo Daniela García Díaz DISEÑO REDACCIÓN, and T. Barba Cuenca Kléber Bastidas Tene Mónica Heredia Villamarín, "PRESIDENTE DE LA REPÚBLICA COORDINADORA GENERAL DE INFORMACIÓN NACIONAL AGROPECUARIA Ángela Vásconez Vásconez." [Online]. Available: [www.agricultura.gob.ec](http://www.agricultura.gob.ec)
- [3] G. DE Lasso Mendoza MINISTRO AGRICULTURA Y GANADERÍA Bernardo Manzano Díaz, D. DE ANÁLISIS DE, F. Y. COBA PAZ EQUIPO TÉCNICO Víctor Lema Collaguazo Daniela García Díaz DISEÑO REDACCIÓN, and T. Barba Cuenca Kléber Bastidas Tene Mónica Heredia Villamarín, "PRESIDENTE DE LA REPÚBLICA COORDINADORA GENERAL DE INFORMACIÓN NACIONAL AGROPECUARIA Ángela Vásconez Vásconez." [Online]. Available: [www.agricultura.gob.ec](http://www.agricultura.gob.ec)
- [4] "Libro-Blanco-final-web\_mayo102021".

- [5] H. Sträuber, F. Bühligen, S. Kleinsteuber, and M. Dittrich-Zechendorf, "Carboxylic acid production from ensiled crops in anaerobic solid-state fermentation - trace elements as pH controlling agents support microbial chain elongation with lactic acid," *Eng Life Sci*, vol. 18, no. 7, pp. 447–458, Jul. 2018, doi: 10.1002/elsc.201700186.
- [6] R. Martínez, P. Torres, M. A. Meneses, J. G. Figueroa, J. A. Pérez-Álvarez, and M. Viuda-Martos, "Chemical, technological and in vitro antioxidant properties of cocoa (*Theobroma cacao* L.) co-products," *Food Research International*, vol. 49, no. 1, pp. 39–45, Nov. 2012, doi: 10.1016/j.foodres.2012.08.005.
- [7] B. Anhwange, J. T. Ugye, and T. D. Nyiatagher, "Chemical Composition of *Musa sapientum* (Banana) Peels." [Online]. Available: <https://www.researchgate.net/publication/233760453>
- [8] K. Wang, J. Yin, D. Shen, and N. Li, "Anaerobic digestion of food waste for volatile fatty acids (VFAs) production with different types of inoculum: Effect of pH," *Bioresour Technol*, vol. 161, pp. 395–401, Jun. 2014, doi: 10.1016/J.BIORTECH.2014.03.088.
- [9] S. C. McDowall, M. Braune, and R. Nitzsche, "Recovery of bio-based medium-chain fatty acids with membrane filtration," *Sep Purif Technol*, vol. 286, Apr. 2022, doi: 10.1016/j.seppur.2021.120430.
- [10] S. C. McDowall, M. Braune, and R. Nitzsche, "Recovery of bio-based medium-chain fatty acids with membrane filtration," *Sep Purif Technol*, vol. 286, Apr. 2022, doi: 10.1016/j.seppur.2021.120430.
- [11] P. R. Yaashikaa, P. Senthil Kumar, and S. Varjani, "Valorization of agro-industrial wastes for biorefinery process and circular bioeconomy: A critical review," *Bioresour Technol*, vol. 343, Jan. 2022, doi: 10.1016/j.biortech.2021.126126.
- [12] G. Strazzer, F. Battista, N. H. Garcia, N. Frison, and D. Bolzonella, "Volatile fatty acids production from food wastes for biorefinery platforms: A review," *J Environ Manage*, vol. 226, pp. 278–288, Nov. 2018, doi: 10.1016/j.jenvman.2018.08.039.
- [13] M. K. Awasthi *et al.*, "Agricultural waste biorefinery development towards circular bioeconomy," *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 158, Apr. 2022, doi: 10.1016/j.rser.2022.112122.
- [14] J. F. Velasco-Muñoz, J. M. F. Mendoza, J. A. Aznar-Sánchez, and A. Gallego-Schmid, "Circular economy implementation in the agricultural sector: Definition, strategies and indicators," *Resour Conserv Recycl*, vol. 170, Jul. 2021, doi: 10.1016/j.resconrec.2021.105618.
- [15] C. Nzeteu, F. Coelho, E. Davis, A. Trego, and V. O'Flaherty, "Current Trends in Biological Valorization of Waste-Derived Biomass: The Critical Role of VFAs to Fuel A Biorefinery," *Fermentation*, vol. 8, no. 9. MDPI, Sep. 01, 2022. doi: 10.3390/fermentation8090445.
- [16] M. Gallego-García, A. D. Moreno, P. Manzanares, M. J. Negro, and A. Duque, "Recent advances on physical technologies for the pretreatment of food waste and lignocellulosic residues," *Bioresour Technol*, vol. 369. Elsevier Ltd, Feb. 01, 2023. doi: 10.1016/j.biortech.2022.128397.

- [17] E. H. Arruda, R. A. P. B. Melatto, W. Levy, and D. de M. Conti, "Circular economy: A brief literature review (2015–2020)," *Sustainable Operations and Computers*, vol. 2, pp. 79–86, Jan. 2021, doi: 10.1016/j.susoc.2021.05.001.
- [18] R. Kapoor *et al.*, "Valorization of agricultural waste for biogas based circular economy in India: A research outlook," *Bioresource Technology*, vol. 304. Elsevier Ltd, May 01, 2020. doi: 10.1016/j.biortech.2020.123036.
- [19] F. Garces Daza, F. Hartz, A. Born, and E. Boles, "An optimized reverse  $\beta$ -oxidation pathway to produce selected medium-chain fatty acids in *Saccharomyces cerevisiae*," *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, vol. 16, no. 1, Dec. 2023, doi: 10.1186/s13068-023-02317-z.
- [20] H. Sträuber, F. Bühligen, S. Kleinsteuber, M. Nikolausz, and K. Porsch, "Improved anaerobic fermentation of wheat straw by alkaline pre-treatment and addition of alkali-tolerant microorganisms," *Bioengineering*, vol. 2, no. 2, pp. 66–93, Jun. 2015, doi: 10.3390/bioengineering2020066.
- [21] C. Fernando-Foncillas, C. I. Cabrera-Rodríguez, F. Caparrós-Salvador, C. Varrone, and A. J. J. Straathof, "Highly selective recovery of medium chain carboxylates from co-fermented organic wastes using anion exchange with carbon dioxide expanded methanol desorption," *Bioresour Technol*, vol. 319, Jan. 2021, doi: 10.1016/j.biortech.2020.124178.
- [22] S. Palakawong Na Ayudthaya, A. H. P. Van De Weijer, A. H. Van Gelder, A. J. M. Stams, W. M. De Vos, and C. M. Plugge, "Organic acid production from potato starch waste fermentation by rumen microbial communities from Dutch and Thai dairy cows," *Biotechnol Biofuels*, vol. 11, no. 1, Jan. 2018, doi: 10.1186/s13068-018-1012-4.
- [23] P. K. Sath, S. Duhan, and J. S. Duhan, "Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review," *Bioresources and Bioprocessing*, vol. 5, no. 1. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, Dec. 01, 2018. doi: 10.1186/s40643-017-0187-z.
- [24] E. Righetti, S. Nortilli, F. Fatone, N. Frison, and D. Bolzonella, "A Multiproduct Biorefinery Approach for the Production of Hydrogen, Methane and Volatile Fatty Acids from Agricultural Waste," *Waste Biomass Valorization*, vol. 11, no. 10, pp. 5239–5246, Oct. 2020, doi: 10.1007/s12649-020-01023-3.
- [25] A. Anukam, A. Mohammadi, M. Naqvi, and K. Granström, "A review of the chemistry of anaerobic digestion: Methods of accelerating and optimizing process efficiency," *Processes*, vol. 7, no. 8. MDPI AG, pp. 1–19, Aug. 01, 2019. doi: 10.3390/PR7080504.
- [26] A. Neri, B. Bernardi, G. Zimbalatti, and S. Benalia, "An Overview of Anaerobic Digestion of Agricultural By-Products and Food Waste for Biomethane Production," *Energies*, vol. 16, no. 19. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), Oct. 01, 2023. doi: 10.3390/en16196851.
- [27] G. Merlin and H. Boileau, "ANAEROBIC DIGESTION OF AGRICULTURAL WASTE: STATE OF THE ART AND FUTURE TRENDS." [Online]. Available: <http://www.environment-agency.gov.uk/business/sectors/32601.aspx>

- [28] P. Sukphun, S. Sittijunda, and A. Reungsang, "Volatile fatty acid production from organic waste with the emphasis on membrane-based recovery," *Fermentation*, vol. 7, no. 3. MDPI, Sep. 01, 2021. doi: 10.3390/FERMENTATION7030159.
- [29] M. Braune, B. Yuan, H. Sträuber, S. C. McDowall, R. Nitzsche, and A. Gröngröft, "A Downstream Processing Cascade for Separation of Caproic and Caprylic Acid from Maize Silage-Based Fermentation Broth," *Front Bioeng Biotechnol*, vol. 9, Aug. 2021, doi: 10.3389/fbioe.2021.725578.
- [30] R. J. Jones, J. Massanet-Nicolau, R. Fernandez–Feito, R. M. Dinsdale, and A. J. Guwy, "Fermentative volatile fatty acid production and recovery from grass using a novel combination of solids separation, pervaporation, and electro dialysis technologies," *Bioresour Technol*, vol. 342, Dec. 2021, doi: 10.1016/j.biortech.2021.125926.
- [31] P. Sukphun, S. Sittijunda, and A. Reungsang, "Volatile fatty acid production from organic waste with the emphasis on membrane-based recovery," *Fermentation*, vol. 7, no. 3. MDPI, Sep. 01, 2021. doi: 10.3390/FERMENTATION7030159.
- [32] A. Anukam, A. Mohammadi, M. Naqvi, and K. Granström, "A review of the chemistry of anaerobic digestion: Methods of accelerating and optimizing process efficiency," *Processes*, vol. 7, no. 8. MDPI AG, pp. 1–19, Aug. 01, 2019. doi: 10.3390/PR7080504.
- [33] F. Rizzioli, F. Battista, D. Bolzonella, and N. Frison, "Volatile Fatty Acid Recovery from Anaerobic Fermentate: Focusing on Adsorption and Desorption Performances," *Ind Eng Chem Res*, vol. 60, no. 37, pp. 13701–13709, Sep. 2021, doi: 10.1021/acs.iecr.1c03280.
- [34] Z. Wang, Y. Hu, S. Wang, G. Wu, and X. Zhan, "A critical review on dry anaerobic digestion of organic waste: Characteristics, operational conditions, and improvement strategies," *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 176. Elsevier Ltd, Apr. 01, 2023. doi: 10.1016/j.rser.2023.113208.
- [35] M. Atasoy and Z. Cetecioglu, "Butyric acid dominant volatile fatty acids production: Bio-Augmentation of mixed culture fermentation by *Clostridium butyricum*," *J Environ Chem Eng*, vol. 8, no. 6, Dec. 2020, doi: 10.1016/j.jece.2020.104496.
- [36] C. S. López-Garzón and A. J. J. Straathof, "Recovery of carboxylic acids produced by fermentation," *Biotechnology Advances*, vol. 32, no. 5. Elsevier Inc., pp. 873–904, 2014. doi: 10.1016/j.biotechadv.2014.04.002.
- [37] M. Atasoy and Z. Cetecioglu, "The effects of pH on the production of volatile fatty acids and microbial dynamics in long-term reactor operation," *J Environ Manage*, vol. 319, Oct. 2022, doi: 10.1016/j.jenvman.2022.115700.
- [38] K. Szacherska, P. Oleskowicz-Popiel, S. Ciesielski, and J. Mozejko-Ciesielska, "Volatile fatty acids as carbon sources for polyhydroxyalkanoates production," *Polymers*, vol. 13, no. 3. MDPI AG, pp. 1–21, Feb. 01, 2021. doi: 10.3390/polym13030321.
- [39] I. Rocamora, S. T. Wagland, R. Villa, E. W. Simpson, O. Fernández, and Y. Bajón-Fernández, "Dry anaerobic digestion of organic waste: A review of operational parameters and their impact on process performance," *Bioresource*

*Technology*, vol. 299. Elsevier Ltd, Mar. 01, 2020. doi:  
10.1016/j.biortech.2019.122681.

- [40] Y. Fu, T. Luo, Z. Mei, J. Li, K. Qiu, and Y. Ge, "Dry anaerobic digestion technologies for agricultural straw and acceptability in China," *Sustainability (Switzerland)*, vol. 10, no. 12, Dec. 2018, doi: 10.3390/su10124588.
- [41] C. Vahlberg, E. Nordell, L. Wiberg, and A. Schnürer, "Method for correction of VFA loss in determination of dry matter in biomass (Metod för korrigerering av VFA-förlust vid bestämning av torrhalt i biomassa) SGC Rapport 2013:273 'Catalyzing energygas development for sustainable solutions.'" [Online]. Available: [www.sgc.se](http://www.sgc.se)

## **Anexos:**

### **1. Fórmulas empleadas en las tablas de resultados:**

#### **a) Cálculo de ST, SVT y SFT:**

$$ST = \frac{m2 - m0}{m1 - m0}$$

Donde m0 es la masa del crisol seco, m1 es la masa de crisol con la muestra y m2 es la masa de crisol con la muestra secada a 105°C por 8 horas.

$$SFT = \frac{m3 - m0}{m1 - m0}$$

Donde m0 es la masa del crisol seco, m1 es la masa de crisol con la muestra y m3 es la masa de crisol con la muestra calcinada a 550°C por 2 horas.

$$SVT = ST - SFT$$

Donde SVT son los sólidos volátiles totales, ST los sólidos totales y SFT los sólidos fijos totales.

#### **b) Cálculo de densidad:**

$$\rho = \frac{m}{V}$$

Donde m es la masa de la muestra y V es el volumen que ocupa.

#### **c) Cálculo de recuperación de VFA's (%):**

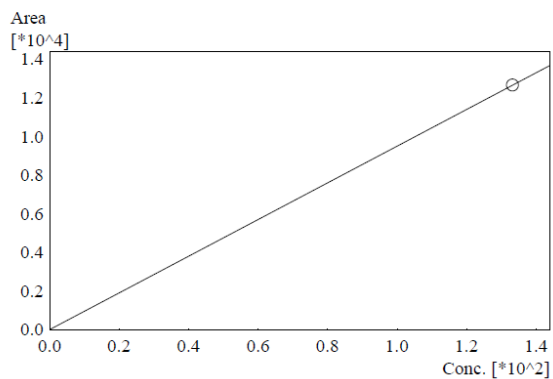
$$\% R = \frac{VFA's\ iniciales}{VFA's\ etapa} \times 100$$

Donde VFA's iniciales es la concentración en ppm de los ácidos volátiles iniciales en los fermentos y VFA's etapa es la concentración de los ácidos en ppm en la fracción líquida separada de cada etapa.



## 2. Curvas de calibración para el biogás:

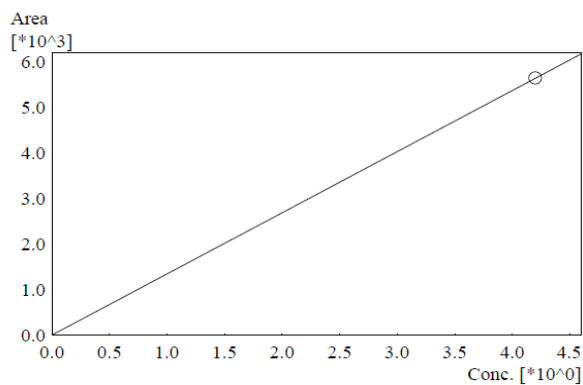
ID# : 1  
 Name : Composite Peak  
 Quantitative Method : External Standard  
 Function : f(x)=Point to Point  
 Rr1=1.000000 Rr2=1.000000  
 MeanRF: 9.498307e+001 RFSD: 6.950719e-001 RFRSD: 0.731785  
 FitType : Point to Point  
 ZeroThrough : Through  
 Weighted Regression : None  
 Detector Name : PTCD1



#	Conc.(Ratio)	MeanArea	Area
1	133.2	12652	12753
			12623
			12693
			12538

### Anexo 1: Curva de calibración mezcla estándar.

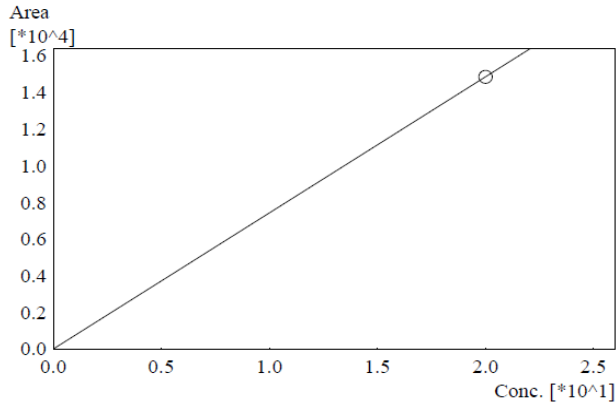
ID# : 2  
 Name : Methane (CH<sub>4</sub>)  
 Quantitative Method : External Standard  
 Function : f(x)=Point to Point  
 Rr1=1.000000 Rr2=1.000000  
 MeanRF: 1.343508e+003 RFSD: 3.544227e+001 RFRSD: 2.638039  
 FitType : Point to Point  
 ZeroThrough : Through  
 Weighted Regression : None  
 Detector Name : PTCD1



#	Conc.(Ratio)	MeanArea	Area
1	4.2	5643	5694
			5488
			5826
			5563

### Anexo 2: Curva de calibración estándar metano.

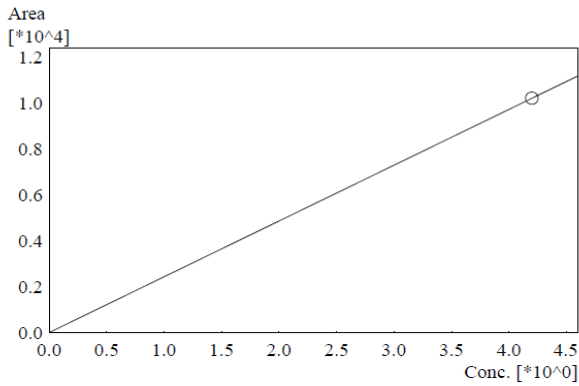
ID# : 3  
 Name : Carbon dioxide (CO2)  
 Quantitative Method : External Standard  
 Function : f(x)=Point to Point  
 Rr1=1.000000 Rr2=1.000000  
 MeanRF: 7.419879e+002 RFSD: 1.037699e+001 RFRSD: 1.398539  
 FitType : Point to Point  
 ZeroThrough : Through  
 Weighted Regression : None  
 Detector Name : PTC1



#	Conc.(Ratio)	MeanArea	Area
1	20	14840	14994
			14630
			15040
			14695

### Anexo 3: Curva de calibración gas carbónico.

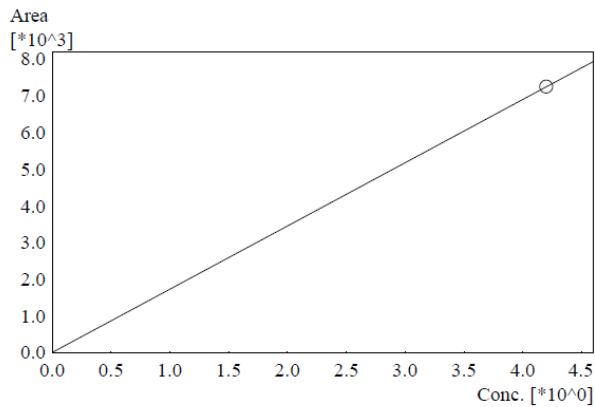
ID# : 4  
 Name : Ethylene (C2H4)  
 Quantitative Method : External Standard  
 Function : f(x)=Point to Point  
 Rr1=1.000000 Rr2=1.000000  
 MeanRF: 2.431491e+003 RFSD: 2.954769e+001 RFRSD: 1.215209  
 FitType : Point to Point  
 ZeroThrough : Through  
 Weighted Regression : None  
 Detector Name : PTC1



#	Conc.(Ratio)	MeanArea	Area
1	4.2	10212	10274
			10079
			10353
			10143

### Anexo 4: Curva de calibración etileno.

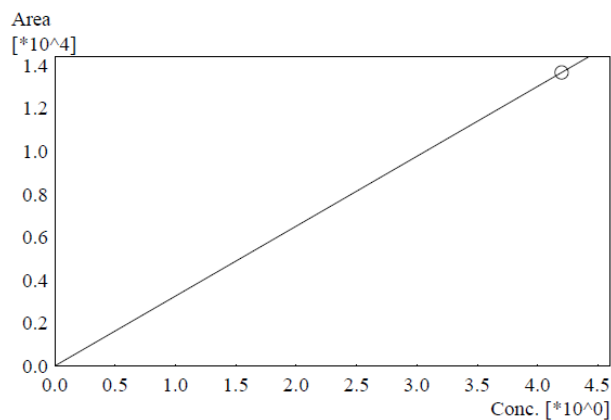
ID# : 5  
 Name : Acetylene (C2H2)  
 Quantitative Method : External Standard  
 Function : f(x)=Point to Point  
 Rr1=1.000000 Rr2=1.000000  
 MeanRF: 1.725407e+003 RFSD: 3.631370e+001 RFRSD: 2.104646  
 FitType : Point to Point  
 ZeroThrough : Through  
 Weighted Regression : None  
 Detector Name : PTCDD1



#	Conc.(Ratio)	MeanArea	Area
1	4.2	7247	7313
			7104
			7430
			7140

### Anexo 5: Curva de calibración acetileno.

ID# : 6  
 Name : Ethane (C2H6)  
 Quantitative Method : External Standard  
 Function : f(x)=Point to Point  
 Rr1=1.000000 Rr2=1.000000  
 MeanRF: 3.252061e+003 RFSD: 2.757634e+001 RFRSD: 0.847965  
 FitType : Point to Point  
 ZeroThrough : Through  
 Weighted Regression : None  
 Detector Name : PTCDD1

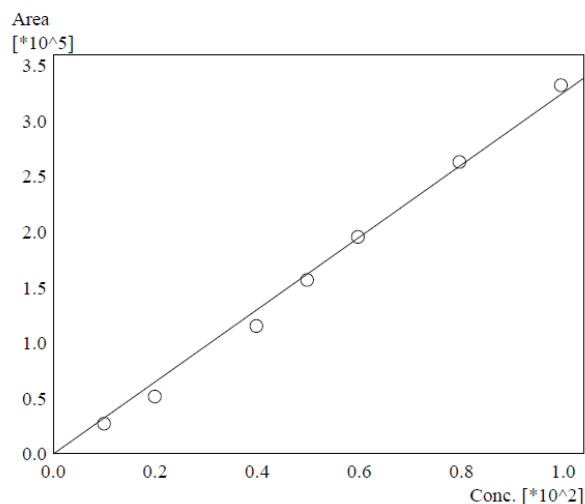


#	Conc.(Ratio)	MeanArea	Area
1	4.2	13659	13561
			13559
			13731
			13783

### Anexo 6: Curva de calibración etano.

### Curva de calibración VFA's:

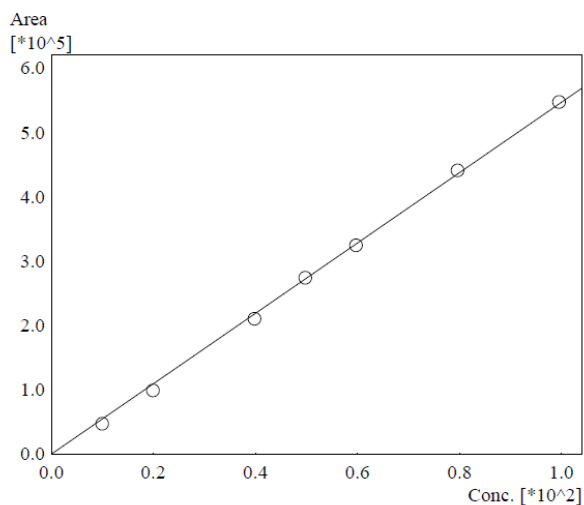
ID# : 1  
 Name : Acetic Acid  
 Quantitative Method : External Standard  
 Function :  $f(x)=3258.83*x+0$   
 Rr1=0.9990396 Rr2=0.9980801 RSS=5.115563e+008  
 MeanRF: 3.042405e+003 RFSD: 3.000620e+002 RFRSD: 9.862659  
 FitType : Linear  
 ZeroThrough : Through  
 Weighted Regression : None  
 Detector Name : FID1



#	Conc.(Ratio)	MeanArea	Area
1	9.95	27127	27127
2	19.9	51728	51728
3	39.8	115374	115374
4	49.75	156855	156855
5	59.7	195505	195505
6	79.6	263145	263145
7	99.5	332209	332209

### Anexo 7: Curva de calibración ácido acético.

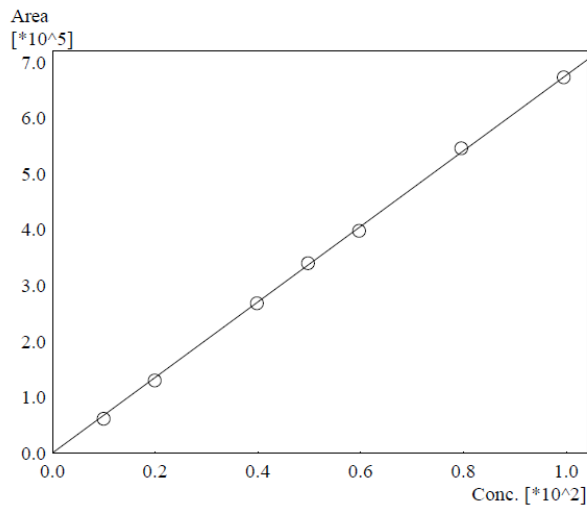
ID# : 2  
 Name : Propionic Acid  
 Quantitative Method : External Standard  
 Function :  $f(x)=5467.34*x+0$   
 Rr1=0.9998457 Rr2=0.9996915 RSS=2.545284e+008  
 MeanRF: 5.273434e+003 RFSD: 3.120171e+002 RFRSD: 5.916772  
 FitType : Linear  
 ZeroThrough : Through  
 Weighted Regression : None  
 Detector Name : FID1



#	Conc.(Ratio)	MeanArea	Area
1	9.95	47039	47039
2	19.9	98740	98740
3	39.8	209968	209968
4	49.75	273797	273797
5	59.7	323783	323783
6	79.6	440150	440150
7	99.5	546514	546514

### Anexo 8: Curva de calibración ácido propiónico.

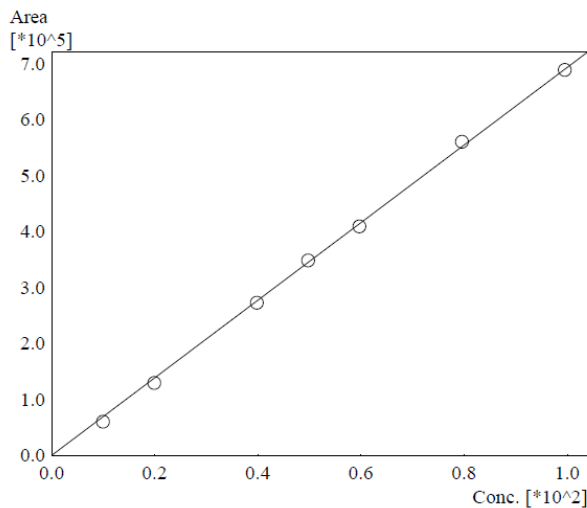
ID# : 3  
 Name : Iso-butyric Acid  
 Quantitative Method : External Standard  
 Function :  $f(x)=6772.06*x+0$   
 Rr1=0.9998147 Rr2=0.9996293 RSS=1.710334e+008  
 MeanRF: 6.642411e+003 RFSD: 2.483502e+002 RFRSD: 3.738856  
 FitType : Linear  
 ZeroThrough : Through  
 Weighted Regression : None  
 Detector Name : FID1



#	Conc.(Ratio)	MeanArea	Area
1	9.95	61172	61172
2	19.9	129387	129387
3	39.8	267852	267852
4	49.75	339885	339885
5	59.7	397672	397672
6	79.6	545957	545957
7	99.5	673150	673150

### Anexo 9: Curva de calibración ácido isobutírico.

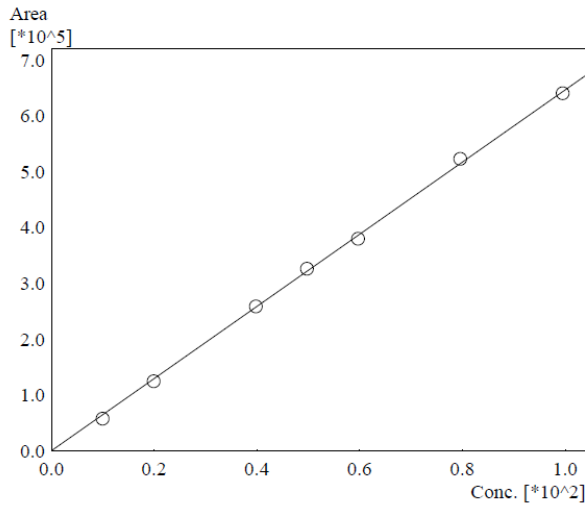
ID# : 4  
 Name : n-butyric Acid  
 Quantitative Method : External Standard  
 Function :  $f(x)=6925.35*x+0$   
 Rr1=0.9997831 Rr2=0.9995662 RSS=2.757957e+008  
 MeanRF: 6.731686e+003 RFSD: 3.588676e+002 RFRSD: 5.331021  
 FitType : Linear  
 ZeroThrough : Through  
 Weighted Regression : None  
 Detector Name : FID1



#	Conc.(Ratio)	MeanArea	Area
1	9.95	59970	59970
2	19.9	128919	128919
3	39.8	272392	272392
4	49.75	347595	347595
5	59.7	408492	408492
6	79.6	559666	559666
7	99.5	687755	687755

### Anexo 10: Curva de calibración ácido butírico.

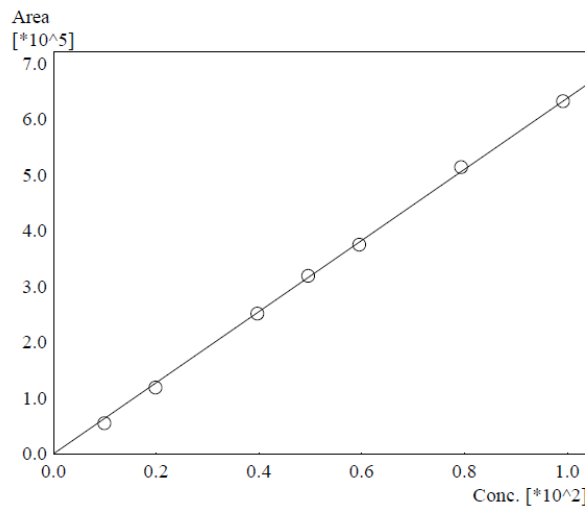
ID# : 5  
 Name : Iso-valeric Acid  
 Quantitative Method : External Standard  
 Function :  $f(x)=6468.02*x+0$   
 Rr1=0.9996822 Rr2=0.9993644 RSS=2.078131e+008  
 MeanRF: 6.339644e+003 RFSD: 2.883689e+002 RFRSD: 4.548660  
 FitType : Linear  
 ZeroThrough : Through  
 Weighted Regression : None  
 Detector Name : FID1



#	Conc.(Ratio)	MeanArea	Area
1	9.95	57127	57127
2	19.9	124009	124009
3	39.8	258596	258596
4	49.75	325710	325710
5	59.7	379433	379433
6	79.6	522748	522748
7	99.5	640512	640512

### Anexo 11: Curva de calibración ácido isoaléxico.

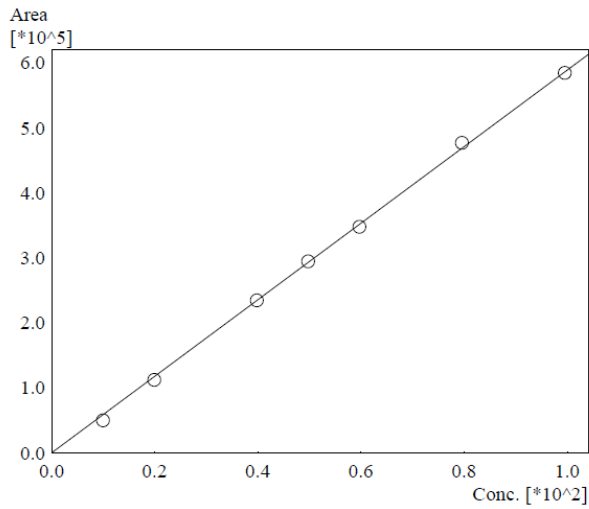
ID# : 6  
 Name : n-valeric Acid  
 Quantitative Method : External Standard  
 Function :  $f(x)=6372.22*x+0$   
 Rr1=0.9997901 Rr2=0.9995802 RSS=2.300845e+008  
 MeanRF: 6.189743e+003 RFSD: 3.450836e+002 RFRSD: 5.575088  
 FitType : Linear  
 ZeroThrough : Through  
 Weighted Regression : None  
 Detector Name : FID1



#	Conc.(Ratio)	MeanArea	Area
1	9.92	54571	54571
2	19.84	118270	118270
3	39.68	251155	251155
4	49.6	318360	318360
5	59.52	374349	374349
6	79.36	513151	513151
7	99.2	631142	631142

### Anexo 12: Curva de calibración ácido valérico.

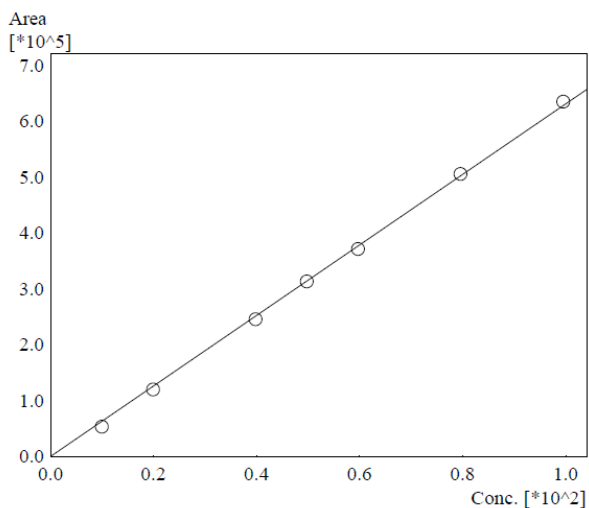
ID# : 7  
 Name : n-caproic Acid  
 Quantitative Method : External Standard  
 Function :  $f(x)=5893.44*x+0$   
 Rr1=0.9997661 Rr2=0.9995323 RSS=1.859647e+008  
 MeanRF: 5.731589e+003 RFSD: 3.346166e+002 RFRSD: 5.838112  
 FitType : Linear  
 ZeroThrough : Through  
 Weighted Regression : None  
 Detector Name : FID1



#	Conc.(Ratio)	MeanArea	Area
1	9.95	49938	49938
2	19.9	111821	111821
3	39.8	234226	234226
4	49.75	294196	294196
5	59.7	347541	347541
6	79.6	476689	476689
7	99.5	584515	584515

### Anexo 13: Curva de calibración ácido hexanoico.

ID# : 8  
 Name : n-caprylic Acid  
 Quantitative Method : External Standard  
 Function :  $f(x)=6307.16*x+0$   
 Rr1=0.9999337 Rr2=0.9998675 RSS=2.534892e+008  
 MeanRF: 6.100039e+003 RFSD: 3.619188e+002 RFRSD: 5.933056  
 FitType : Linear  
 ZeroThrough : Through  
 Weighted Regression : None  
 Detector Name : FID1



#	Conc.(Ratio)	MeanArea	Area
1	9.95	53007	53007
2	19.9	119678	119678
3	39.8	244802	244802
4	49.75	312682	312682
5	59.7	370642	370642
6	79.6	504871	504871
7	99.5	634024	634024

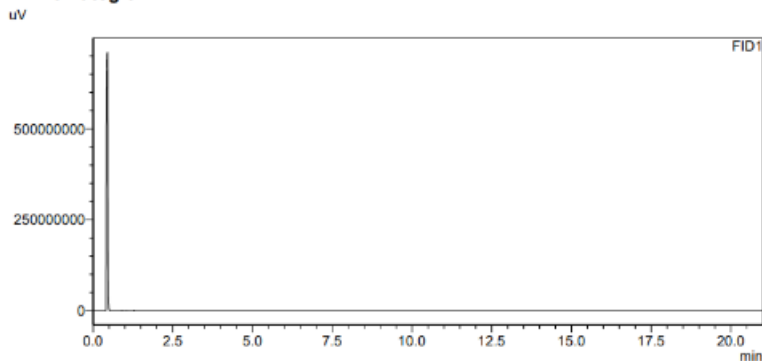
### Anexo 14: Curva de calibración ácido octanoico.

## Cromatografía de cada una de las muestras filtradas:

### <Sample Information>

Sample Name : Unknown Sample  
 Sample ID : UNK-0014  
 Data Filename : UKK-05.gcd  
 Method Filename : ACIDOS GRASOS 29 JUNIO 2023.gcm  
 Batch Filename : Samples 3500 rpm.gcb  
 Vial # : 2  
 Injection Volume : 1 uL  
 Date Acquired : 12/21/2023 9:06:33 PM  
 Date Processed : 12/21/2023 9:27:34 PM  
 Sample Type : Unknown  
 Acquired by : System Administrator  
 Processed by : System Administrator

### <Chromatogram>



### <Peak Table>

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
Total							

## Anexo 15: Cromatograma del solvente puro.

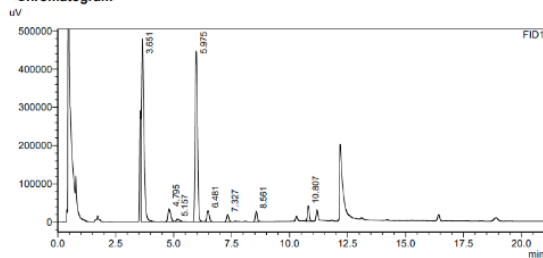
## Muestras filtradas y pasadas por centrifugación a 10000 RPM:

### SHIMADZU LabSolutions Analysis Report

#### <Sample Information>

Sample Name : BP1-NC  
 Sample ID : BP1-NC  
 Data Filename : BP1-NC.gcd  
 Method Filename : ACIDOS GRASOS 29 JUNIO 2023.gcm  
 Batch Filename : Samples 10000 rpm.gcb  
 Vial # : 3  
 Injection Volume : 1 uL  
 Date Acquired : 12/19/2023 4:25:59 PM  
 Date Processed : 12/19/2023 4:47:00 PM  
 Sample Type : Unknown  
 Acquired by : System Administrator  
 Processed by : System Administrator

#### <Chromatogram>



#### <Peak Table>

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	3.651	3523034	477749	230.940	ppm		Acetic Acid
2	4.795	272584	33433	11.161	ppm		Propionic Acid
3	5.157	64580	6700	2.206	ppm	V	Iso-butyric Acid
4	5.975	3150900	443746	106.515	ppm		n-butyric Acid
5	6.481	208952	23675	7.136	ppm	V	Iso-valeric Acid
6	7.327	120108	18807	4.074	ppm		n-valeric Acid
7	8.561	155905	26930	5.538	ppm		n-caproic Acid
8	10.807	219862	39714	15.045	ppm	V	n-caprylic Acid
Total		7714022	1075794				

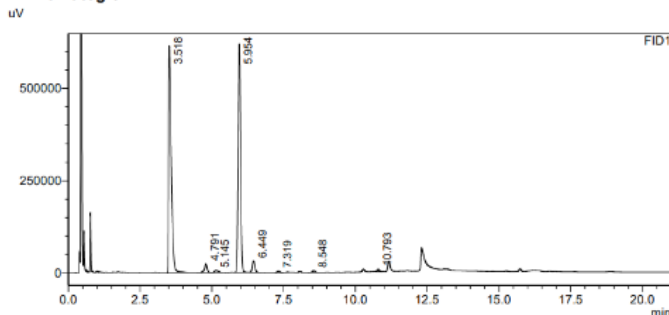
## Anexo 16: Cromatograma muestra BP1-NC.



<Sample Information>

Sample Name : BP2-NC  
 Sample ID : BP2-NC  
 Data Filename : BP2-NC.gcd  
 Method Filename : ACIDOS GRASOS 29 JUNIO 2023.gcm  
 Batch Filename : Samples 10000 rpm.gcb  
 Vial # : 4  
 Injection Volume : 1 uL  
 Date Acquired : 12/19/2023 4:51:12 PM  
 Date Processed : 12/19/2023 5:12:13 PM  
 Sample Type : Unknown  
 Acquired by : System Administrator  
 Processed by : System Administrator

<Chromatogram>



<Peak Table>

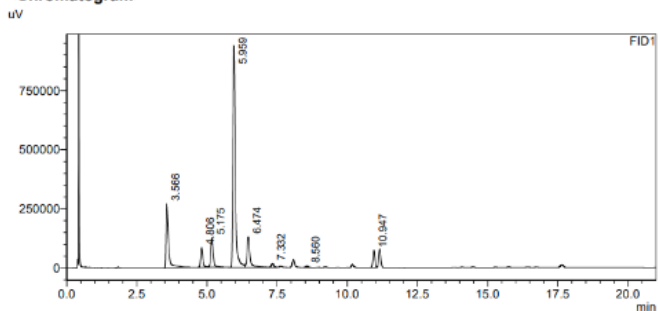
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	3.518	3889084	613026	254.935	ppm		Acetic Acid
2	4.791	148777	24444	6.092	ppm		Propionic Acid
3	5.145	52056	6171	1.778	ppm	V	Iso-butyric Acid
4	5.954	3649752	618467	123.378	ppm		n-butyric Acid
5	6.449	196323	31768	6.826	ppm		Iso-valeric Acid
6	7.319	23125	3851	0.784	ppm		n-valeric Acid
7	8.548	32248	5553	1.146	ppm		n-caproic Acid
8	10.793	34696	6229	2.387	ppm	V	n-caprylic Acid
Total		8026265	1309508				

## Anexo 17: Cromatograma muestra BP2-NC.

<Sample Information>

Sample Name : BP-C  
 Sample ID : BP-C  
 Data Filename : BP-C.gcd  
 Method Filename : ACIDOS GRASOS 29 JUNIO 2023.gcm  
 Batch Filename : Samples 10000 rpm.gcb  
 Vial # : 7  
 Injection Volume : 1 uL  
 Date Acquired : 12/19/2023 6:32:05 PM  
 Date Processed : 12/19/2023 6:53:06 PM  
 Sample Type : Unknown  
 Acquired by : System Administrator  
 Processed by : System Administrator

<Chromatogram>



<Peak Table>

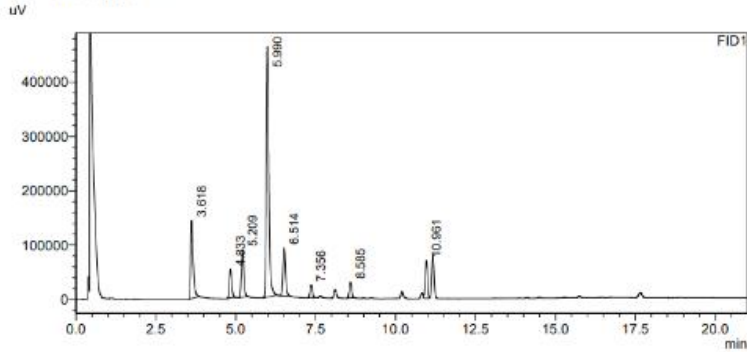
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	3.566	1678199	269938	110.008	ppm		Acetic Acid
2	4.806	452546	82900	18.530	ppm		Propionic Acid
3	5.175	756403	124354	25.842	ppm	V	Iso-butyric Acid
4	5.959	5472944	932505	185.010	ppm		n-butyric Acid
5	6.474	950381	128566	33.045	ppm	V	Iso-valeric Acid
6	7.332	103094	16961	3.497	ppm	V	n-valeric Acid
7	8.560	36724	6238	1.305	ppm		n-caproic Acid
8	10.947	354645	72791	24.256	ppm		n-caprylic Acid
Total		9804937	1634253				

## Anexo 18: Cromatograma muestra BP-C.

<Sample Information>

Sample Name : BP-C-10000  
 Sample ID : BP-C-10000  
 Data Filename : BP-C-10000-R.gcd  
 Method Filename : ACIDOS GRASOS 29 JUNIO 2023.gcm  
 Batch Filename : Samples 10000 3500 rpm.gcb  
 Vial # : 2  
 Injection Volume : 1 uL  
 Date Acquired : 1/18/2024 10:23:04 AM  
 Date Processed : 1/18/2024 10:44:05 AM  
 Sample Type : Unknown  
 Acquired by : System Administrator  
 Processed by : System Administrator

<Chromatogram>



<Peak Table>

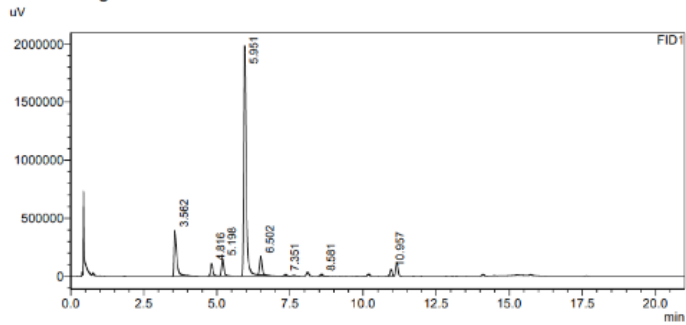
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	3.618	777857	143308	50.990	ppm		Acetic Acid
2	4.833	267185	52107	10.940	ppm		Propionic Acid
3	5.209	471218	87031	16.099	ppm		Iso-butyric Acid
4	5.990	2552316	460198	86.280	ppm		n-butyric Acid
5	6.514	493912	88491	17.173	ppm		Iso-valeric Acid
6	7.356	122594	23462	4.158	ppm		n-valeric Acid
7	8.585	149203	28606	5.300	ppm		n-caproic Acid
8	10.961	343407	69578	23.488	ppm		n-caprylic Acid
Total		5177691	952781				

Anexo 19: Cromatograma muestra BP-C.

<Sample Information>

Sample Name : CA1-C  
 Sample ID : CA1-C  
 Data Filename : CA1-C.gcd  
 Method Filename : ACIDOS GRASOS 29 JUNIO 2023.gcm  
 Batch Filename : Samples 10000 rpm.gcb  
 Vial # : 9  
 Injection Volume : 1 uL  
 Date Acquired : 12/19/2023 7:22:37 PM  
 Date Processed : 12/19/2023 7:43:39 PM  
 Sample Type : Unknown  
 Acquired by : System Administrator  
 Processed by : System Administrator

<Chromatogram>



<Peak Table>

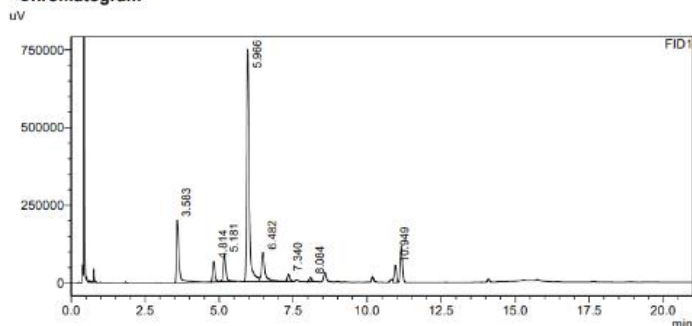
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	3.562	2525973	392646	165.581	ppm		Acetic Acid
2	4.816	576522	105911	23.607	ppm		Propionic Acid
3	5.196	832858	147293	28.454	ppm	V	Iso-butyric Acid
4	5.951	11931510	1978916	403.338	ppm	S	n-butyric Acid
5	6.502	894738	160616	31.110	ppm	T	Iso-valeric Acid
6	7.351	62133	11673	2.108	ppm	T	n-valeric Acid
7	8.581	83935	15549	2.982	ppm		n-caproic Acid
8	10.957	283358	57534	19.381	ppm		n-caprylic Acid
Total		17191026	2870138				

Anexo 20: Cromatograma muestra CA1-C.

<Sample Information>

Sample Name : CA-C-10000  
 Sample ID : CA-C-10000  
 Data Filename : CA-C-10000-R.gcd  
 Method Filename : ACIDOS GRASOS 29 JUNIO 2023.gcm  
 Batch Filename : Samples 10000 3500 rpm.gcb  
 Vial # : 4  
 Injection Volume : 1 uL  
 Date Acquired : 1/18/2024 11:13:32 AM  
 Date Processed : 1/18/2024 3:31:37 PM  
 Sample Type : Unknown  
 Acquired by : System Administrator  
 Processed by : System Administrator

<Chromatogram>



<Peak Table>

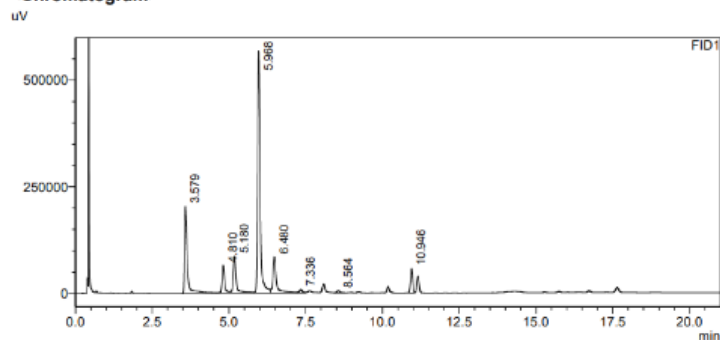
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	3.583	1208086	201644	79.192	ppm		Acetic Acid
2	4.814	355822	65338	14.570	ppm		Propionic Acid
3	5.181	529568	84680	18.092	ppm	V	Iso-butyric Acid
4	5.966	4439152	745145	75.032	ppm		n-butyric Acid
5	6.482	792866	93442	27.568	ppm	V	Iso-valeric Acid
6	7.340	147989	23629	5.019	ppm	V	n-valeric Acid
7	8.084	78744	13517	2.797	ppm		n-caproic Acid
8	10.949	281836	55345	19.276	ppm		n-caprylic Acid
Total		7834044	1282741				

Anexo 21: Cromatograma muestra CA-C.

<Sample Information>

Sample Name : CB-C  
 Sample ID : CB-C  
 Data Filename : CB-C.gcd  
 Method Filename : ACIDOS GRASOS 29 JUNIO 2023.gcm  
 Batch Filename : Samples 10000 rpm.gcb  
 Vial # : 8  
 Injection Volume : 1 uL  
 Date Acquired : 12/19/2023 6:57:19 PM  
 Date Processed : 12/19/2023 7:18:20 PM  
 Sample Type : Unknown  
 Acquired by : System Administrator  
 Processed by : System Administrator

<Chromatogram>



<Peak Table>

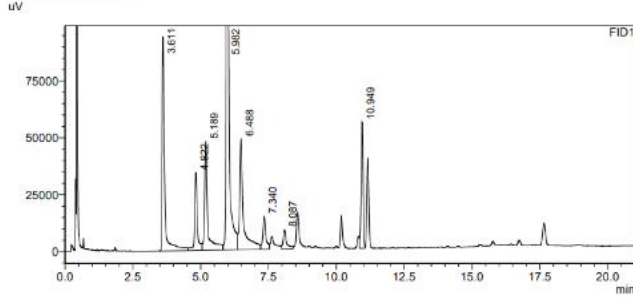
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	3.579	1283741	202908	84.151	ppm		Acetic Acid
2	4.810	392702	65594	16.080	ppm	V	Propionic Acid
3	5.180	619555	86377	21.167	ppm	V	Iso-butyric Acid
4	5.968	3288656	566338	111.171	ppm	V	n-butyric Acid
5	6.480	691900	84018	24.058	ppm	V	Iso-valeric Acid
6	7.336	65633	8234	2.226	ppm	V	n-valeric Acid
7	8.564	50687	5824	1.801	ppm		n-caproic Acid
8	10.946	282362	57044	19.312	ppm	V	n-caprylic Acid
Total		6675236	1076337				

Anexo 22: Cromatograma muestra CB-C.

<Sample Information>

Sample Name : CB-C-10000  
 Sample ID : CB-C-10000  
 Data Filename : CB-C-10000-R.gcd  
 Method Filename : ACIDOS GRASOS 29 JUNIO 2023.gcm  
 Batch Filename : Samples 10000 3500 ppm.gcb  
 Vial # : 3  
 Injection Volume : 1 uL  
 Date Acquired : 1/18/2024 10:48:17 AM  
 Date Processed : 1/18/2024 3:31:37 PM  
 Sample Type : Unknown  
 Acquired by : System Administrator  
 Processed by : System Administrator

<Chromatogram>



<Peak Table>

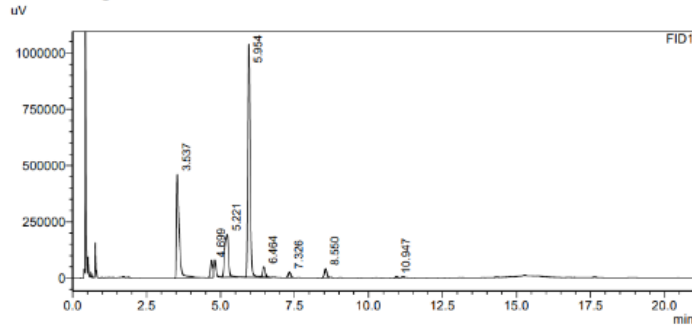
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	3.611	594063	93632	38.942	ppm	S	Acetic Acid
2	4.822	224096	34082	9.176	ppm	V	Propionic Acid
3	5.189	388567	47712	13.275	ppm	SV	Iso-butyric Acid
4	5.982	1582380	256342	26.746	ppm	V	n-butyric Acid
5	6.488	479006	48690	16.655	ppm	V	Iso-valeric Acid
6	7.340	111345	14455	3.777	ppm	V	n-valeric Acid
7	8.087	73884	8280	2.625	ppm		n-caproic Acid
8	10.949	279921	55329	19.145	ppm		n-caprylic Acid
Total		3733263	558521				

Anexo 23: Cromatograma muestra CB-C duplicado.

<Sample Information>

Sample Name : CF1-AC  
 Sample ID : CF1-AC  
 Data Filename : CF1-AC.gcd  
 Method Filename : ACIDOS GRASOS 29 JUNIO 2023.gcm  
 Batch Filename : Samples 10000 rpm.gcb  
 Vial # : 5  
 Injection Volume : 1 uL  
 Date Acquired : 12/19/2023 5:16:24 PM  
 Date Processed : 12/19/2023 5:37:25 PM  
 Sample Type : Unknown  
 Acquired by : System Administrator  
 Processed by : System Administrator

<Chromatogram>



<Peak Table>

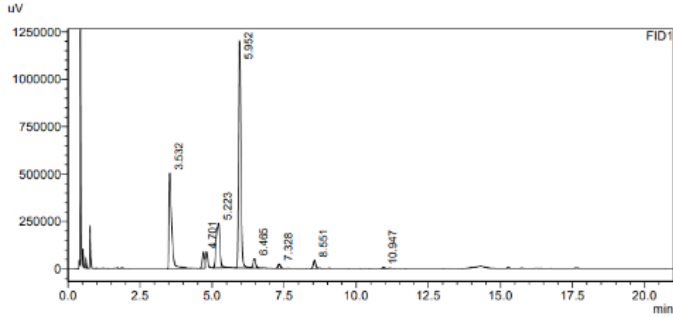
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	3.537	2888456	458796	189.342	ppm		Acetic Acid
2	4.699	404820	77601	16.576	ppm		Propionic Acid
3	5.221	1722014	189729	58.831	ppm		Iso-butyric Acid
4	5.954	5712192	1032340	193.098	ppm	S	n-butyric Acid
5	6.464	264956	44743	9.213	ppm	T	Iso-valeric Acid
6	7.326	144991	25397	4.918	ppm		n-valeric Acid
7	8.550	230287	40980	8.181	ppm		n-caproic Acid
8	10.947	24845	5196	1.699	ppm		n-caprylic Acid
Total		11392561	1874783				

Anexo 24: Cromatograma muestra CF1-AC.

<Sample Information>

Sample Name : CF2-AC  
Sample ID : CF2-AC  
Data Filename : CF2-AC.gcd  
Method Filename : ACIDOS GRASOS 29 JUNIO 2023.gcm  
Batch Filename : Samples 10000 rpm.gcb  
Vial # : 6  
Injection Volume : 1 uL  
Date Acquired : 12/19/2023 5:41:37 PM  
Date Processed : 12/19/2023 6:02:38 PM  
Sample Type : Unknown  
Acquired by : System Administrator  
Processed by : System Administrator

<Chromatogram>



<Peak Table>

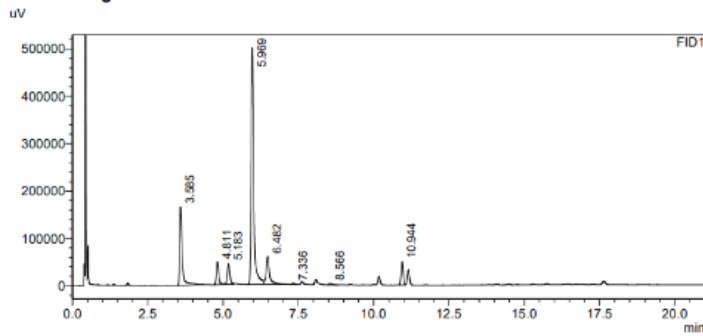
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	3.532	3207289	503250	210.242	ppm		Acetic Acid
2	4.701	440959	85067	18.056	ppm		Propionic Acid
3	5.223	2144292	235382	73.258	ppm		Iso-butyric Acid
4	5.952	6571249	1193481	222.138	ppm		n-butyric Acid
5	6.465	302348	48911	10.513	ppm	V	Iso-valeric Acid
6	7.328	130988	23184	4.443	ppm		n-valeric Acid
7	8.551	243247	43379	8.641	ppm		n-caproic Acid
8	10.947	29410	6050	2.012	ppm		n-caprylic Acid
Total		13069783	2138683				

Anexo 25: Cromatograma muestra BF2-AC.

<Sample Information>

Sample Name : CF1-C  
Sample ID : CF1-C  
Data Filename : CF1-C.gcd  
Method Filename : ACIDOS GRASOS 29 JUNIO 2023.gcm  
Batch Filename : Samples 10000 rpm.gcb  
Vial # : 10  
Injection Volume : 1 uL  
Date Acquired : 12/19/2023 8:13:05 PM  
Date Processed : 12/19/2023 8:34:06 PM  
Sample Type : Unknown  
Acquired by : System Administrator  
Processed by : System Administrator

<Chromatogram>



<Peak Table>

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	3.585	995498	165497	65.256	ppm		Acetic Acid
2	4.811	267891	47794	10.969	ppm		Propionic Acid
3	5.183	268220	44060	9.164	ppm	V	Iso-butyric Acid
4	5.969	2967175	497902	100.304	ppm		n-butyric Acid
5	6.482	476552	58938	16.570	ppm	V	Iso-valeric Acid
6	7.336	16289	2946	0.553	ppm		n-valeric Acid
7	8.566	18698	3005	0.664	ppm		n-caproic Acid
8	10.944	242051	49343	16.555	ppm		n-caprylic Acid
Total		5252375	869486				

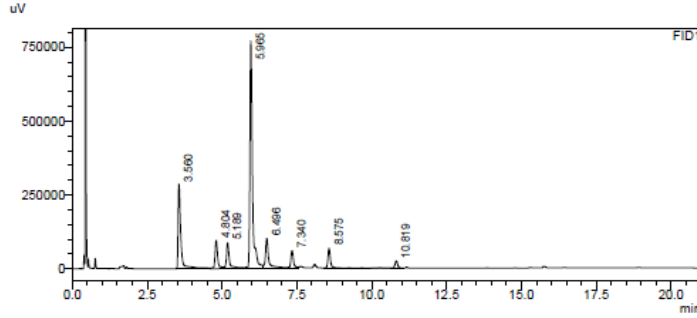
Anexo 26: Cromatograma muestra CF1-C.

Muestras pasadas por membranas de ultrafiltración:

<Sample Information>

Sample Name : BP1-NC-UF  
 Sample ID : BP1-NC-UF  
 Data Filename : BP1-NC-UF.god  
 Method Filename : ACIDOS GRASOS 29 JUNIO 2023.gcm  
 Batch Filename : Batch UF.gob  
 Vial # : 3  
 Injection Volume : 1 uL  
 Date Acquired : 2/26/2024 1:37:24 PM  
 Date Processed : 2/27/2024 10:51:34 AM  
 Sample Type : Unknown  
 Acquired by : System Administrator  
 Processed by : System Administrator

<Chromatogram>



<Peak Table>

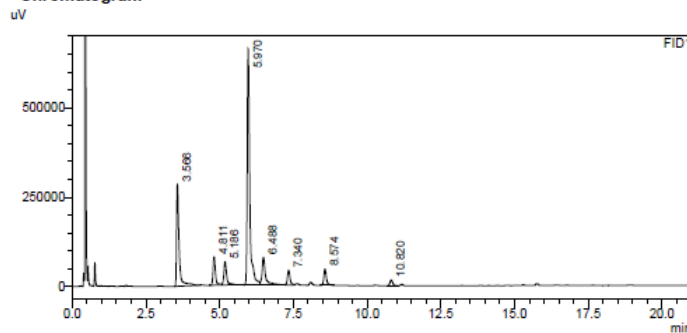
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	3.560	1858920	285000	120.092	ppm	S	Acetic Acid
2	4.804	584341	95184	23.927	ppm	V	Propionic Acid
3	5.189	659444	87031	22.529	ppm	SV	Iso-butyrinic Acid
4	5.965	4702116	766922	158.953	ppm	V	n-butyrinic Acid
5	6.496	843453	101245	29.327	ppm	V	Iso-valeric Acid
6	7.340	380601	60585	12.910	ppm	V	n-valeric Acid
7	8.575	500716	67548	17.787	ppm	S	n-caproic Acid
8	10.819	159134	25163	10.884	ppm	V	n-caprylic Acid
Total		9688726	1488679				

Anexo 27: Cromatograma muestra BP1-NC.

<Sample Information>

Sample Name : BP2-NC-UF  
 Sample ID : BP2-NC-UF  
 Data Filename : BP2-NC-UF.god  
 Method Filename : ACIDOS GRASOS 29 JUNIO 2023.gcm  
 Batch Filename : Batch UF.gob  
 Vial # : 4  
 Injection Volume : 1 uL  
 Date Acquired : 2/26/2024 2:02:39 PM  
 Date Processed : 2/27/2024 10:51:34 AM  
 Sample Type : Unknown  
 Acquired by : System Administrator  
 Processed by : System Administrator

<Chromatogram>



<Peak Table>

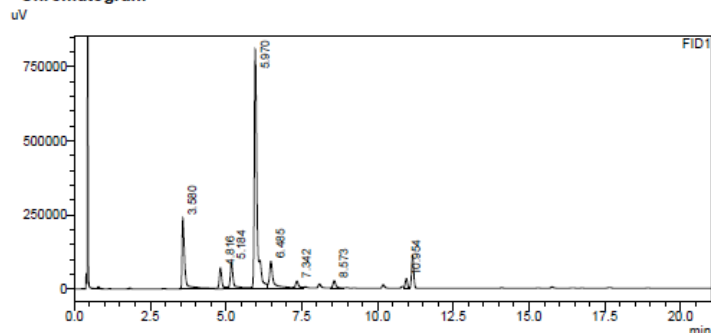
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	3.566	1780098	284819	113.708	ppm		Acetic Acid
2	4.811	448382	79427	18.401	ppm		Propionic Acid
3	5.186	424803	65035	14.513	ppm	V	Iso-butyrinic Acid
4	5.970	4048763	658801	138.866	ppm		n-butyrinic Acid
5	6.488	653232	77781	22.713	ppm	SV	Iso-valeric Acid
6	7.340	252365	41662	8.560	ppm	V	n-valeric Acid
7	8.574	288563	45752	10.251	ppm		n-caproic Acid
8	10.820	106951	16579	7.315	ppm		n-caprylic Acid
Total		7984154	1269846				

Anexo 28: Cromatograma muestra BP2-NC.

<Sample Information>

Sample Name : CA1-C-UF  
 Sample ID : CA1-C-UF  
 Data Filename : CA1-C-UF.god  
 Method Filename : ACIDOS GRASOS 29 JUNIO 2023.gcm  
 Batch Filename : Batch UF.gcb  
 Vial # : 9  
 Injection Volume : 1 uL  
 Date Acquired : 2/26/2024 4:35:05 PM  
 Date Processed : 2/27/2024 10:51:35 AM  
 Sample Type : Unknown  
 Acquired by : System Administrator  
 Processed by : System Administrator

<Chromatogram>



<Peak Table>

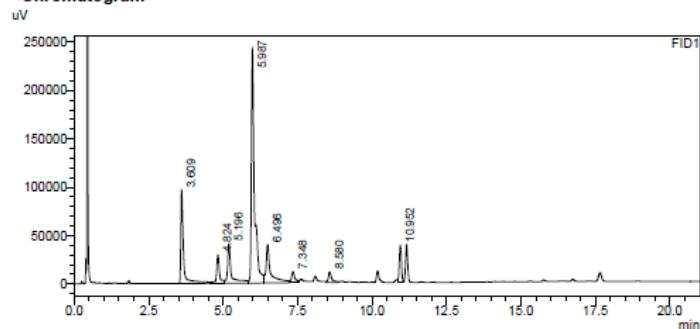
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	3.580	1530741	237525	98.891	ppm		Acetic Acid
2	4.816	432498	70356	17.710	ppm	V	Propionic Acid
3	5.184	708412	89049	24.202	ppm	SV	Iso-butyrinic Acid
4	5.970	5167446	805444	174.683	ppm	V M	n-butyrinic Acid
5	6.485	914775	92312	31.807	ppm	V	Iso-valeric Acid
6	7.342	199614	25417	6.771	ppm	V	n-valeric Acid
7	8.573	209510	26598	7.443	ppm		n-caproic Acid
8	10.954	172556	33603	11.802	ppm		n-caprylic Acid
Total		9335552	1380305				

Anexo 29: Cromatograma muestra CA1-C.

<Sample Information>

Sample Name : CB-C-UF  
 Sample ID : CB-C-UF  
 Data Filename : CB-C-UF.god  
 Method Filename : ACIDOS GRASOS 29 JUNIO 2023.gcm  
 Batch Filename : Batch UF.gcb  
 Vial # : 8  
 Injection Volume : 1 uL  
 Date Acquired : 2/26/2024 4:09:51 PM  
 Date Processed : 2/27/2024 10:52:40 AM  
 Sample Type : Unknown  
 Acquired by : System Administrator  
 Processed by : System Administrator

<Chromatogram>



<Peak Table>

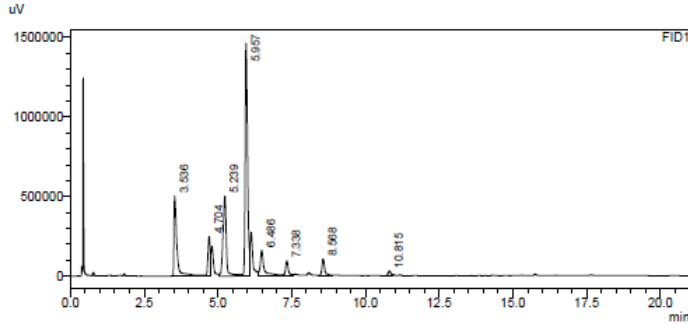
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	3.609	624815	98022	40.365	ppm	S	Acetic Acid
2	4.824	197435	29407	8.084	ppm	V	Propionic Acid
3	5.196	362770	40870	12.364	ppm	SV	Iso-butyrinic Acid
4	5.987	1764904	241182	59.662	ppm	V M	n-butyrinic Acid
5	6.496	431667	36641	15.009	ppm	V	Iso-valeric Acid
6	7.348	94467	11527	3.204	ppm	V	n-valeric Acid
7	8.580	91493	10951	3.250	ppm		n-caproic Acid
8	10.952	195334	38328	13.360	ppm		n-caprylic Acid
Total		3762884	507928				

Anexo 30: Cromatograma muestra CB-C.

<Sample Information>

Sample Name : CF1-AC-UF  
 Sample ID : CF1-AC-UF  
 Data Filename : CF1-AC-UF-U.gcd  
 Method Filename : ACIDOS GRASOS 29 JUNIO 2023.gcm  
 Batch Filename : Batch UF.gcb  
 Vial # : 5  
 Injection Volume : 1 uL  
 Date Acquired : 2/28/2024 2:27:53 PM  
 Date Processed : 2/27/2024 10:59:28 AM  
 Sample Type : Unknown  
 Acquired by : System Administrator  
 Processed by : System Administrator

<Chromatogram>



<Peak Table>

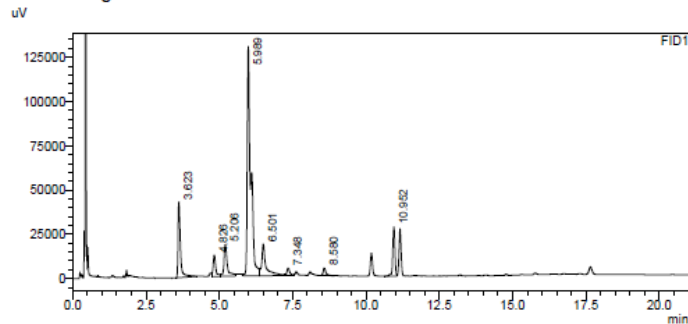
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	3.536	3557122	500292	229.802	ppm	S	Acetic Acid
2	4.704	1328569	247855	54.401	ppm	V	Propionic Acid
3	5.239	3932736	502784	134.359	ppm	S	Iso-butyric Acid
4	5.957	8324191	1461795	281.395	ppm	V	n-butyric Acid
5	6.486	1571766	181282	54.651	ppm		Iso-valeric Acid
6	7.338	641605	95359	21.763	ppm	V	n-valeric Acid
7	8.568	737465	105366	26.197	ppm		n-caproic Acid
8	10.815	195926	30842	13.401	ppm	V	n-caprylic Acid
Total		20288379	3105375				

## Anexo 31: Cromatograma muestra CF1-AC.

<Sample Information>

Sample Name : CF1-C-UF  
 Sample ID : CF1-C-UF  
 Data Filename : CF1-C-UF.gcd  
 Method Filename : ACIDOS GRASOS 29 JUNIO 2023.gcm  
 Batch Filename : Batch UF - Copy (2).gcb  
 Vial # : 10  
 Injection Volume : 1 uL  
 Date Acquired : 2/26/2024 5:25:36 PM  
 Date Processed : 2/27/2024 11:15:18 AM  
 Sample Type : Unknown  
 Acquired by : System Administrator  
 Processed by : System Administrator

<Chromatogram>



<Peak Table>

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	3.623	248103	42614	20.342	ppm		Acetic Acid
2	4.826	72415	11967	7.121	ppm	V	Propionic Acid
3	5.206	142456	18014	7.878	ppm	V	Iso-butyric Acid
4	5.989	1080154	129334	31.741	ppm	M	n-butyric Acid
5	6.501	182470	17891	10.307	ppm	V	Iso-valeric Acid
6	7.348	28454	4175	2.337	ppm	V	n-valeric Acid
7	8.580	28211	4245	2.324	ppm		n-caproic Acid
8	10.952	145685	27782	25.920	ppm		n-caprylic Acid
Total		1927949	256022				

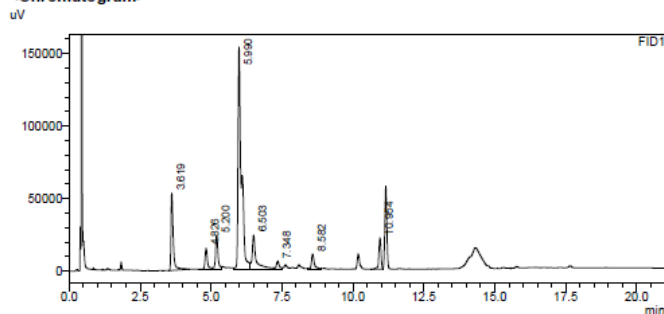
## Anexo 32: Cromatograma muestra CF1-C.



<Sample Information>

Sample Name : CF2-C-UF  
 Sample ID : CF2-C-UF  
 Data Filename : CF2-C-UF.god  
 Method Filename : ACIDOS GRASOS 29 JUNIO 2023.gom  
 Batch Filename : Batch UF - Copy (2).gob  
 Vial # : 11  
 Injection Volume : 1 uL  
 Date Acquired : 2/29/2024 5:50:54 PM  
 Date Processed : 2/27/2024 10:42:50 AM  
 Sample Type : Unknown  
 Acquired by : System Administrator  
 Processed by : System Administrator

<Chromatogram>



<Peak Table>

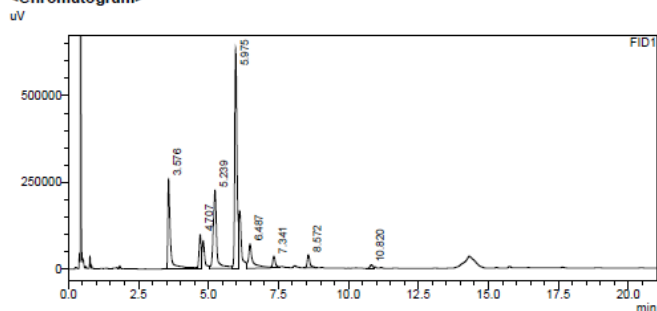
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	3.619	303417	53067	24.877	ppm		Acetic Acid
2	4.826	87959	14538	8.650	ppm		Propionic Acid
3	5.200	146179	23263	8.186	ppm	V	Iso-butyrlic Acid
4	5.990	1251247	152886	36.789	ppm	V M	n-butyrlic Acid
5	6.503	239807	23604	13.545	ppm	V	Iso-valeric Acid
6	7.348	42670	5517	3.505	ppm	V	n-valeric Acid
7	8.582	77937	10462	6.419	ppm		n-caproic Acid
8	10.954	115780	21636	20.599	ppm		n-caprylic Acid
Total		2284997	304973				

Anexo 33: Cromatograma muestra CF2-C.

<Sample Information>

Sample Name : CF2-AC-UF  
 Sample ID : CF2-AC-UF  
 Data Filename : CF2-AC-UF.god  
 Method Filename : ACIDOS GRASOS 29 JUNIO 2023.gom  
 Batch Filename : Batch UF.gob  
 Vial # : 8  
 Injection Volume : 1 uL  
 Date Acquired : 2/28/2024 2:53:07 PM  
 Date Processed : 2/27/2024 10:51:34 AM  
 Sample Type : Unknown  
 Acquired by : System Administrator  
 Processed by : System Administrator

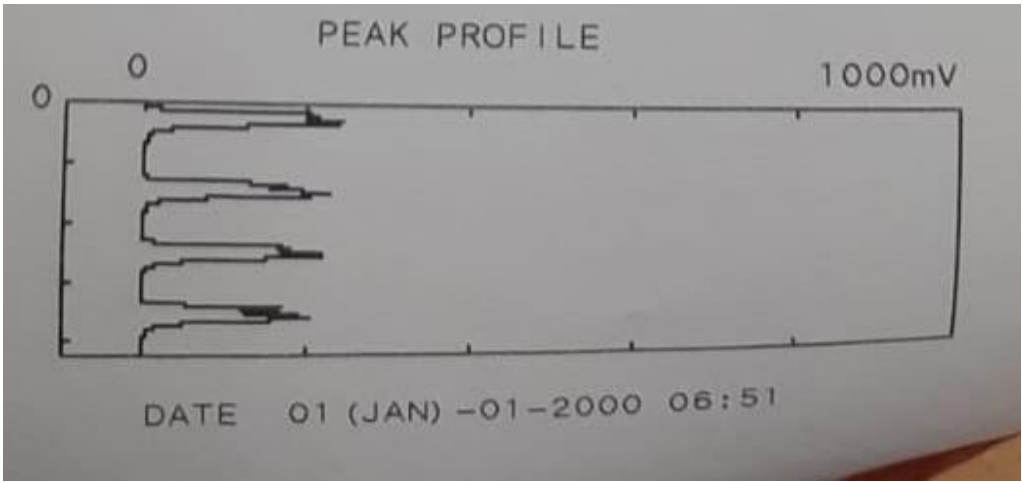
<Chromatogram>



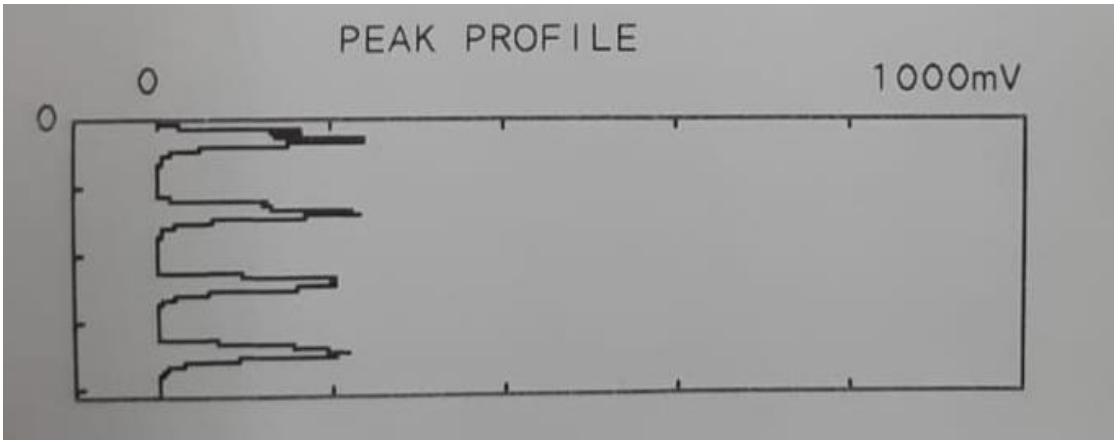
<Peak Table>

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	3.576	1729595	259048	111.738	ppm	S	Acetic Acid
2	4.707	539677	98190	22.068	ppm	V	Propionic Acid
3	5.239	1918214	228074	65.535	ppm		Iso-butyrlic Acid
4	5.975	3583978	634139	121.155	ppm	V	n-butyrlic Acid
5	6.487	775113	70120	26.951	ppm		Iso-valeric Acid
6	7.341	248221	34697	8.419	ppm	V	n-valeric Acid
7	8.572	256640	37763	9.117	ppm		n-caproic Acid
8	10.820	67975	10739	4.649	ppm		n-caprylic Acid
Total		9119413	1370770				

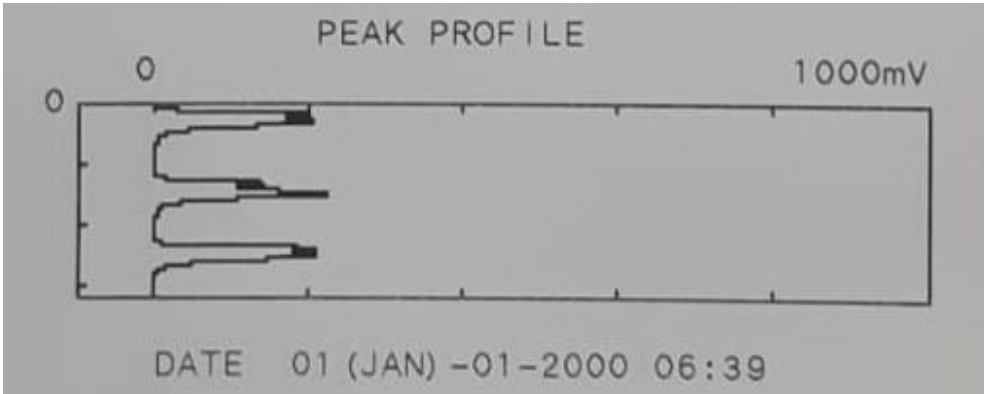
Anexo 34: Cromatograma muestra CF2-AC.



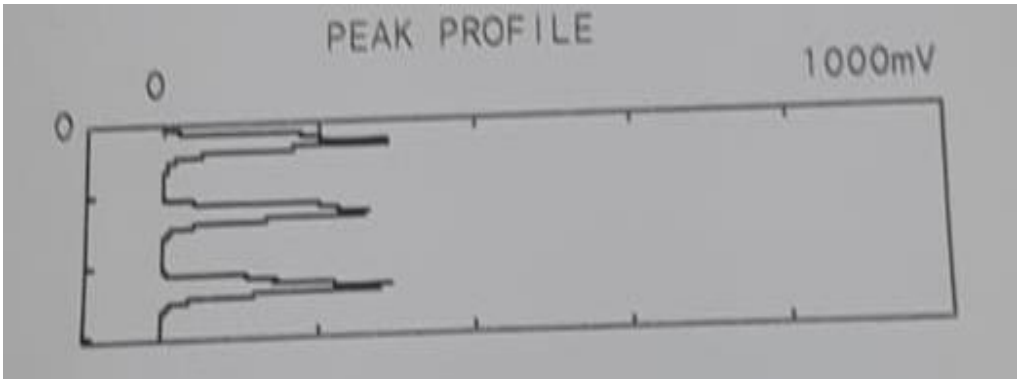
**Anexo 35: Perfil de análisis TOC muestra CF1-AC.**



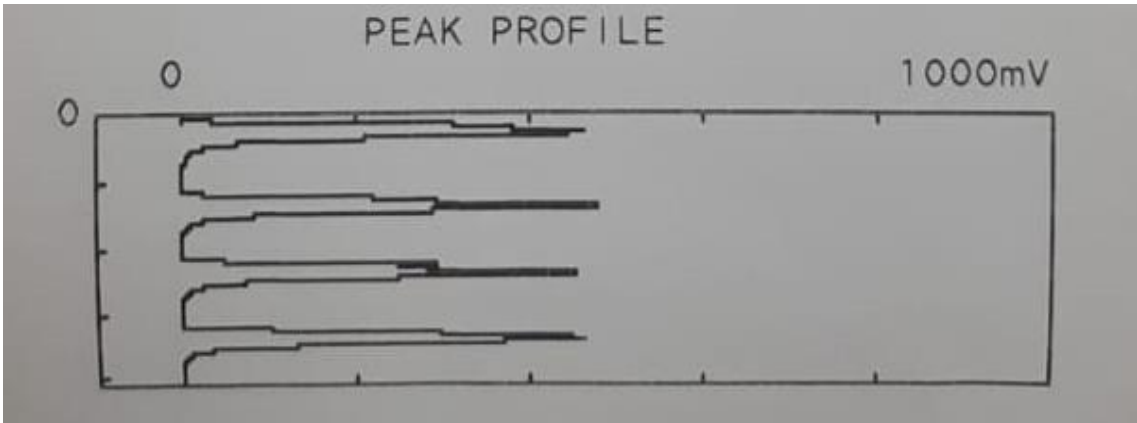
**Anexo 36: Perfil de análisis TOC muestra CF2-AC.**



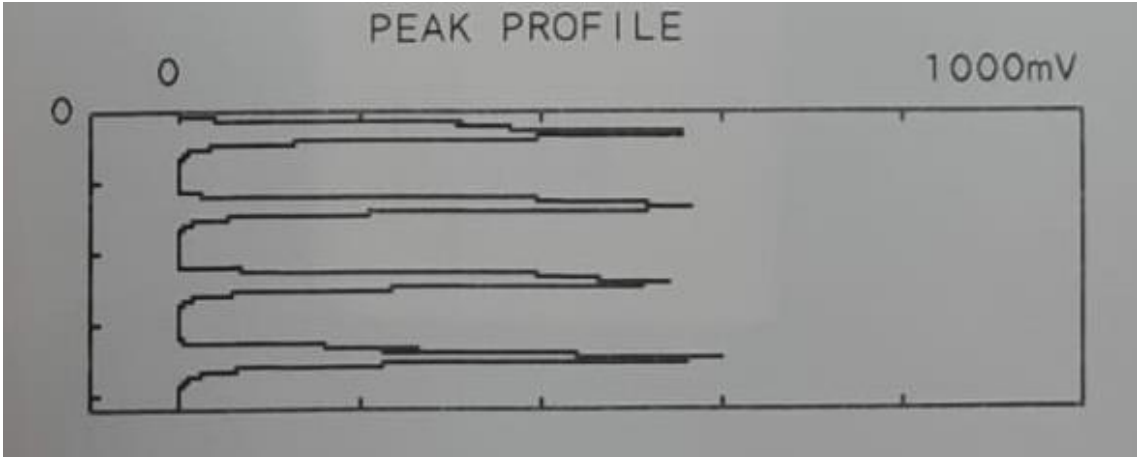
**Anexo 37: Perfil de análisis TOC muestra BP2-NC.**



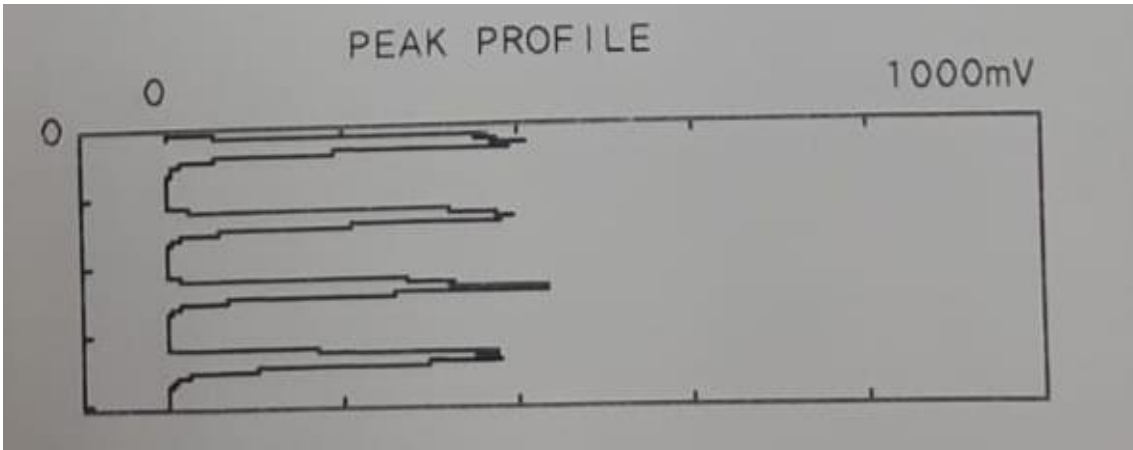
**Anexo 38: Perfil de análisis TOC muestra BP-C.**



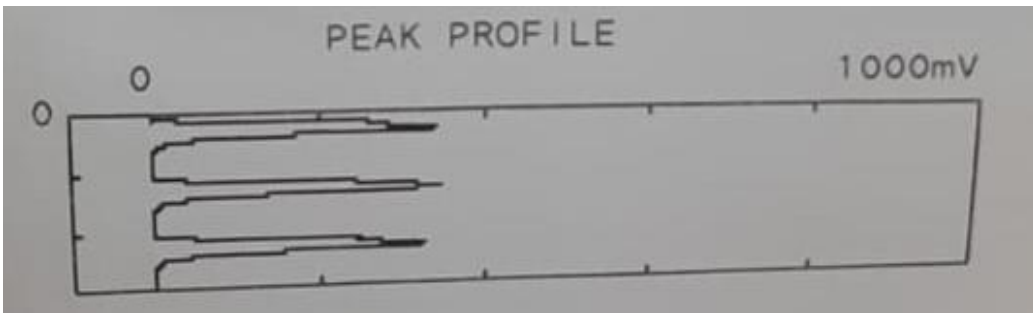
**Anexo 39: Perfil de análisis TOC muestra CF2-C.**



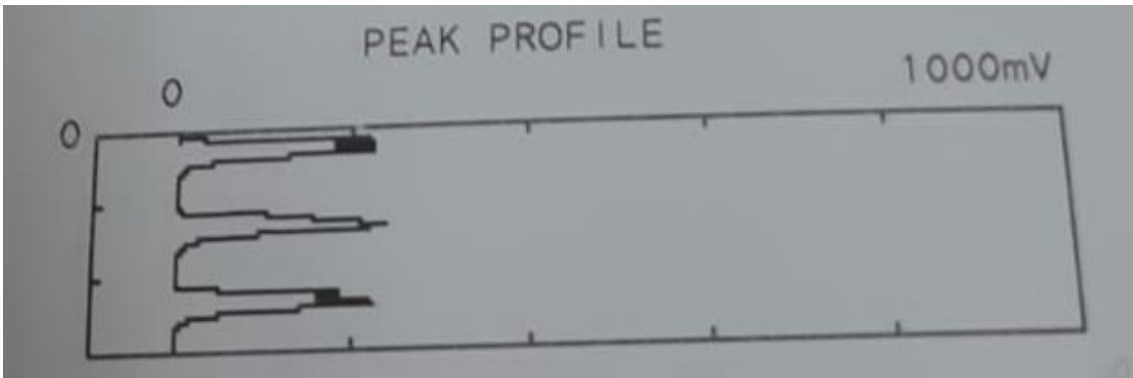
**Anexo 40: Perfil de análisis TOC muestra CA1-C.**



**Anexo 41: Perfil de análisis TOC muestra BP1-NC.**



**Anexo 42: Perfil de análisis TOC muestra CF1-C.**



**Anexo 43: Perfil de análisis TOC muestra CB-C.**