



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

CAMPO 1

DESARROLLO DE UN MÉTODO CROMATOGRÁFICO (HPLC)
PARA LA DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS EN
CERVEZAS

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO

PRESENTA:

José Luis Varela Pedraza

Asesoras:

Dra. Guadalupe Pérez Caballero

Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez

CUAUTITLAN IZCALLI

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES

ATN: L. A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis :

Desarrollo de un método cromatográfico (HPLC) para la determinación de ácidos orgánicos en cerveza.

que presenta el pasante: José Luis Varela Pedraza
con número de cuenta: 09854115-9 para obtener el título de :
Químico

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 12 de Marzo de 2009.

PRESIDENTE	QFB. Delia Jaramillo Reyes	
VOCAL	Q. Ma. Eugenia Carbajal Arenas	
SECRETARIO	Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez	
PRIMER SUPLENTE	QFB. Dalia Bonilla Martínez	
SEGUNDO SUPLENTE	Q. Pablo Hernández Matamoros	

AGRADECIMIENTOS

A:

DIOS

POR TODO

A mis padres por ser mi punto de apoyo en toda mi formación, y en especial para ti mami por estar siempre a mi lado

Especial agradecimiento a la UNAM FESC por darme la oportunidad y el honor de ser parte de ella.

A REYNA, NA ITZA, Y KRISNA por haberme brindado la fuerza para terminar esta etapa de mi vida.

A ROCIO, JUAN CARLOS, EDUARDO Y GREGORIA por apoyarme siempre.

A las Doctoras LUPITA Y ALMA por darme la oportunidad de trabajar junto a ellas.

A mis compañeros de La Carrera de QUÍMICA generación 25 por compartir un momento de su vida.

A ti por reanudar algo perdido en el espacio y el tiempo.

A la UNAM DGAPA por el apoyo a los proyectos PAPIIME PE203405 y PE207606

INDICE	
OBJETIVOS	2
INTRODUCCION	3
1. GENERALIDADES	6
1.1. Cerveza	6
1.1.1. Origen e historia de la cerveza	6
1.1.2. Componentes básicos de la cerveza	8
1.2. Proceso de elaboración	8
1.3. Flavor	12
1.4. Ácidos Orgánicos	14
1.4.1. Estructura y nomenclatura	14
1.4.2. Propiedades físicas	16
1.4.3. Propiedades químicas	18
1.5. Cromatografía	20
1.5.1. Generalidades	20
1.5.2. Cromatografía líquida de Alta Eficiencia	20
2. DESARROLLO EXPERIMENTAL	26
2.1. Equipo y Material	26
2.2. Muestras a analizar	27
2.3. Procedimiento Experimental	28
2.3.1 Diagrama de flujo	28
2.3.2 Desarrollo del método cromatográfico	29
2.3.3. Determinación de ácidos orgánicos en muestra problema	39
3 RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS	43
3.1 Desarrollo del método cromatográfico	43
3.3 Análisis de muestras comerciales	50
4. CONCLUSIONES	54
5. REFERENCIAS	55
6. ANEXOS	66

OBJETIVO GENERAL

- Desarrollar un método analítico por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) para separar identificar, y cuantificar los ácidos orgánicos más comúnmente presentes en las cervezas con el fin de inferir sobre su calidad

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Determinar las condiciones cromatográficas óptimas para la adecuada separación de los por HPLC.
- Realizar curvas de calibración para los analitos.
- Establecer el procedimiento adecuado de tratamiento de las muestras que permita la eliminación de interferencias en al determinación de ácidos orgánicos en cerveza.
- Aplicar el método desarrollado para la cuantificación de los ácidos orgánicos en muestras comerciales e inferir sobre su calidad.

INTRODUCCIÓN

Los ácidos orgánicos y el CO₂ son las sustancias responsables de la acidez y del placentero sabor ácido de la cerveza; además de tener efectos fisiológicos positivos, como por ejemplo el de ser diuréticos y el de reducir el nivel de ácido úrico entre otros [1-3]. Sin embargo, también tiene aspectos negativos como es el de conferir a la cerveza, un sabor no deseado de vinagre, resultado de la fermentación del ácido acético por la bacteria (*Acetobacter* spp., *Gluconobacter* spp.). Los ácidos orgánicos existentes en la cerveza son esencialmente metabolitos intermediarios o productos liberados por las levaduras de la fermentación. Su concentración total no es grande; en cervezas clásicas existen en un intervalo de 220 a más de 500 ppm [11]. Los ácidos más frecuentes se conocen por sus nombres comunes, por ejemplo ácido metanoico o fórmico, HCOOH; ácido etanoico o ácido acético que en estado diluido e impuro forma parte del vinagre.

Muchos ácidos carboxílicos son esenciales en la química de los organismos vivos, siendo algunos de gran importancia industrial; éstos ácidos son compuestos orgánicos que contienen uno, dos o más grupos carboxilo (—COOH).

La cromatografía es un método físico de separación basado en la distribución de los componentes de una mezcla entre dos fases inmiscibles, una fija o estacionaria y otra móvil. En cromatografía líquida, la fase móvil es un líquido que fluye a través de una columna que contiene a la fase fija. La cromatografía líquida de alta resolución a menudo es utilizada para la identificación, determinación y cuantificación de analitos que están presentes a nivel traza en diferentes matrices complejas. En la industria alimenticia por lo general se desarrollan numerosos métodos basados en este tipo de cromatografía, pues el tratamiento de muestra es simple y a veces se inyecta de manera directa.

En el sector cervecero, se han desarrollado métodos cromatográficos específicos para identificar y cuantificar un sólo ácido orgánico o un fenol [4-6]. Asimismo, se han realizado análisis cuantitativo de estos ácidos en una simple corrida de separación, en columnas empacadas con copolímero divinil benzen—

estireno sulfonato (DVB-S), con una resolución pobre de algunos de estos compuestos debido a la interferencia por parte de compuestos fenólicos. Para evitar dicha interferencia, algunos autores [7] han propuesto un sistema de columna-dual con detectores de UV y de índice de refracción (RI) conectados en serie. El uso del detector de RI parecía reducir interferencia de los compuestos fenólicos al llevarse a cabo el análisis de ácidos orgánicos [8]. Para optimizar la separación, fue propuesta una limpieza de la muestra previa al análisis usando al mismo tiempo extracción en fase sólida y resinas de intercambio iónico [9]. Sin embargo, este procedimiento aumenta los costos y la duración de análisis.

Cuando se desarrolla una técnica analítica por HPLC, normalmente se elige, en primer lugar, una fase estacionaria adecuada. Luego se selecciona una fase móvil, tipo de solvente y composición, de manera tal que disuelva los componentes a analizar y que permita una buena separación. Luego se optimizan las condiciones de flujo de solvente, cantidad de muestra a inyectar y, en el caso de un detector Espectrofotométrico como el que se empleará en este caso, se determinarán la/s longitud/es de onda de detección.

El presente trabajo se plantea la separación, identificación y cuantificación satisfactoria de siete ácidos orgánicos representativos (pirúvico, málico, láctico, acético, cítrico, succínico y fumárico) contenidos en la cerveza por HPLC incluyendo el desarrollo de un método simple de tratamiento de la muestra, tal que permita cuantificar los ácidos orgánicos de una manera rápida y práctica en diferentes tipos de cerveza.

I. GENERALIDADES

1. Cerveza

1.1. Origen e historia

La cerveza es una bebida natural, alcohólica muy antigua, desarrollada por los pueblos de los imperios mesopotámicos y por los egipcios, resultado de fermentar los cereales germinados en agua, en presencia de levadura.

Las materias primas necesarias para la fabricación de cerveza son sólo cuatro - malta de cebada, agua, levadura y lúpulo - aunque la mayoría de las cervezas comerciales utilizan además otra fuente de carbohidratos, (habitualmente un cereal no malteado), un antioxidante y un estabilizante de la espuma. Durante el proceso de elaboración suelen añadirse enzimas comerciales para favorecer la hidrólisis de los respectivos polímeros aportados por las materias primas, y un colorante, que permite intensificar y uniformizar el color del producto final.

No obstante cualquier cerveza contiene más de 400 componentes. Muchos de estos componentes proceden de las materias primas y no han sufrido modificaciones en el proceso de elaboración; otros constituyentes, entre los que se encuentran el anhídrido carbónico y el alcohol etílico, son consecuencia de la transformación experimentada por las materias primas. Los componentes de ambos grupos se encuentran siempre presentes en la cerveza y confieren las propiedades nutritivas y funcionales de esta bebida.

Ocasionalmente se pueden encontrar en la cerveza algunas sustancias, en concentraciones muy minoritarias procedentes, por ejemplo, de la eventual contaminación de las materias primas (plaguicidas, metales pesados, micotoxinas, etc.) o de la actividad de microorganismos contaminantes que puedan estar presentes junto con la levadura cervecera en la fermentación; este grupo de sustancias guarda estrecha relación con las características sanitarias de la cerveza.

Aunque existen en el mercado cervezas de trigo, mijo y arroz, la más habitual es la obtenida a partir de la fermentación de la cebada. Una vez embebida de agua, la cebada se deja germinar a fin de que el almidón se convierta en azúcar soluble. Ya alcanzado este proceso, se seca y se tuesta más o menos, según se quiera obtener una cerveza pálida, dorada o negra. Para conseguir ese sabor amargo que caracteriza a la cerveza, se le añade lúpulo o, más exactamente, su flor, un cono de pétalos dorados que contiene resinas y aceites aromáticos. El lúpulo se añade durante el proceso de ebullición de la cerveza, en las tinas de cobre, al tiempo que también se adiciona el azúcar. Sin la presencia del lúpulo, la masa en ebullición o *Wort* podría utilizarse para la destilación de whisky.

Si la cerveza tiene mucho gas carbónico, ya sea natural o añadido, se denomina "Lager". La cerveza tipo "Stout" es oscura y densa, algo dulzona, característica de Irlanda e Inglaterra. La tipo "Bock" es densa y guarda algo de aroma de las levaduras. La cerveza clara es una clase inglesa, suave, endulzada y con intenso sabor a lúpulo.

Desde 1945 la industria cervecera ha logrado un gran desarrollo; entre 1945 y 1965 se duplicó la producción mundial. El aumento de la producción y del consumo ha sido notable en países como Japón, URSS, México y España.

1.1.2. COMPONENTES BÁSICOS DE LA CERVEZA

La Tabla 1 muestra los componentes básicos que existen comúnmente en las cervezas

Tabla1. Principales componentes en una cerveza típica

INGREDIENTES	NIVELES TÍPICOS (g/100 mL)
Agua	92-95
Alcohol	2.5-3.5
Carbohidratos totales*	< 0.2
Proteínas totales, péptidos y aminoácidos	0.2-0.6
Lípidos	Despreciable
Minerales	0.2-0.3
Vitaminas y otros micronutrientes	0.002
Fibra	0.3-1.0
Polifenoles y compuestos del lúpulo	0.002-0.06

* a los cuales pertenecen los azúcares libres

1.2. PROCESO DE ELABORACION DE LA CERVEZA.

El proceso de la elaboración de la cerveza consta de varias etapas mostradas en el diagrama 1.

Las variedades de cerveza además dependen de:

- ◆ La cantidad y tipo de materia
- ◆ Tipo y naturaleza de agua cervecera
- ◆ Tipo y naturaleza de levadura cervecera
- ◆ Tiempos y temperaturas en cocimiento
- ◆ Tiempos y temperaturas en fermentación
- ◆ Procesos de elaboración

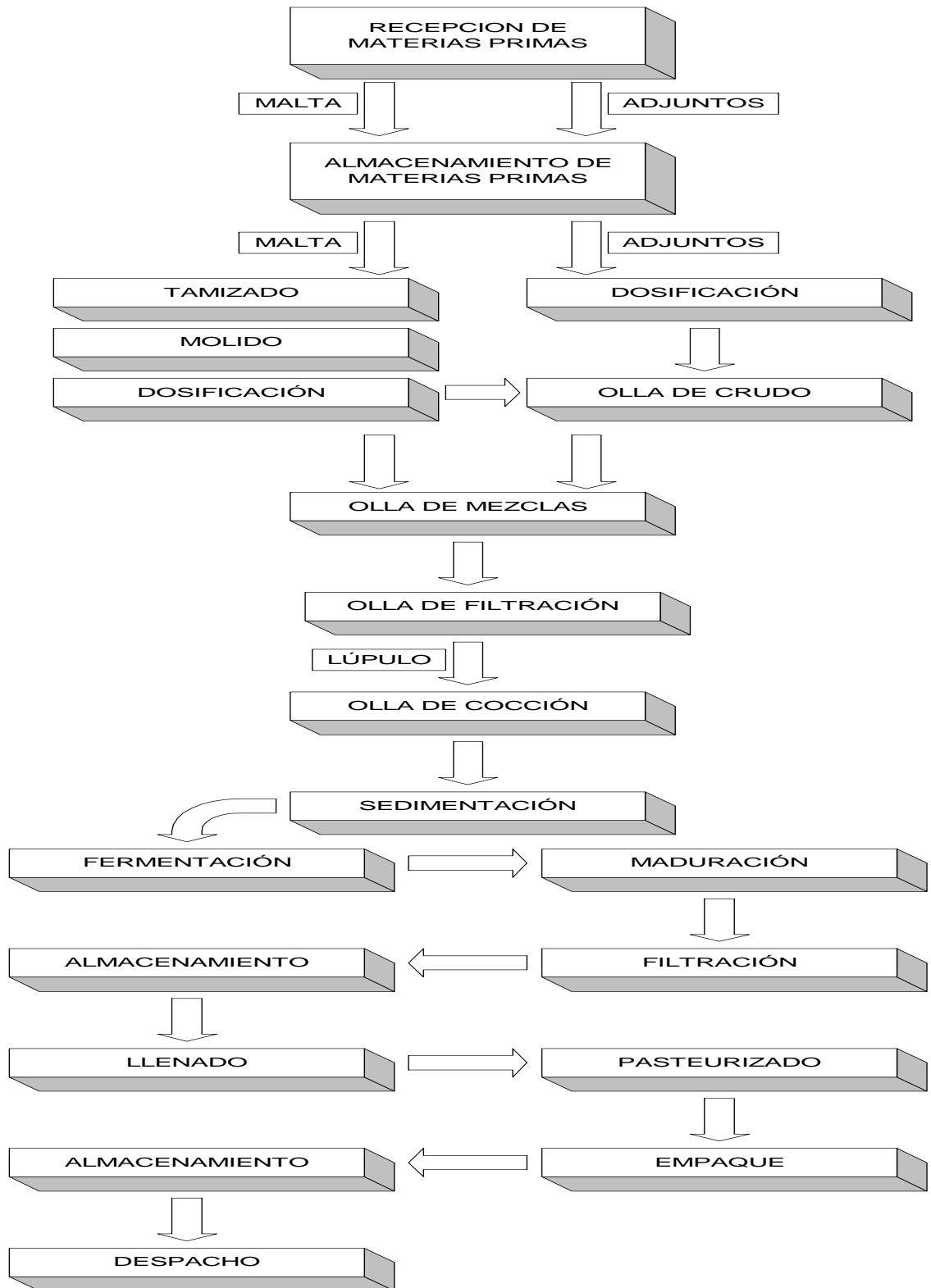


Diagrama 1. Etapas del proceso de la elaboración de la cerveza

Como se menciono anteriormente la cerveza es una mezcla compleja, donde se han caracterizado en ella más de 400 componentes diferentes. Algunos de los constituyentes de la cerveza son derivados de las materias primas y permanecen sin cambiar durante el proceso de fabricación. Otros son el resultado de transformaciones químicas y bioquímicas de las materias primas durante la elaboración. Juntamente todos esos constituyentes le dan el carácter a la cerveza pero, en general, diferentes cervezas contienen proporciones diferentes de los mismos componentes más algunos constituyentes nuevos. No obstante, contaminación accidental o deliberada de la cerveza con microorganismos, aparte de la levadura, bien podría producir nuevos metabolitos [10].

Los constituyentes de la cerveza pueden ser divididos en componentes volátiles y no volátiles. Los constituyentes volátiles tienen una alta presión de vapor y son los responsables del aroma de la cerveza. Ellos están concentrados en el espacio de cabeza de los envases de cerveza [9]. Los componentes volátiles incluyen alcoholes, ésteres, aldehídos, cetonas, ácidos orgánicos, compuestos azufrados, aminas, compuestos fenólicos volátiles, algunos hidrocarburos y lactosas [10]. Los constituyentes no volátiles incluyen sales inorgánicas, azúcares, aminoácidos, nucleótidos, polifenoles y la resina de lúpulo, junto con macromoléculas tales como polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos [9].

El proceso general de elaboración de cerveza en su forma elemental se puede resumir en los siguientes pasos:

- La cebada malteada se tritura para obtener una harina muy gruesa. A continuación se le añade agua para formar una masa o papilla y estimular los enzimas de la malta a solubilizar el endospermo degradado de la malta molida.

El extracto acuoso, denominado mosto, se separa de los sólidos mediante filtración y la aspersion de más agua caliente sobre la masa. Una vez extraído el mosto se añade el lúpulo, el cual aportará a la cerveza sus características aromáticas propias. A continuación se realiza la cocción con lo que se detiene la acción enzimática, se esteriliza el mosto y se coagulan las proteínas.

- En la siguiente etapa, el mosto se clarifica, enfría y airea, para conseguir las condiciones ideales de crecimiento de las levaduras y el comienzo de la fermentación. Durante la fermentación, gran parte de los hidratos de carbono se convierten en alcohol y dióxido de carbono, mientras que otros metabolitos de las levaduras confieren aroma y sabor.

La cerveza de fermentación o cerveza verde se deja madurar en los depósitos de guarda, donde se mantiene a baja temperatura para que tenga lugar la fermentación secundaria con la levadura arrastrada y precipiten las sustancias que de otro modo enturbiarían la cerveza.

- Por último, se realiza las operaciones de carbonatación, pasterización y envasado, cuyo orden dentro del proceso depende del tipo de envase utilizado [11].

El arte de fabricar cerveza ha sido parte hereditaria del hombre por miles de años. Por mucho tiempo, la cerveza se ha producido y consumido sin el beneficio de la estabilización biológica practicada hoy. Todavía al final del siglo XIX, la cervecería era predominantemente una empresa local y, desde entonces la cerveza no era distribuida a largas distancias o almacenada por un periodo de tiempo apreciable. Por ello la pérdida por estabilidad no era un problema. En los últimos 100 años la tecnología y la necesidad han fomentado que la industria produzca un producto que permanezca estable a temperatura ambiente aún después de un almacenamiento extenso [12].

El comienzo de los procesos de estabilización microbiológica moderna puede ser descrito por los trabajos hechos por Louis Pasteur. Los experimentos de Pasteur demostraron que el calentamiento del producto final a temperaturas suficientemente altas destruiría los microorganismos indeseables y evitaría el subsiguiente daño a la calidad [12]. El proceso térmico aplicado a la cerveza por Luis Pasteur en 1870, estableció que temperaturas de 50 a 55 °C son suficientes para preservar la cerveza, pero no se especificó el tiempo de exposición [13].

Pasteurización de la Cerveza

La pasteurización podría definirse como un proceso térmico en el que temperaturas crecientes son usadas durante un periodo de tiempo preestablecido para destruir microorganismos indeseables en un producto [13]. El proceso no debería alterar perjudicialmente la calidad del producto a un nivel que resulte en una preservación del gusto y “flavor” incluso durante su almacenamiento [14], pero el objetivo primordial es asegurar la estabilidad biológica del mismo prolongando su tiempo de vida [13].

1.3. Flavor

El “flavor” (termino técnico utilizado por cerveceros) ha sido descrito como una compleja sensación que comprende el gusto, olor, aspereza o suavidad, caliente o frío, acritud o desabrido [10]. Para propósitos de análisis sensorial. Si se considera a la cerveza dentro de este contexto el gusto y el olor son indudablemente las propiedades más importantes [10].

La calidad de la cerveza se halla en los ojos, nariz, boca y mente del consumidor. Sin embargo, aquello que se ve, huele, saborea y piensa es a veces imposible de descubrir. La investigación del consumidor puede dar cierta información, pero a menudo descansa en la responsabilidad del personal técnico de interpretar los deseos del segmento del mercado al cual se dirige el producto [15].

Comparado con otras bebidas alcohólicas la cerveza muestra una pobre estabilidad del “flavor”. La aplicación de sistemas más rápidos, equipo de escala sobredimensionado, largas distancias de distribución, almacenamiento extendido bajo condiciones indeseables, y la tendencia a cerveza de baja gravedad están incrementando este problema. Ciertas tipos de cervezas son más o menos susceptibles a cambios en aroma y “flavor” durante la fermentación, almacenamiento y envejecimiento. El contenido de oxígeno durante el empaqueo y la temperatura durante la distribución y almacenamiento son parámetros importantes que afectan la estabilidad del “flavor” en la cerveza [17]. Dentro de

los defectos de “flavor” en la cerveza se pueden citar los siguientes: granoso, cascaroso, astringente, diacetilo, mohocidad, medicinal, azorrillada, sulfuro de dimetilo, éster, vinoso, carácter de casa y oxidación [16].

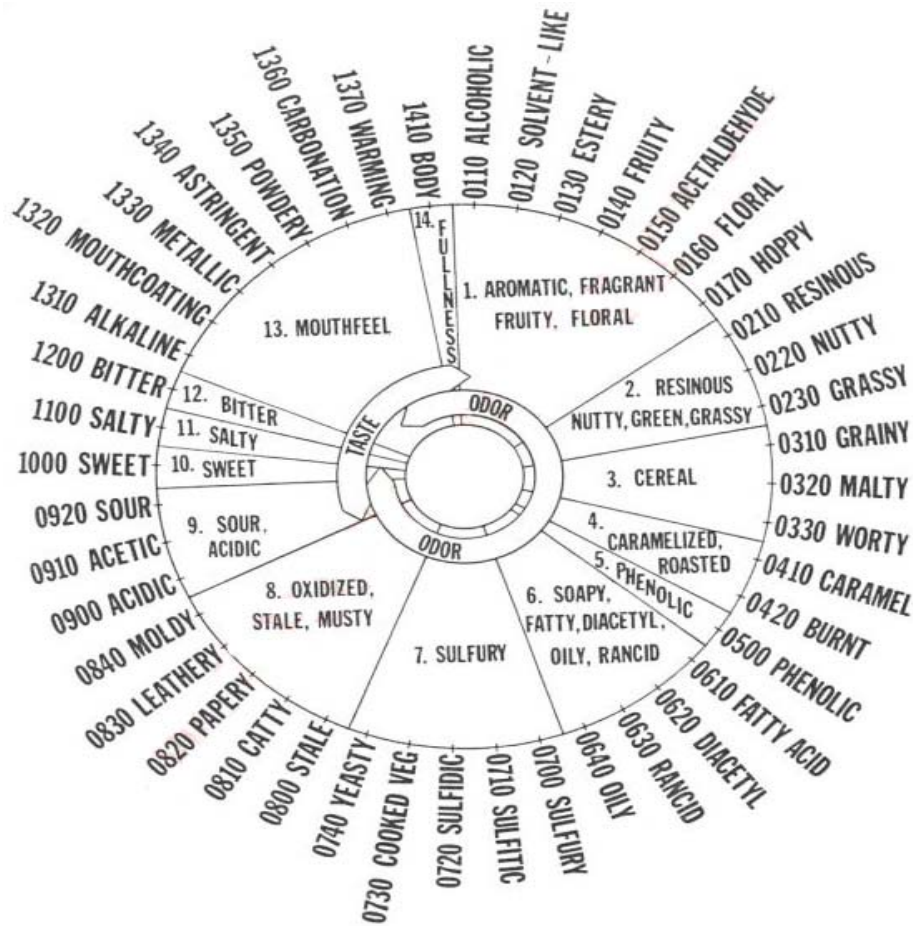


Figura 2: Rueda de “Flavor” de Cerveza

Fuente: Rueda de “flavor” desarrollada por la Sociedad Americana de Químicos Cerveceros, Convención Europea Cervecera y la Asociación de Maestros Cerveceros de las Américas

1.4. ÁCIDOS CARBOXÍLICOS

A los compuestos que contienen el grupo carboxilo (abreviado -COOH o CO₂H) se les denomina ácidos carboxílicos. El grupo carboxilo es el origen de una serie de compuestos orgánicos entre los que se encuentran los haluros de ácido (RCOCl), los anhídridos de ácido (RCOOCOR), los ésteres (RCOOR') y las amidas (RCONH₂).

1.4.1. Estructura y nomenclatura.

El grupo carboxilo, -COOH, es formalmente una combinación de un grupo carbonilo y de un hidroxilo. Algunos ácidos orgánicos se conocen desde hace cientos de años y sus nombres comunes reflejan sus orígenes históricos. El ácido carboxílico más simple, el ácido fórmico, es el causante de la irritación causada por la picadura de las hormigas (del latín formica, hormiga). El ácido acético se aisló del vinagre, cuyo nombre en latín es acetum (agrio). El ácido propiónico se consideró como el primer ácido graso, y su nombre deriva del griego protos pion (primera grasa). El ácido butírico se obtiene por oxidación del butiraldehído, que se encuentra en la mantequilla (en latín butyrum). Los ácidos caproico, caprílico y cáprico se encuentran en las secreciones cutáneas de las cabras (*capri* en latín).

La nomenclatura IUPAC para los ácidos carboxílicos emplea el nombre del alcano que corresponde a la cadena más larga de átomos de carbono, que incluye al ácido carboxílico. La o final de alcanos se sustituye por el sufijo *oico*, y se antepone la palabra ácido.

Tabla 2. Nombres comunes y los nombres IUPAC de los ácidos carboxílicos simples.

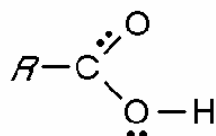
Estructura	Nombre IUPAC	Nombre común	Fuente natural
HCOOH	Ácido metanoico	Ácido fórmico	Destilación destructiva de hormigas (formica en latín)
CH ₃ COOH	Ácido etanoico	Ácido acético	Fermentación del vino
CH ₃ CH ₂ COOH	Ácido propanoico	Ácido propiónico	Fermentación de lácteos (pion en griego)
CH ₃ CH ₂ CH ₂ COOH	Ácido butanoico	Ácido butírico	Mantequilla (butyrum, en latín)
CH ₃ (CH ₂) ₃ COOH	Ácido pentanoico	Ácido valérico	Raíz de la valeriana officinalis
CH ₃ (CH ₂) ₄ COOH	Ácido hexanoico	Ácido caproico	Pelo de cabra

1.4.2. PROPIEDADES FÍSICAS

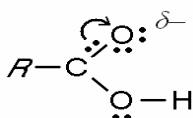
Los ácidos de masa molar baja (hasta diez átomos de carbono) son líquidos incoloros, de olor muy desagradable. El olor del vinagre se debe al ácido acético; el de la mantequilla rancia al ácido butírico. El ácido caproico se encuentra en el pelo y secreciones del ganado caprino. Los ácidos C5 a C10 poseen olores a “cabra”. El resto sólidos cerosos e inodoros a temperatura ambiente. Sus puntos de fusión y ebullición crecen al aumentar la masa molar.

Los ácidos inferiores son solubles en agua; su solubilidad decrece a partir del ácido butírico con el aumento del carácter hidrocarbonado de la molécula. Todos los ácidos son solubles en solventes orgánicos

La fórmula electrónica de un ácido carboxílico se representa de la forma siguiente:

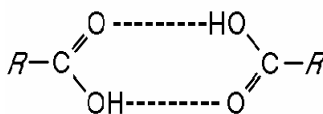


La densidad electrónica del enlace — C = O , está desplazada hacia el átomo de oxígeno más electronegativo adquiriendo este una carga parcial negativa. A la vez en el enlace oxígeno-hidrógeno hay un desplazamiento electrónico hacia el átomo de oxígeno, lo que permite la salida del hidrogeno como protón:



Cuando se ioniza un ácido carboxílico, el anión carboxilato que se produce tiene una carga negativa deslocalizada y compartida entre los dos átomos de oxígeno. Los ácidos carboxílicos en general tienen una K_a de 10^{-5} a 10^{-3} , y son más ácidos que los alcoholes y el agua (K_a del orden de 10^{-8} y 10^{-14} respectivamente)

El grupo hidroxilo permite la formación de asociaciones moleculares por puente de hidrógeno.



La asociación de dos moléculas (dímero) mediante un puente de hidrógeno hace que la temperatura de ebullición sea mayor que la de compuestos heterólogos (sustancias que presentan el mismo número de carbonos y pertenecen a funciones diferentes). La presencia en estos compuestos del grupo funcional carboxilo, así como la característica de la cadena carbonada, son factores determinantes de las propiedades físicas.

La irregularidad de las temperaturas de fusión esta relacionada con el modo en que se disponen las moléculas cuando el compuesto adquiere el estado sólido. En las moléculas con número par de átomos de carbono, los grupos carboxilo y metilo terminales, están situados en lados opuestos de la cadena carbonada dispuesta en zigzag, lo que permite, que las moléculas se dispongan más juntas en el retículo, razón por la cual aumentan las fuerzas de atracción intermoleculares y la temperatura de fusión.

Los ácidos que tienen hasta cuatro átomos de carbono son solubles en agua, esta propiedad disminuye con el aumento de la cadena y, por tanto la masa molar, ya que predomina en la molécula la porción de hidrocarburo con respecto al grupo carboxilo. Por ello, el ácido de cinco átomos de carbono ya es poco soluble en agua y los demás son prácticamente insolubles en ella.

1.4.3. PROPIEDADES QUIMICAS

Reacciones ácido-base.

Un ácido carboxílico se puede disociar en agua para dar un protón y un ión carboxilato. Normalmente, los valores de la constante de acidez (K_a) de los ácidos carboxílicos simples son de alrededor de 10^{-5} . Por ejemplo, la constante de acidez del ácido acético (CH_3COOH) es de $10^{-4.7}$.

Aunque los ácidos carboxílicos no son tan ácidos como los ácidos minerales, son mucho más ácidos que otros grupos funcionales que se han estudiado. Por ejemplo, el ácido acético es 10^{11} veces más ácido que los alcoholes más ácidos. De hecho, el ácido acético concentrado puede provocar quemaduras graves en contacto con la piel.

La disociación de un ácido o un alcohol implica, en ambos casos, la ruptura heterolítica de un enlace O-H, pero cuando la disociación se produce sobre el ácido carboxílico se genera un ión carboxilato con la carga negativa repartida por igual sobre dos átomos de oxígeno, mientras que la ionización de un alcohol genera un ión alcóxido, en el que la carga negativa se encuentra casi en su totalidad sobre un solo átomo de oxígeno. La deslocalización de la carga en el ión

carboxilato hace que éste sea mucho más estable que un ión alcóxido y por tanto, la disociación de un ácido carboxílico es menos endotérmica que la de un alcohol.

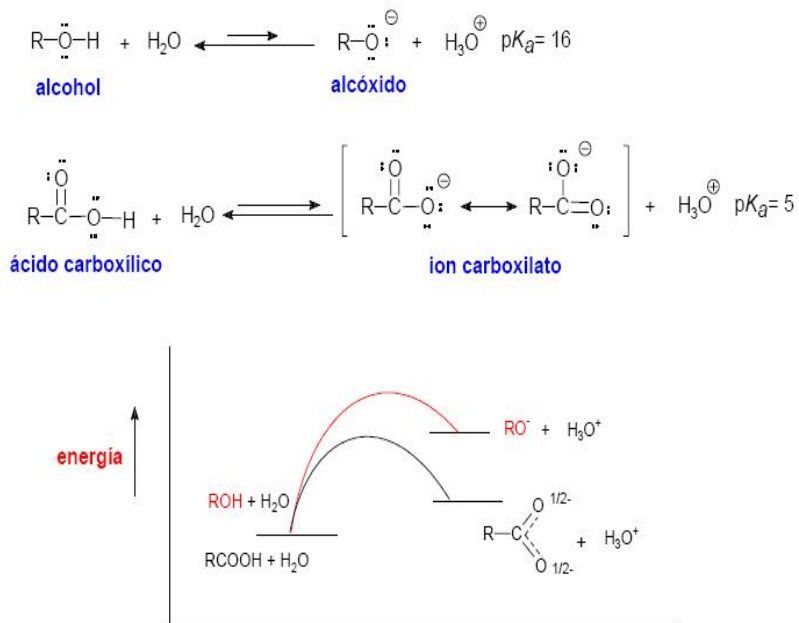


Fig. 3. Efecto inductivo y fuerza ácida.

Un sustituyente que estabilice al ión carboxilato aumenta la disociación y produce un ácido más fuerte. Los átomos electronegativos aumentan la fuerza de un ácido porque su efecto inductivo electrón-atrayente contribuye a deslocalizar la carga negativa del ión carboxilato. Este efecto inductivo puede ser muy grande si están presentes uno o más grupos electrón-atrayentes en el átomo de carbono.

Por ejemplo, el ácido cloroacético (ClCH_2COOH) tiene un pK_a de 2.86, lo que indica que es un ácido más fuerte que el acético ($pK_a = 4.74$). El ácido dicloroacético (Cl_2CHCOOH) es todavía más fuerte, con un pK_a de 1.26. El ácido tricloroacético (Cl_3CCOOH) tiene un pK_a de 0.64, comparable en fuerza a algunos de los ácidos minerales.

1.5. CROMATOGRAFÍA

1.5.1. GENERALIDADES

La cromatografía se define como una técnica analítica que tiene como fin separar una mezcla de compuestos. En todas las separaciones cromatográficas, la muestra es desplazada por una fase móvil, que puede ser un gas, un líquido o un fluido supercrítico. La fase móvil se hace pasar a través de una fase estacionaria con la que es inmisible y que se fija a una columna o a una superficie sólida. Las dos fases se eligen de tal forma que los componentes de la muestra se distribuyen de modo distinto entre la fase móvil y la fase estacionaria. Aquellos componentes que son fuertemente retenidos por la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil, por el contrario, los componentes que se unen débilmente a la fase estacionaria, se mueven con mayor rapidez. Como consecuencia de la diferencia de movilidad, los componentes de la muestra, se separan en bandas o zonas que pueden analizarse cualitativamente o cuantitativamente.

1.5.2. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

La HPLC es una técnica cromatográfica de reparto o posición en la que la muestra se fracciona entre una fase móvil que es líquida y una fase estacionaria. Utiliza una presión muy elevada para forzar el paso del disolvente por una columna que contiene partículas muy finas, consiguiendo así separaciones de gran resolución. Debido a estas presiones el equipo para HPLC es elaborado y costoso.

Deriva de una evolución de la cromatografía en columna, cuyos resultados, en términos de selectividad y de resolución han mejorado mucho por la miniaturización y la utilización de fases estacionarias muy elaboradas.

Es la técnica más utilizada de todos los tipos de cromatografía de elución, conociéndose como tal al desplazamiento de un soluto de la fase estacionaria por un disolvente.

Elección del Solvente:

Características:

- Disponible comercialmente.
- Precio.
- Pureza y estabilidad.¹
- Miscible con otros solventes para formar mezclas útiles.
- No Degradar o disolver la fase estacionaria.
- Tener baja viscosidad para reducir las caídas de presión.
- Ser compatible con el detector utilizado.
- Transparencia óptica (cuando se usan detectores UV).

Filtración y Desgasificación de solventes

En la actualidad HPLC ha llegado a ser una de las Técnicas del Laboratorio Moderno más importantes como herramienta analítica para separar y detectar compuestos químicos. Como en todas las técnicas analíticas, los pequeños problemas a la larga pueden llegar a tener un mayor impacto en la exactitud y durabilidad del sistema. Aun con la evolución de los cromatógrafos líquidos en la era de la computadora, hay aun problemas que ésta no puede resolver.

Hasta los Solventes para HPLC, todos filtrados cuidadosamente en la fábrica, pueden acumular partículas en suspensión que pueden ser perjudicial a los componentes del sistema HPLC. Estas partículas en suspensión pueden venir de

¹ En la actualidad contamos con productos de calidad de pureza cromatográfica. Bajo contenido de impurezas.

varias fuentes, incluso de la exposición al polvo en el aire durante el trasegado de solvente en el depósito para solvente, la exposición a partículas del aire durante el almacenamiento del solvente en el depósito del solvente, la degradación lenta del recipiente solvente, o de condensación y polimerización del solvente. Las partículas pueden ocasionar costosos daños a la bomba HPLC, al guarda columnas, y en general causar desgaste del sistema de HPLC. Los fabricantes de los instrumentos tienen en cuenta este problema y recomiendan que se filtre y desgasifique los solventes HPLC antes de usarlos.

En el instante que se abre una nueva botella de solvente para HPLC se expone el interior del solvente a la atmósfera y empieza a acumular gases disueltos que se encuentran en la atmósfera. El trasegado del solvente en el depósito solvente y su almacenamiento en estos depósitos más este fenómeno. El Oxígeno Disuelto que constituye el 21% de la atmósfera puede producir mayor interferencia en los detectores de fluorescencia y electroquímicos. El Nitrógeno Disuelto es el otro componente de la atmósfera que puede producir burbujas en la columna de HPLC y cuando el solvente entra al detector produce picos falsos y desviaciones de la línea base. El Dióxido de Carbono disuelto algunas veces puede ser la causa de los cambios de pH en el sistema de solvente.

Métodos de Filtración de Solventes en HPLC

Hay tres métodos comunes que se utilizan hoy para la filtración previa de los Solventes en HPLC:

- Filtro a la Entrada del Solvente
- Filtración al Vacío
- Filtración en Línea

Métodos de Desgasificación de Solventes en HPLC

Existen cuatro métodos comunes usados para desgasificar solventes en HPLC previos a su uso:

- Sonificación
- Burbujear Helio

- Desgasificación Electrónica en la Línea del Flujo
- Desgasificación al Vacío en Línea

Bombas

Requisitos o aspectos más importantes que debe reunir una bomba o sistema de bombeo:

- Debe producir presiones estables hasta 6000 psi.
- Mantener el flujo libre de pulsaciones
- Generar intervalos de caudales de flujo (0,1 a 10 ml/min)
- Control y reproducibilidad del flujo de solvente
- Componentes de la bomba resistentes a la corrosión

Las bombas que se usan en HPLC se pueden clasificar según su funcionamiento y diseño en:

- Mecánicas
- Recíprocantes
- De desplazamiento continuo
- Neumáticas

Programación del Solvente

Existen dos métodos de programación de Solvente en HPLC:

- Isocrático
- Gradiente de elución. Es un término que se utiliza para describir el proceso mediante el cual se cambia la composición de la fase móvil. Pueden efectuarse de dos maneras:
 - A baja presión
 - A alta presión

Cuando se desarrolla un análisis usando el método de gradiente se debe tener presente dos objetivos:

Obtener la mejor resolución de los componentes de la muestra en el menor tiempo posible.

- Asegurar alta precisión y exactitud.
- Para obtener buenos resultados con el método de gradiente debemos seguir

5 pasos fundamentales:

- Determinar la composición inicial y final del solvente
- Ajustar el tiempo del gradiente
- Determinar la forma del gradiente (lineal, cóncava o convexa)
- Ajustar la velocidad del flujo para mejorar la resolución
- Regresar a las condiciones iniciales la columna.

Sistemas de Inyección de muestra

Estos sistemas han variados durante la historia del sistema de HPLC, en un principio se utilizaba la inyección de la muestra con jeringas de alta presión, las cuales ya están de desuso. Hoy se utiliza el sistema de Válvulas inyectoras.

Detección

La eficiencia de un detector cromatográfico depende de la relación entre la cantidad física medida y la composición del efluente, así como también de las características de la señal de transferencia.

Los tipos de detectores en HPLC se clasifican en:

- Detectores basados en una propiedad de la fase móvil. *Ejemplo: Detector de Índice de Refracción*
- Detectores basados en una propiedad de la sustancia a separar. *Ejemplo: Detector de Fluorescencia, Detector Ultravioleta*
- Los detectores más utilizados en HPLC son:
 - Detector UV. Hay básicamente tres tipos:
 - Detector de Longitud de Onda Fija
 - Detector de Longitud de Onda Variable

- Detector de Arreglo de Diodos
- Detector de Índice de Refracción.
 - Tipo Deflexión
 - Tipo Fresnel
- Detector de Fluorescencia.
- Detector de Fluorescencia Inducida por Láser
- Detectores Electroquímicos.
 - Detector Amperométrico
 - Detector Conductimétrico
 - Detector Potenciométrico

2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

2. 1. EQUIPO Y MATERIAL

- Equipo HPLC marca PERKIN-ELMER modelo 250, compuesto por una bomba binaria modelo Spectra System P2000, una válvula inyectora Rheodyne provista de un loop de inyección de 20 μL un detector de absorción UV-visible de longitud de onda variable modelo LC 290 de la misma marca y un integrador registrador modelo 3396 HEWLETT PACKARD.
- Balanza analítica Mettler H72.
- Sistema purificador de agua Millipore. (10 M Ω Cm)
- Ultrasonido Branson Mod. 2210.
- Jeringa Halminton con capacidad de 20 μL .
- pH metro Mettler Mod. MP 230
- Filtro poro 0.44 μm . Sartorius
- 1 parrilla con agitador. Corning Mod, PC-353 3
- vasos de precipitados de 200 mL. Kimax
- 1 probeta de 100 mL. P.K. México
- Embudo de vidrio. Kimax
- Matraz aforado de 100 mL. Pyrex
- Matraces aforados de 10, 25 y 50 mL. Pyrex
- Pipetas volumétricas de 1,2,3,4,5, 6, 7, 10 mL. Pyrex

2.2. MUESTRAS.

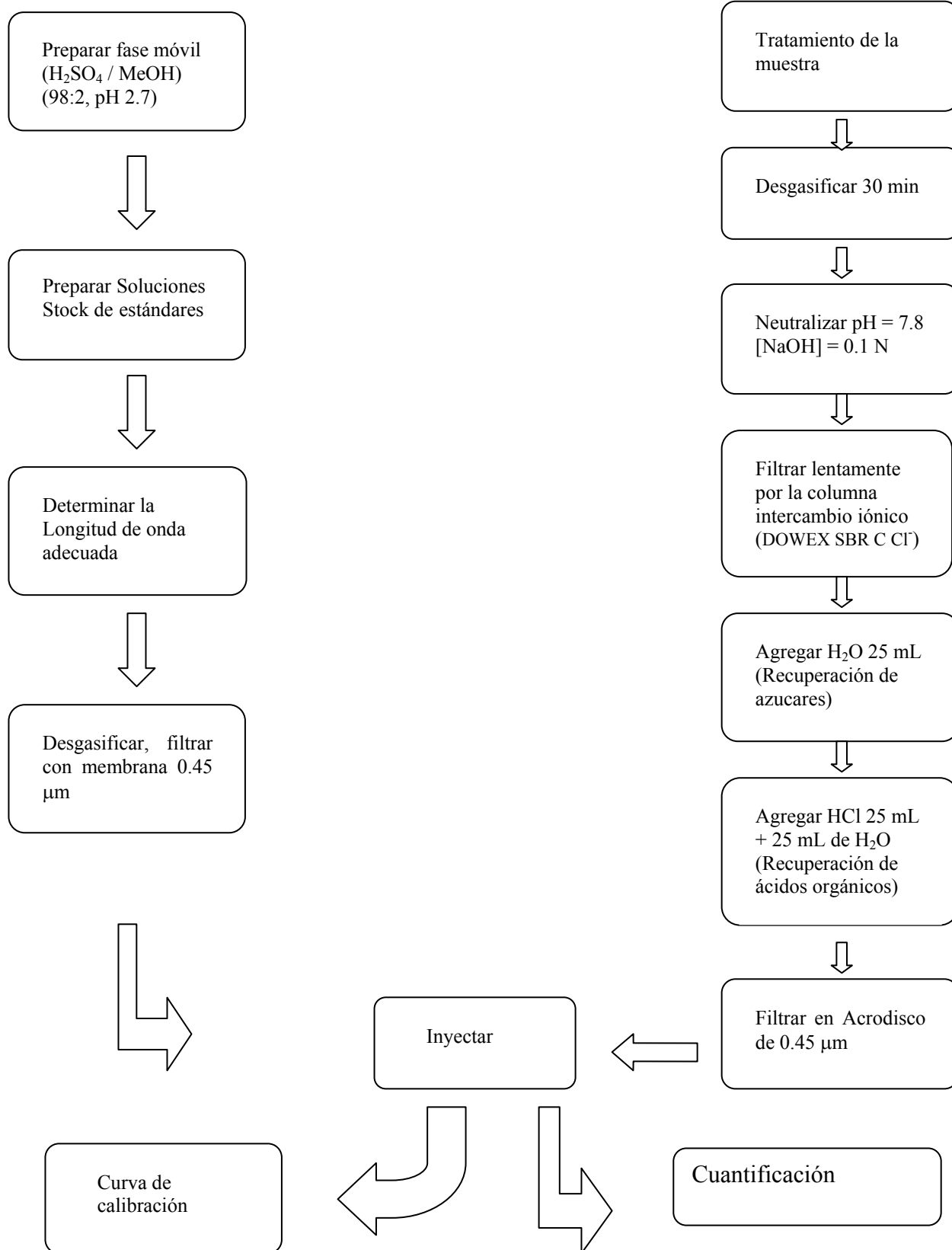
Las muestras son presentadas en la tabla 3 fueron elegidas de un solo fabricante (grupo Modelo) con el fin de inferir sobre su calidad, de acuerdo al estudio del método desarrollado en esta tesis; ya que en el mercado comercial estos tipos de cerveza el sabor y el precio difieren notablemente.

Tabla 3. Muestras a analizar.

CERVEZA	PRESENTACION	Vol (mL)	MUESTRA
NEGRA MODELO	BOTELLA DE VIDRIO	325	
VICTORIA TRADICIONAL	BOTELLA DE VIDRIO	355	
MEDELO ESPECIAL	BOTELLA VIDRIO	325	
MODELO ESPECIAL	BOTELLA DE LATA DE ALUMINIO	355	
CORONA EXTRA	BOTELLA DE VIDRIO BARRIL	325	
CORONA EXTRA	BOTELLA DE VIDRIO	355	
CORONA EXTRA	LATA DE ALUMINIO	355	

2.3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

2.3.1. DIAGRAMA DE FLUJO



2.3.2. DESARROLLO DEL METODO CROMATOGRAFICO

El plan de trabajo se dividió en tres etapas:

1. Establecer las condiciones cromatográficas óptimas para la separación y cuantificación de los ácidos orgánicos en cerveza mediante HPLC
2. Establecer el tratamiento de la muestra más adecuado para la eliminación de interferencias
3. Aplicación del método analítico para la identificación y cuantificación de los ácidos orgánicos en muestras de cerveza.

Cabe mencionar que al final de cada actividad realizada se presenta el resultado en forma de tabla con su correspondiente figura.

CONDICIONES ÓPTIMAS CROMATOGRAFICAS.

Antes de establecer las condiciones cromatográficas, se realizó una búsqueda del material bibliográfico, a partir del cual se exploraron algunas condiciones cromatográficas ya reportadas para iniciar el desarrollo de la metodología [18-21].

El paso siguiente fue la elección de estándares para su identificación y cuantificación en muestras de cerveza. Se seleccionaron ácido acético, cítrico, fumárico, láctico, málico, pirúvico y succínico pues son los que se encuentran en mayor concentración e influyen en el sabor de las cervezas [25].

Selección de las condiciones cromatográficas óptimas.

La bibliografía [19, 23, 25] sugiere el uso de un detector UV-VIS, pues todos los ácidos orgánicos a analizar dan respuesta para este detector.

Para elegir la columna, la bibliografía nos indica un análisis en fase reversa [18-23] con una fase estacionaria C₁₈. De este modo, se usó una columna con las siguientes especificaciones:

Tabla 4. Características de la columna utilizada en el trabajo.

Cat 50334	Hibar®
Lichrosorb ®100	Fertgsaule RT
RP- 18 (10µm)	Pre-Packed colum RT 250-4
No 329941	E. Merk Darmastad
7015033490/01-178108	FR Germany
250*4.6 mm id	

Acondicionamiento de la columna.

Se preparó una mezcla de acetonitrilo/ H₂O (50%/50%) se sonifico por 30 min. y se filtró con una membrana de 0.45µm. La columna se lavó con una esta mezcla por 30 minutos y se monitorio la línea a 215 nm (21), hasta que la línea base llegara a ser estable. Posteriormente se realizo una mezcla de H₂O/MeOH (50% /50%) y se realizo el mismo tratamiento.

Preparación de las soluciones estándar

Con el objeto de optimizar la composición de la fase móvil, se prepararon las soluciones de los ácidos orgánicos con la mejor resolución posible.

Toda el agua usada para los aforos fue desionizada, sonificada y filtrada con una membrana de 0.45µm millipore.

ACIDO PIRUVICO [65 ppm]

Pesar 13 mg. y aforar a 100 mL. Tomar de este última 12 mL. y aforar a 100 mL con agua

ACIDO. MÁLICO [225 ppm]

Pesar 22.50 mg y aforar a 100 mL con agua.

ACIDO LÁCTICO [250 ppm]

Pesar 25 mg y aforar a 100 mL con agua.

ACIDO ACÉTICO [250 ppm]

Pesar 25 mg y aforar a 100 mL con agua.

ACIDO CÍTRICO: [225 ppm]

Pesar a 22.5 mg y aforar a 50 mL con agua.

ACIDO SUCCÍNICO: [250 ppm]

Pesar 25 mg y aforar a 100 mL con agua.

ACIDO FURÁMICO: [112.5 ppm]

Pesar 11.25 mg y aforar a 100 mL con agua.

Elección de la fase móvil

Ya que la composición de la fase móvil interviene de manera directa en los tiempos de retención de cada analito y por ende en la separación y selectividad de éstos, se realizó un ensayo minucioso sobre su composición. Por lo general, en fase reversa se utiliza una fase móvil que contiene mayoritariamente H_2O , o mejor dicho, una solución amortiguadora y uno o dos solventes orgánicos con diferentes proporciones.

En principio, se partió de una fase móvil compuesta por H_2O la cual se le ajustó el $pH = 2.5$ con H_2SO_4 con una proporción (95%), MeOH (5%) [21], con un flujo de 0.5 ml/min. Se inyectó cada estándar por separado para establecer su tiempo de retención y verificar la pureza del mismo. Posteriormente, se inyectó la mezcla de los ácidos (Figura 1).

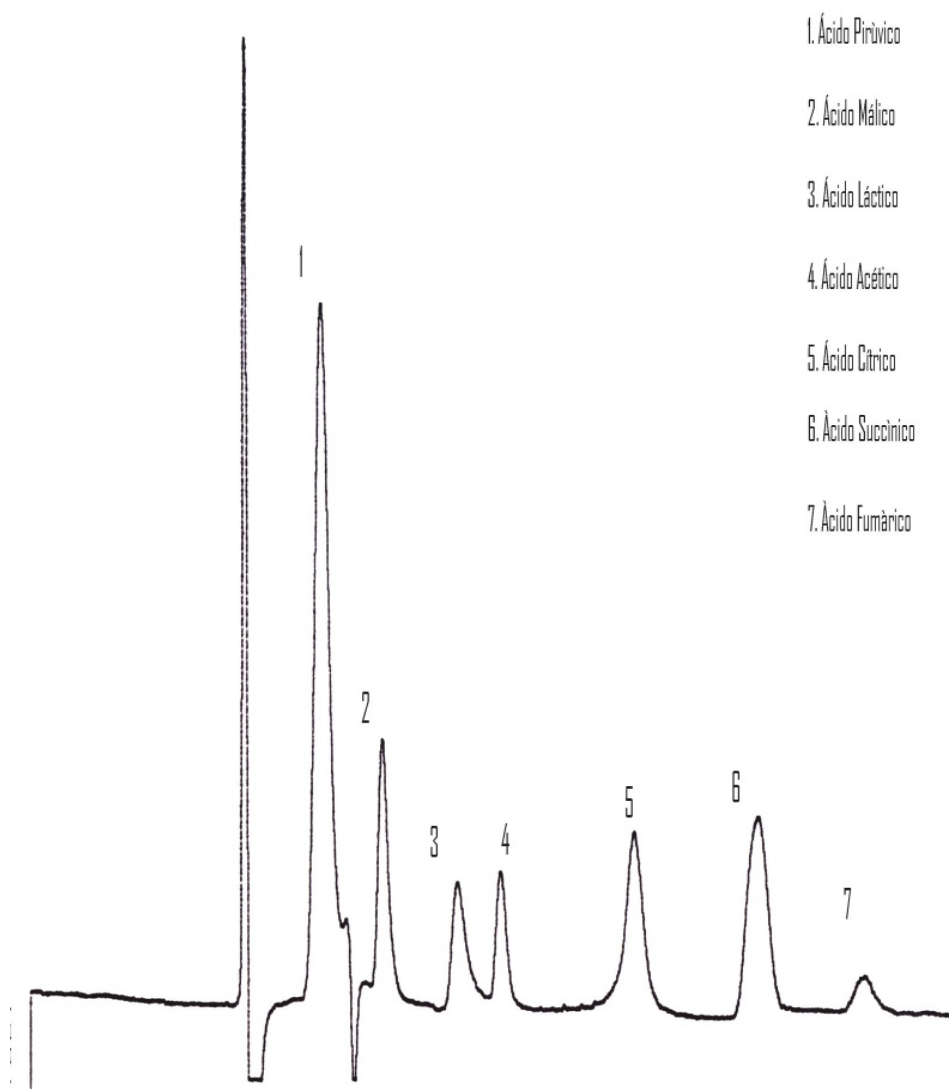


Fig. 4. Separación para la mezcla de estándares bajo las condiciones: Fase móvil: H₂SO₄ pH = 2.5 (95%), MeOH (5%). FLUJO: 0.5 mL/min. Longitud de onda: 215 nm. VOLUMEN DE INYECCION: 20 µL COLUMNA:Lichrosorb ®100 250*4.6 mm id

Tabla 5. Resultados obtenidos para el análisis de ácidos orgánicos (pH 2.5).

Analito	Ácido pirúvico	Ácido Máfico	Ácido Láctico	Ácido Acético	Ácido Cítrico	Ácido Succínico	Ácido fumárico
T _R (min.)	5.62	6.05	7.27	7.83	9.71	11.0	12.47

Como se puede observar, esta composición permite lograr una separación satisfactoria. Sin embargo, con el objeto de afinar estas condiciones, se decide ensayar pequeñas variaciones del pH, sin cambiar la naturaleza de la solución

amortiguadora. Para este fin, se preparó la fase móvil H_2SO_4 pH = 3.0 (95%), MeOH (5%). La figura 2 muestra el resultado obtenido.

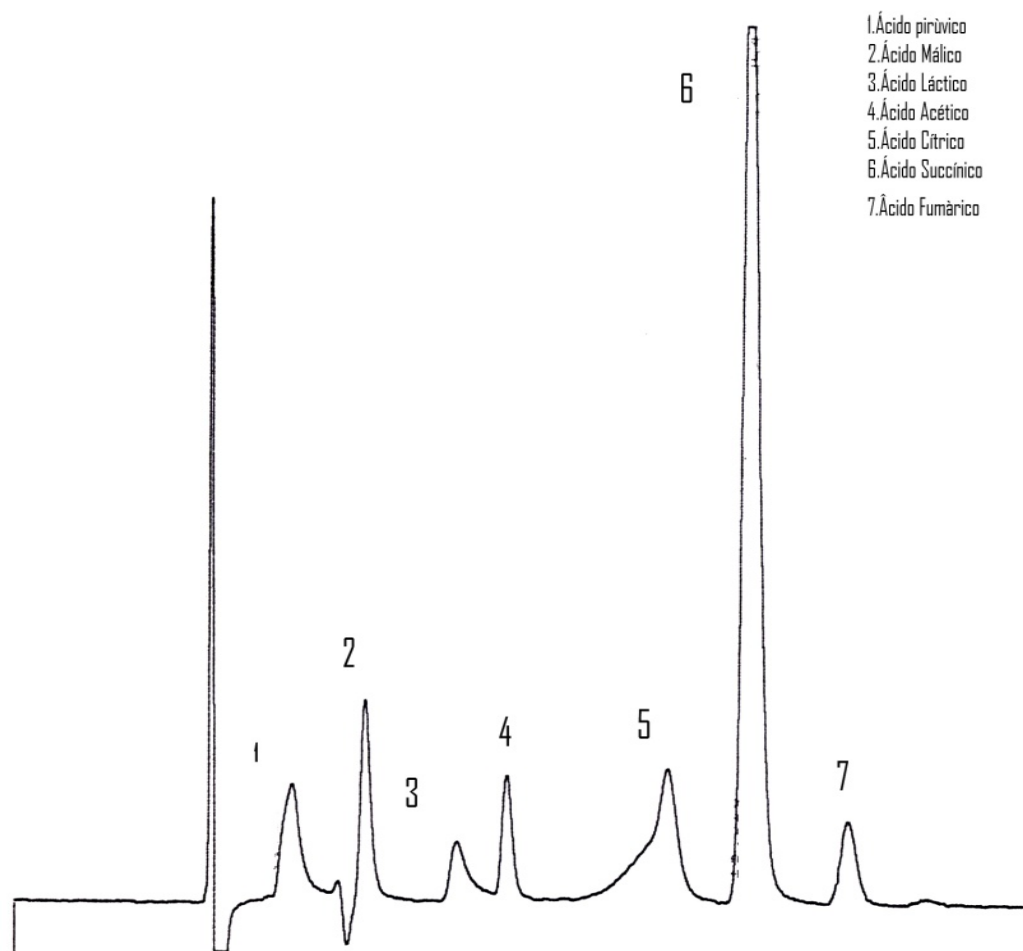


Fig. 5. Análisis de la mezcla de estándares Fase móvil H_2SO_4 pH = 3.0 (95%), MeOH (5%). Las demás condiciones se mantuvieron.

Tabla 6. Resultados obtenidos para el análisis de ácidos orgánicos (pH 3.0).

Analito	Ácido pirúvico	Ácido Málico	Ácido Láctico	Ácido Acético	Ácido Cítrico	Ácido Succínico	Ácido fumárico
$T_R(\text{min.})$	5.24	6.64	8.35	9.31	12.37	13.95	15.78

De esta forma, la resolución entre los picos 1 y 2 y los picos 3 y 4, mejoró sensiblemente. Sin embargo, como se puede notar los picos se ensancharon,

Así que se procedió a disminuir un poco la composición de metanol en la fase móvil, se usó una compuesta de la siguiente manera: H₂SO₄ pH = 2.5 (98%), MeOH (2%). (Figura 3).

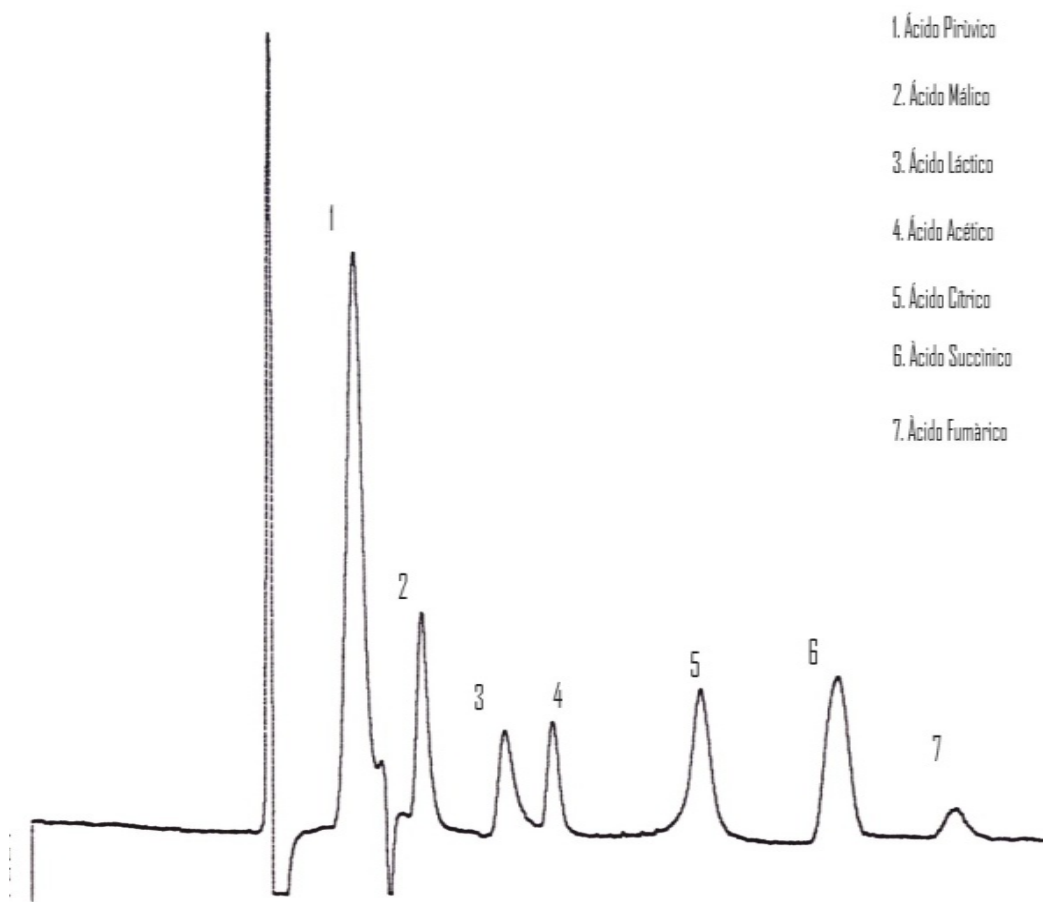


Fig. 6. Separación de la mezcla de estándares. Fase móvil H₂SO₄ pH = 2.5 (98%), MeOH (2%)

Tabla 7. Resultados obtenidos para el análisis de ácidos orgánicos (2% MeOH).

Analito	Ácido pirúvico	Ácido Málico	Ácido Láctico	Ácido Acético	Ácido Cítrico	Ácido Succínico	Ácido fumárico
T _R (min.)	5.19	6.29	7.65	8.42	10.81	13.05	14.88

Como último cambio se mantiene el 2% de metanol en la fase móvil y únicamente se modifica el pH ajustándolo de manera casi exacta a un pH = 2.75 (Figura 4).

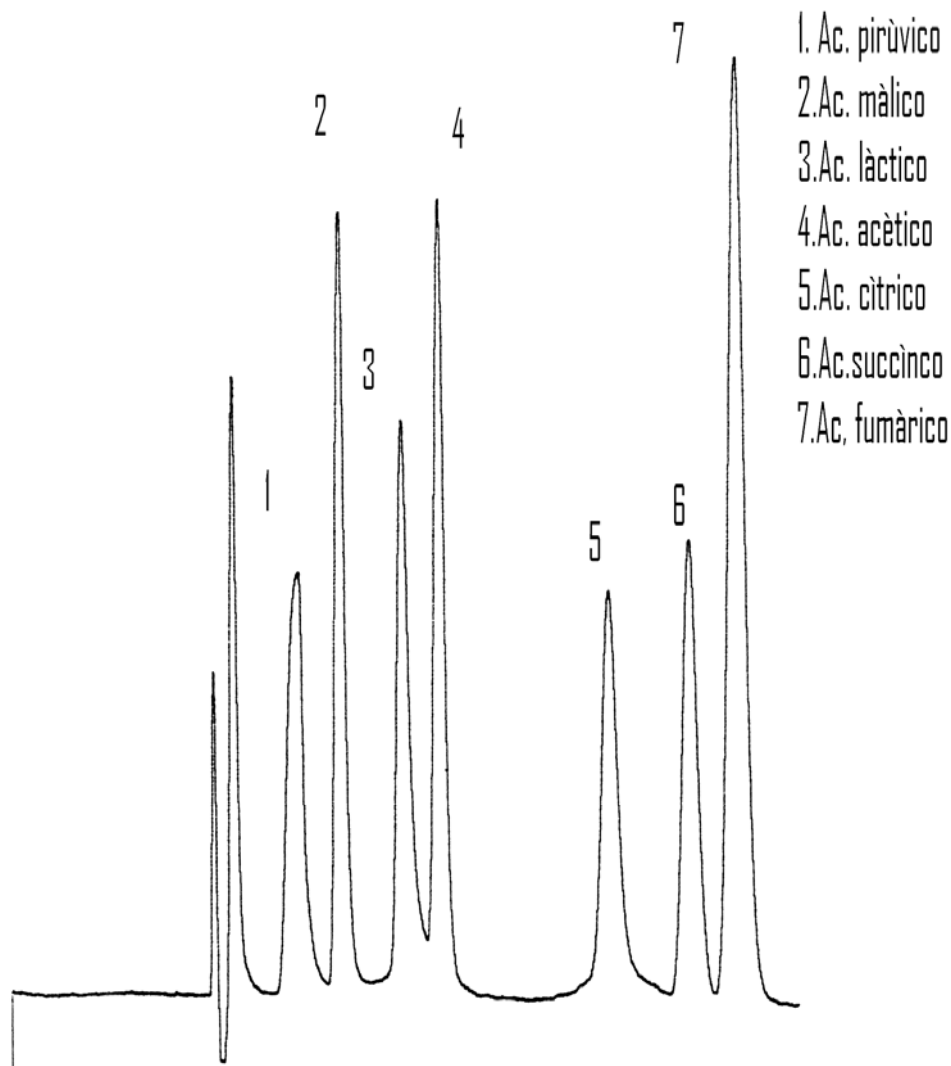


Fig.7. Separación de la mezcla de estándares. Fase móvil H_2SO_4 pH = 2.75 (98%), MeOH (2%)

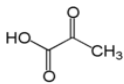
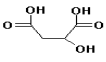


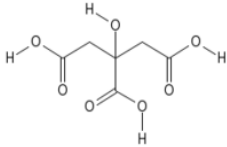
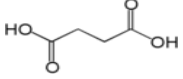
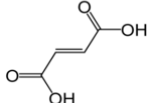
Tabla 8. Resultados obtenidos para el análisis de ácidos orgánicos (pH 2.75).

Analito	Ácido pirúvico	Ácido Málico	Ácido Láctico	Ácido Acético	Ácido Cítrico	Ácido Succínico	Ácido fumárico
$T_R(\text{min.})$	5.8	6.5	7.6	8.4	11.8	13.3	14.3

Como se puede constatar la composición de esta fase fue la que mostró una resolución óptima de los picos con una simetría muy aceptable. Cabe mencionar que la concentración de los ácidos se fue variando para obtener una señal más prominente.

A través del continuo trazo de espectros UV-Vis en función del tiempo, se pudo verificar que la fase móvil permanecía estable al menos durante tres días. Después de ese tiempo, la fase móvil, empieza a manifestar señales en el UV.

Tabla 9. Relación de la estructura y pKa de los ácidos orgánicos con su orden de elución (figura 4)

Analito	Estructura	pKa	T _R (min.)
Tiempo muerto (t ₀)	-----	-----	4.0
Ácido Pirúvico		2.49	5.8
Ácido Málico		3.45 5.09	6.5
Ácido Láctico		3.85	7.6
Ácido Acético		4.75	8.4
Ácido Cítrico		3.12 4.7 6.3	11.8
Ácido Succínico		4.2 5.63	13.3
Ácido Fumárico		3.1 4.6	14.3

Los tiempos de retención mostrados obtenidos nos indican que el análisis se lleva a cabo en poco tiempo, además que el orden de elución de estos ácidos se relaciona con el pKa de cada uno de ellos, lo cual tiene que ver con la polaridad de las moléculas.

Adición de un modificador

Con el fin de abreviar aún más el tiempo del análisis cromatográfico, se ensayó la adición a la fase móvil de n-butanol y n-hexanol como modificadores orgánicos [19] en una fase móvil compuesta de H₂SO₄ pH=2.75 (98%) / MeOH (2%).

Preparación de la fase móvil con n-butanol como modificador: a un matraz aforado de 100 mL agregar 2 mL de n-butanol filtrado y desgasificado. Aforar con la fase móvil de H₂SO₄ pH=2.75 (98%)/MeOH (2%) previamente preparada.

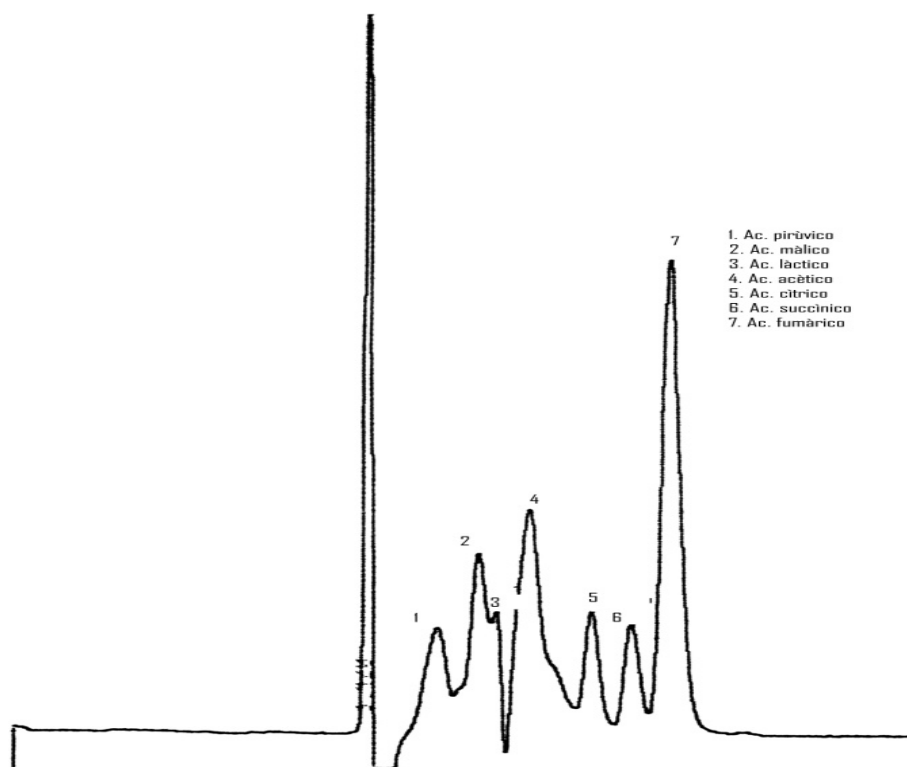


Fig. 9. Separación de la mezcla de estándares, fase móvil H₂SO₄ pH = 2.75 (98%), MeOH (2%) y 2% de n-butanol.

Como se puede observar, si bien es cierto que el tiempo del análisis disminuye, también la resolución de los picos disminuye drásticamente. En particular, se pierde la separación entre el ácido láctico y ácido acético: por lo que se decide eliminar la parte del modificador orgánico.

2.3.3. DETERMINACION DE ACIDOS ORGANICOS EN CERVEZAS.

El tratamiento de la muestra comercial es de suma importancia para el análisis de cerveza, ya que está constituida de una matriz muy compleja. Por consiguiente, el tratamiento de la muestra deberá de ser el más óptimo posible, para eliminar la cantidad máxima de interferencias.

TRATAMIENTO 1

- Desgasificar la muestra de cerveza victoria tradicional 10 min., en ultrasonido
- Filtrar en una membrana de 45µm
- Diluir 1: 5
- Inyectar la muestra.

Empleando el procedimiento antes descrito se obtiene el siguiente cromatograma.

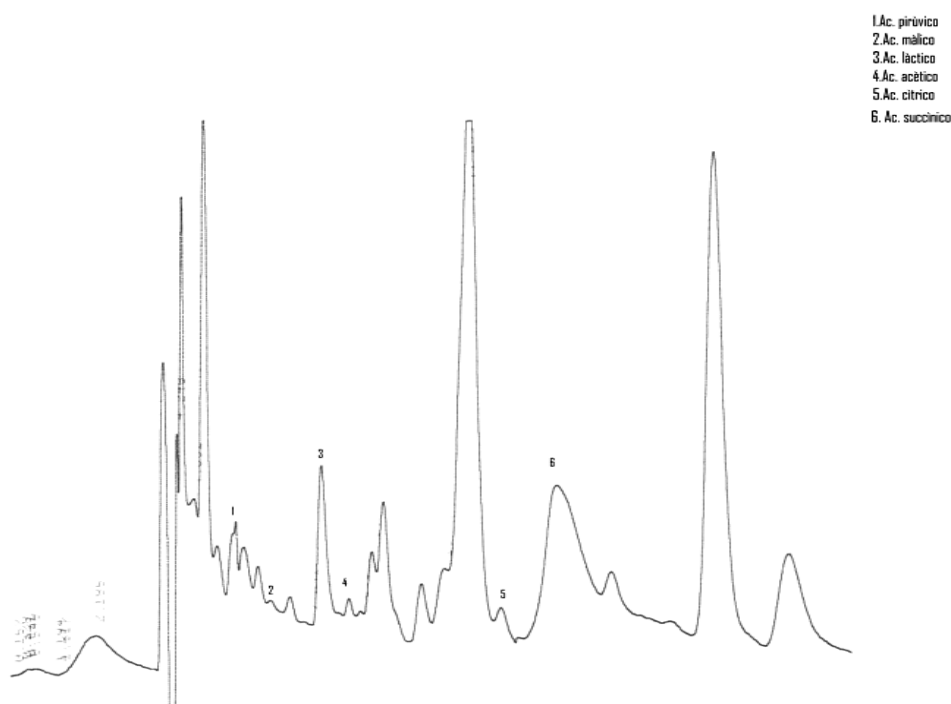


Fig. 10. Análisis de la cerveza victoria tradicional, fase móvil H₂SO₄ pH = 2.75 (98%), MeOH (2%) tratamiento: Desgasificar y diluir la muestra

El resultado obtenido presenta un exceso de picos no suficientemente resueltos como para llevar la identificación de los ácidos orgánicos. Por lo que se

plantea el llevar un tratamiento más extenso de la muestra para eliminar algunos compuestos interferentes con el análisis.

TRATAMIENTO 2

Con el objeto de disminuir los componentes coloridos de la matriz, se adiciona al tratamiento carbón activado, para lo cual se planteo el siguiente procedimiento (Tratamiento 2):

- Tomar una alícuota de 50 mL de cerveza victoria tradicional
- Desgasificar por 10 min. en un sonificador
- Agregar carbón activado 1g de carbón activado
- Filtrar por gravedad
- Diluir 1:5
- Filtrar con un Acrodisco

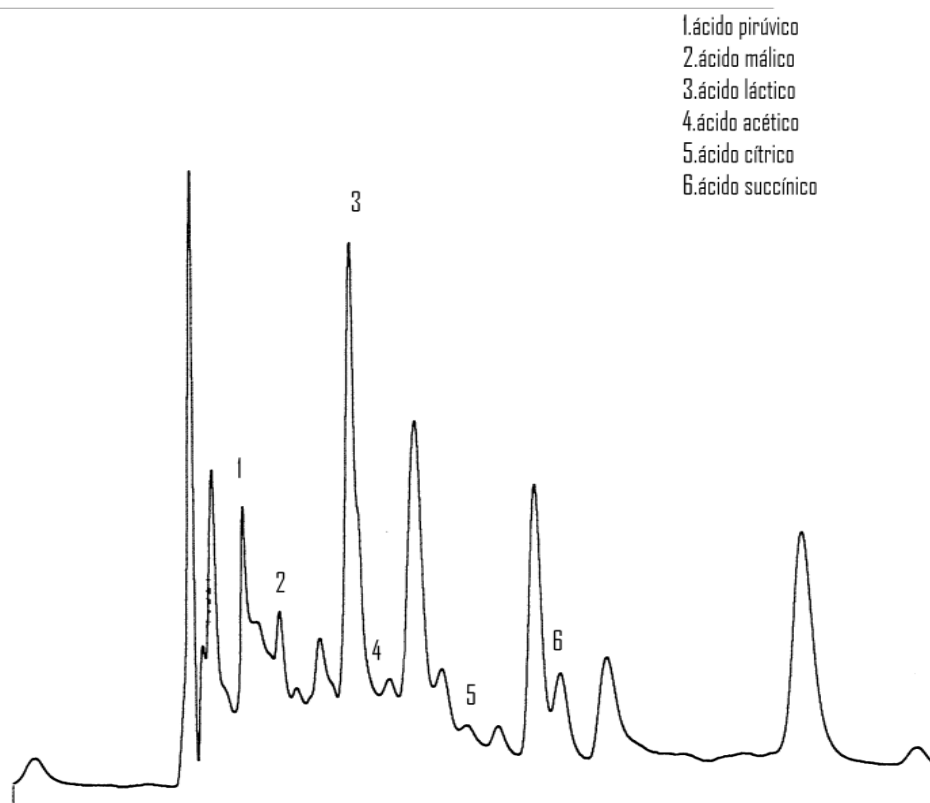


Fig. 11. Separación obtenida para la cerveza victoria tradicional después del tratamiento con carbón activado, desgasificación y filtración.

El número de interferencias disminuye significativamente, pero se estima que no lo suficiente. Para tratar de disminuir el número de interferencias aún más, se ensayó el tratamiento descrito por Montanari [20] para la eliminación de los

azúcares. Este autor propone una columna de filtración empleando una resina aniónica para la adsorción de los azúcares de la cerveza. A continuación se describe detalladamente este procedimiento.

TRATAMIENTO 3

Preparación de la columna: 5 g de resina Dowex 2-X8 en forma de cloruros (fuertemente aniónica), se suspenden en 40 ml de agua y se agitan durante 10 minutos para que la resina se hinche.

Por otra parte, se coloca en la parte inferior de una columna de vidrio (sobre la llave), un pedazo de algodón, previamente humedecido, y se eliminan las burbujas de aire por presión con una varilla de vidrio. Se abre un poco la llave y al mismo tiempo se le agrega la mezcla resina-agua agitando y golpeando ligeramente con el fin de lograr un empaque uniforme. No permitir nunca que el nivel del agua sea más bajo que el de la resina, agregar el agua necesaria oportunamente.

Cuando se ha agregado toda la resina se coloca un trozo de algodón en la parte superior de la columna para evitar el movimiento de la resina a cada adición y se eliminan las burbujas de aire presionando ligeramente con ayuda de la varilla de vidrio. Se cierra la llave.

Trabajo de la resina: cuando la columna ha quedado empacada, deben efectuarse varios intercambios antes de la separación deseada para lograr la máxima eficiencia de la columna. Con este fin se hacen pasar sucesivamente 40 ml de $[\text{NaOH}] = 4\text{M}$, 15 ml de agua desionizada y 50 ml de $[\text{HCl}] = 6\text{M}$.

TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

El procedimiento para el tratamiento de la muestra, tomando en cuenta los ensayos anteriores, quedó de la siguiente manera.

- Desgasificar 50 mL. de cerveza en el sonificador. por 30 min.
- Decolorar con 1g de carbón activado agitándose durante aproximadamente 15 seg. (Filtrar a gravedad (Whatman)
- Neutralizar con NaOH 0.1N a pH= 7.8 utilizando pH metro.
- Colocar en una columna cromatográfica de vidrio (1cm diámetro x 25cm largo) 5g de resina aniónica previamente tratada DOWEX SBR C, bajo forma de cloruros.
- Humedecer la resina con 20 mL de solución NaOH 0.1 N.
- Lavar con agua desionizada la resina ajustada previamente a pH = 7.
- Colocar un vaso de precipitados de 50 mL bajo la columna.
- Filtrar lentamente por esta columna una alícuota de 10 mL. De la muestra ya sonificada decolorada y neutralizada.
- Agregar 25 mL de agua desionizada.
- Este eluyente, separarlo.
- Colocar un matraz aforado de 50 mL bajo la columna.
- Adicionar a la columna 25 mL. de HCl 0.1 N
- Lavar con agua desionizada hasta recuperar un volumen de aforo 50 mL.
- Filtrar en un Acrodisco de 0.45 μm
- Inyectar 20 μL al HPLC.

- 1.Ac. pirùvico
- 2.Ac. màlico
- 3.Ac. làctico
- 4.Ac. acètico
- 5.Ac. cìtrico
- 6.Ac. succìnico

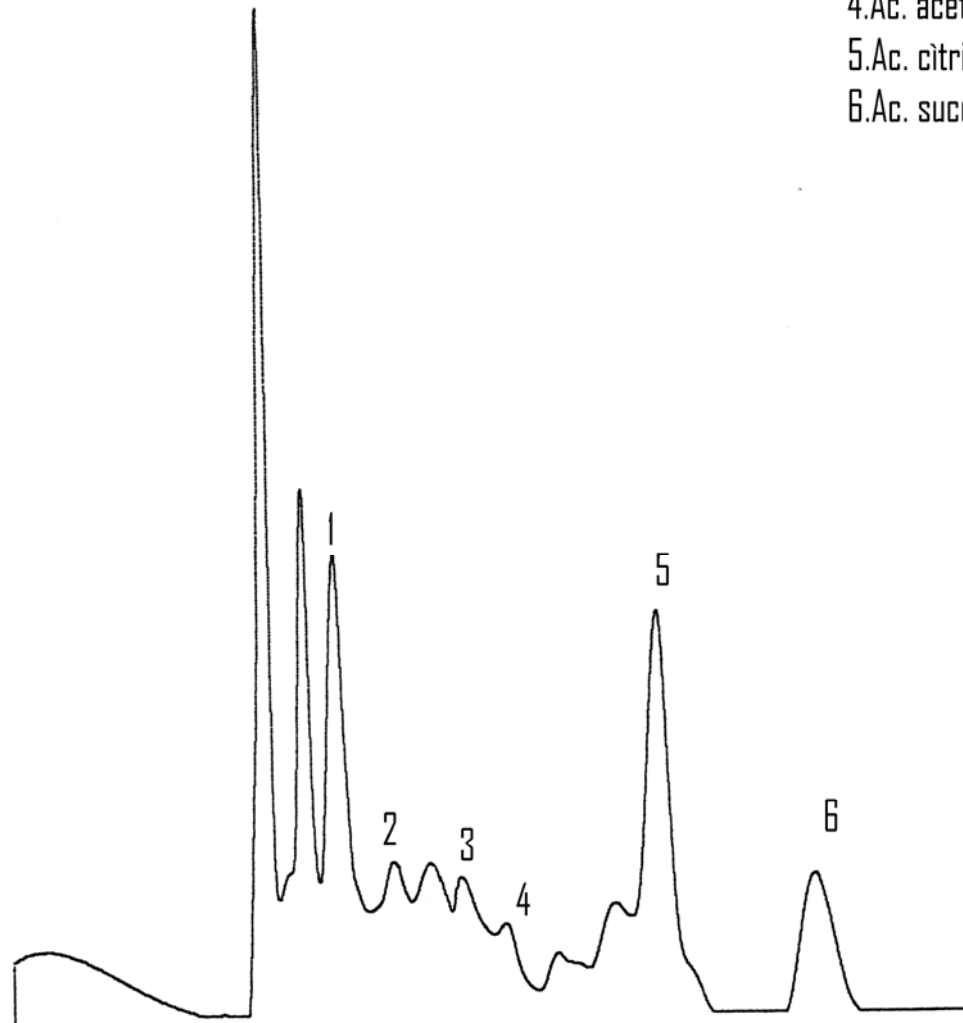


Fig. 12. Separación obtenida para la cerveza victoria tradicional, fase móvil H_2SO_4 pH = 2.75 (98%), MeOH (2%), tratamiento con resina de intercambio iónico.

Se puede constatar la eliminación de las interferencias principales (colorantes y azúcares) permite simplificar la identificación y cuantificación de los ácidos orgánicos en la cerveza.

Con esta metodología analítica ya optimizada se procedió a realizar los estudios de recuperación y linealidad de todos los ácidos.

Ensayo de recuperación

Para verificar si durante el tratamiento seleccionado (Tratamiento 3) hay una pérdida significativa de los ácidos orgánicos, se sometió a una mezcla de estos ácidos de concentración conocida al procedimiento descrito anteriormente. Cabe mencionar que este ensayo se llevó a cabo por triplicado. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 14 y la figura 12.

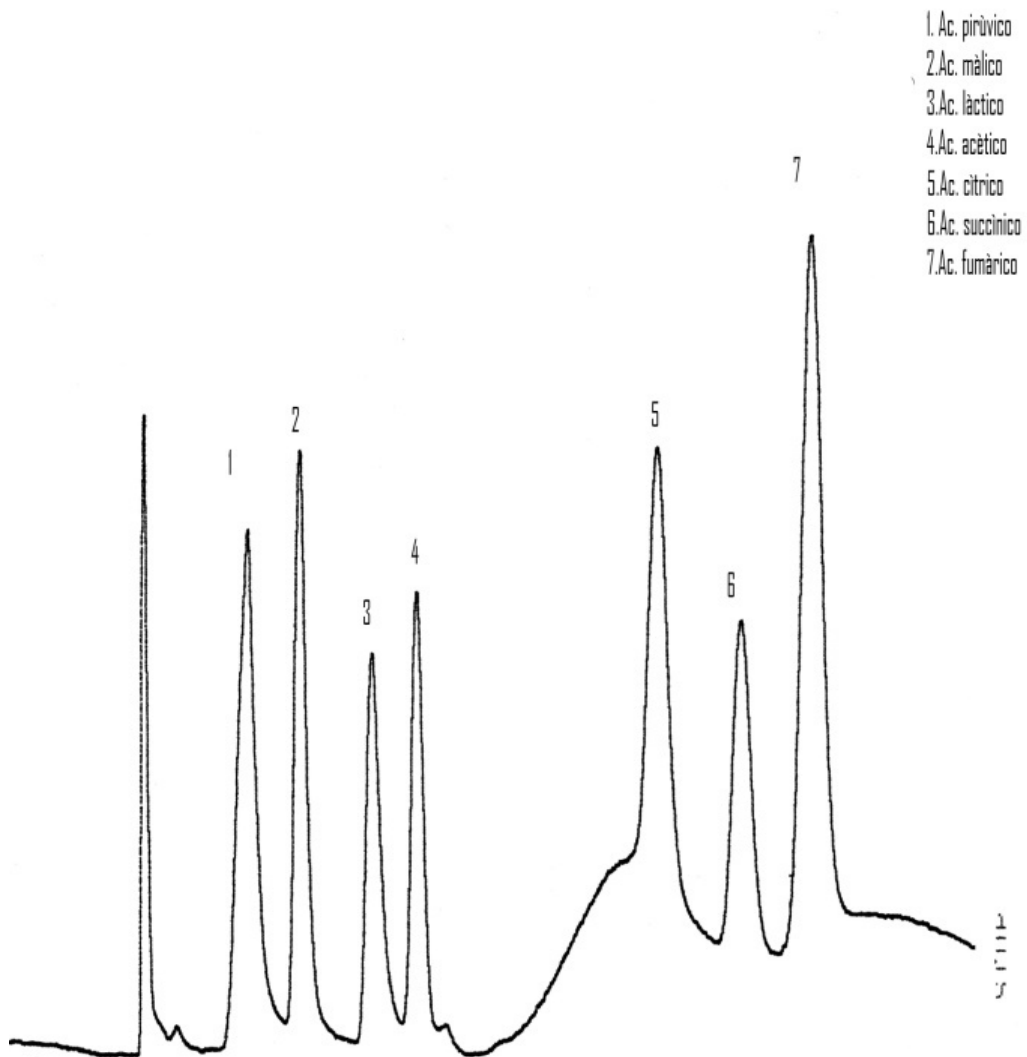


Fig. 13. Separación de una mezcla estándar de ácidos orgánicos sometidos al tratamiento que llevara la muestra de cerveza para cuantificar ácidos orgánicos.

3. RESULTADOS Y ANALIS DE RESULTADOS

3.1. DESARROLLO DEL METODO CROMATOGRAFICO.

CONDICIONES ÓPTIMAS ESTABLECIDAS

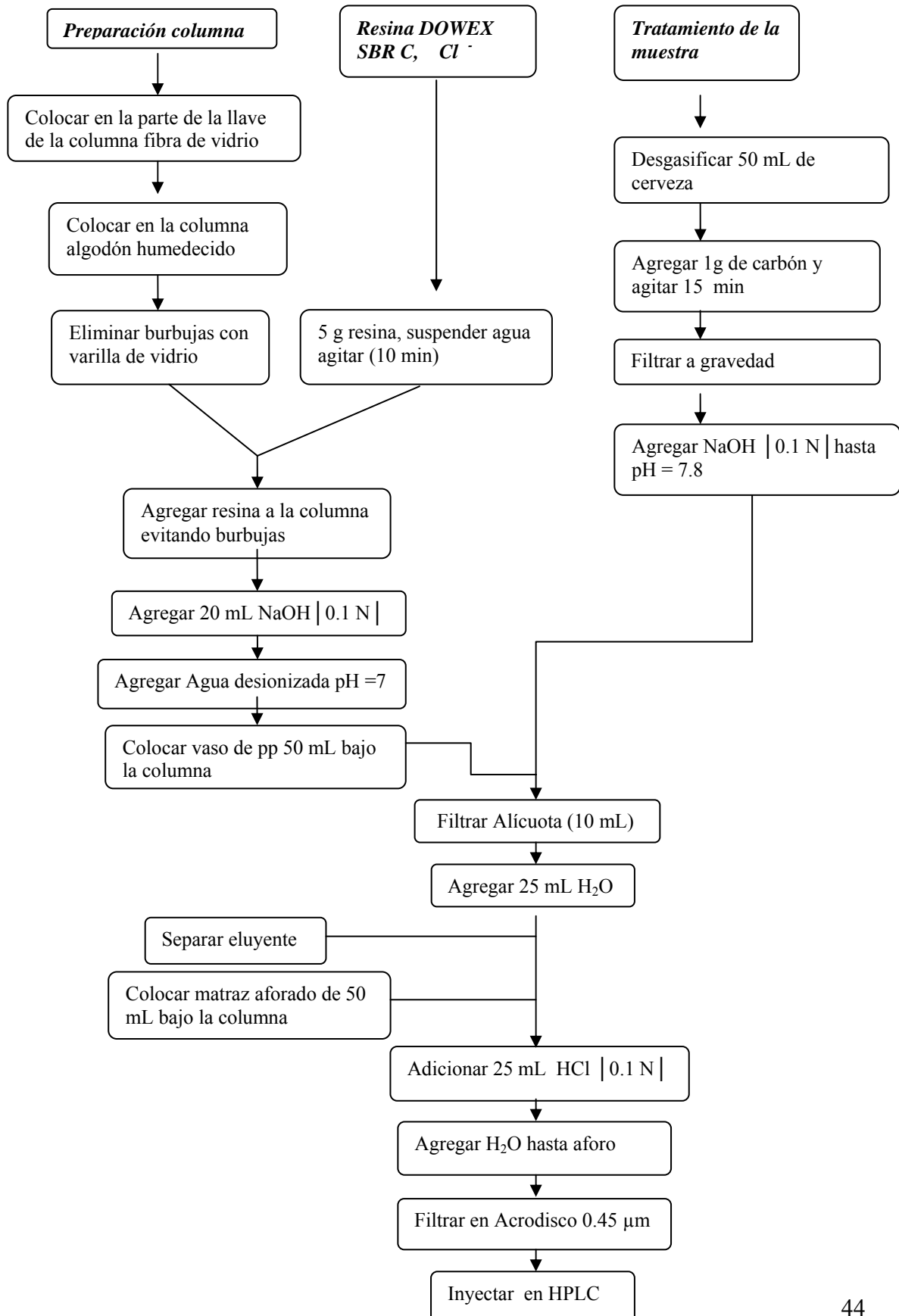
Se presentan a continuación las condiciones cromatograficas óptimas seleccionadas de los ensayos de la fase móvil además de el flujo y la longitud de onda sobre las cuales se trabajaran para la determinación de los ácidos orgánicos en cerveza.

Tabla 10. Condiciones cromatográficas, establecidas como óptimas.

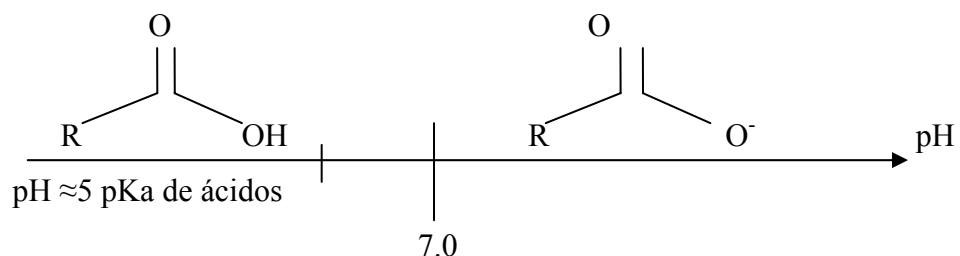
COLUMNA	Lichrospher [®] 100 Cat 50377 RP- 18 (5µm) No. 818337
SISTEMA	ISOCRATICO E ISOTERMICO
FASE MOVIL	H ₂ O, H ₂ SO ₄ , pH =2.75 (98 %) MeOH (2%)
LONGITUD DE ONDA	215 nm
FLUJO	0.5 mL/min.
VOLUMEN DE INYECCION	20 µL
PARAMETROS DEL INTEGRADOR	% A = 100 ZERO = 0 ATT = 3 AR REJ = 100000 CHT SP = 1
TEMPERATURA	AMBIENTE

TRATAMIENTO DE ESTANDARES Y DE LA MUESTRA

DIAGRAMA DE FLUJO PARA LA DETERMINACION DE ACIDOS ORGANICOS EN CERVEZA.



El diagrama de flujo anterior nos indica el tratamiento optimizado que llevara la muestra. Lo que sucede dentro de la columna de filtración es lo siguiente:



Al agregar NaOH | 0.1 N | a la muestra de cerveza los ácidos contenidos dentro de ella pasan a su forma ionizada.

Cuando se agrega NaOH | 0.1 N | a la columna los Cl^- se liberan y cuando se filtra la muestra los ácidos ionizados contenidos dentro de esta se fijan a la columna los demás componentes son eluidos por el agua agregada.

Al agregar el HCl | 0.1 N | los ácidos son sustituidos por los Cl^- a la resina, y los ácidos son eluidos hacia el matraz de aforo.

La siguiente tabla muestra los resultados obtenidos de la inyección por triplicado de una mezcla de estándares la cual se sometió al tratamiento descrito como tres y el cual se resume en el diagrama de flujo 3. Se puede notar que los tiempos de retención varían un poco con respecto a los tiempos de retención mostrados antes de ser sometidos a este tratamiento.

También es de observar la recuperación de estos ácidos, se encuentra por encima del 85%.

Tabla 11. Resultados obtenidos del ensayo de recuperación.

Analito	T _r (min)	AREA	% recuperación
Ácido pirúvico	5.8	337832	90.44
Ácido Málico	6.5	379898	96.89
Ácido Láctico	7.6	268276	94.11
Ácido Acético	8.6	278778	94.41
Ácido Cítrico	12.0	310293	88.81
Ácido Succínico	13.6	203572	84.64
Ácido fumárico	14.9	666359	91.19

A continuación, se presentan los parámetros Cromatográficos asociados a la separación de los estándares con las condiciones seleccionadas.

Tabla 12. Parámetros cromatográficos de la separación óptima de estándares de ácidos orgánicos.

Parámetro	Factor de capacidad (k)	Factor de selectividad (α)	Rs	w _B (min.)	w _{0.5} (min.)	N(platos teóricos)	H
Ácido Pirúvico	0.40	1.4		0.8	0.3	1932.1	0.0129
Ácido Málico	0.6	1.6	2.54	0.6	0.2	5678	0.0044
Ácido Láctico	0.92	1.1	1.27	0.6	0.2	8219	0.0030
Ácido Acético	1.10	1.6	1.27	0.5	0.2	9781.3	0.0025
Ácido Cítrico	1.82	1.2	4.46	0.8	0.3	7867.1	0.0031
Ácido Succínico	2.27	1.1	2.26	0.7	0.3	10573	0.0023
Ácido Fumárico	2.4		2.44	0.9	0.4	12228	0.0020

Los parámetros cromatográficos obtenidos indican que el método optimizado presenta una adecuada separación, pues respecto al factor de capacidad se nota que K no es alta y existe una buena migración de los analitos a través de la columna. En todos los analitos $\alpha > 1$ lo que nos está indicando que existe una buena separación entre ellos. $R_s \geq 1.5$ en 5 de los siete ácidos analizados la excepción se encuentra en los ácidos láctico y acético mas sin embargo; R_s está por encima de 0.75 de estos analitos y se considera fiable para llevar a cabo el análisis de ácidos orgánicos en cerveza y que la columna elegida para este análisis llevara a cabo una buena separación de analitos en la muestra problema.

Toda vez que se resolvió las condiciones cromatograficas para la identificación y separación de ácidos orgánicos y, además ya implantados el procedimiento que se llevara a cabo para el tratamiento de las muestras, a continuación se procedio a la cuantificación de ácidos orgánicos en cerveza.

Curvas de calibración para los ácidos orgánicos

Para realizar la cuantificación de cada uno de los analitos a estudiar se realizo una curva de calibración por estándar externo a fin de establecer un intervalo lineal. A continuación se muestran los resultados obtenidos de cada ácido.

Tabla 13. Muestra los resultados de las curvas de calibración.

Acido	T _r (min)	Ecuación lineal	R ²
Píruvico	5.6	$y = 22440x + 16946$	0.993
Málico	6.4	$y = 11700x - 4915$	0.996
Láctico	7.7	$y = 11855x + 2315$	0.999
Acético	8.4	$y = 21119x + 2315$	0.999
Cítrico	11.8	$y = 21119x - 11367$	0.999
Succínico	13.3	$y = 9124x + 8945$	0.996
Fumárico	14.3	$y = 3 \times 10^6 x + 25566$	0.998

La tabla 13 nos muestra las ecuaciones para las curvas de calibración, es de notar las el valor R² en todos esta por encima de 0.99 lo que indica una buena linealidad.

A continuación se presenta la curva de calibración obtenida para el ácido acético. Similares curvas se obtuvieron para los demás ácidos.

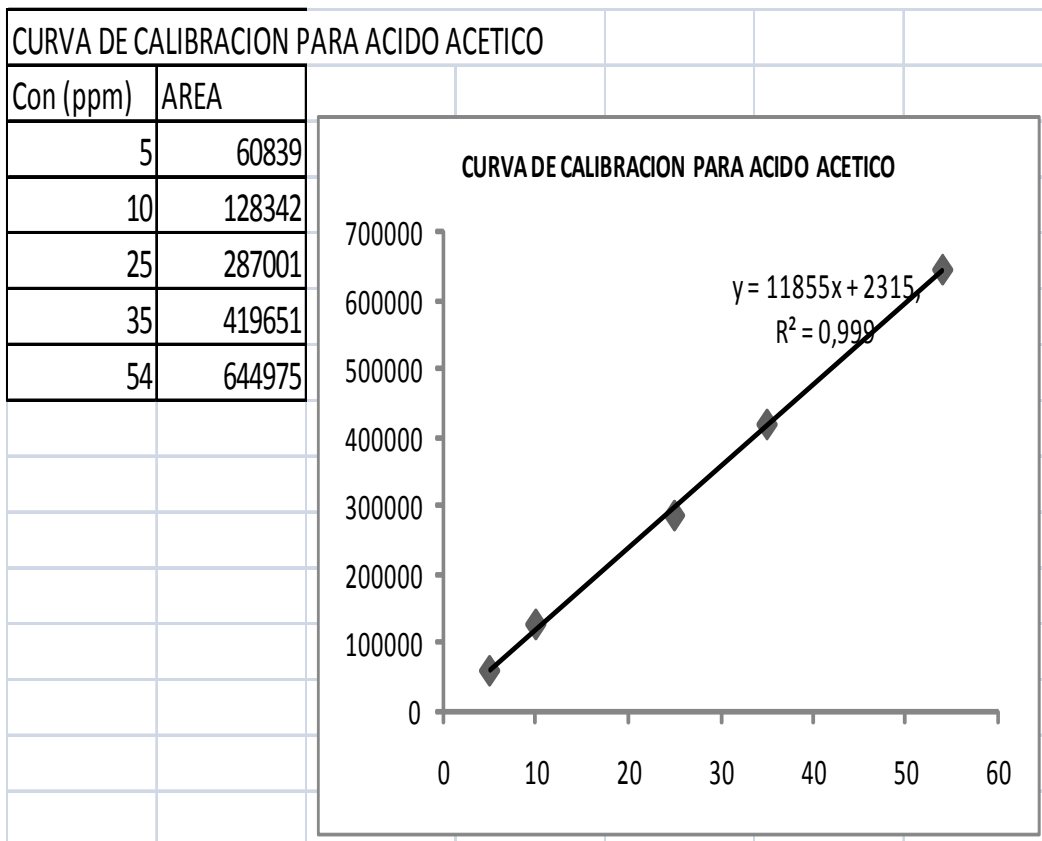


Fig. 14. Curva de calibración para ácido acético

3.2 ANÁLISIS DE MUESTRAS COMERCIALES DE CERVEZAS

A continuación se presentan en la tabla 14 los resultados de la cuantificación de ácidos orgánicos en las muestras,

Tabla 14. Cuantificación de ácidos orgánicos en muestras comerciales.

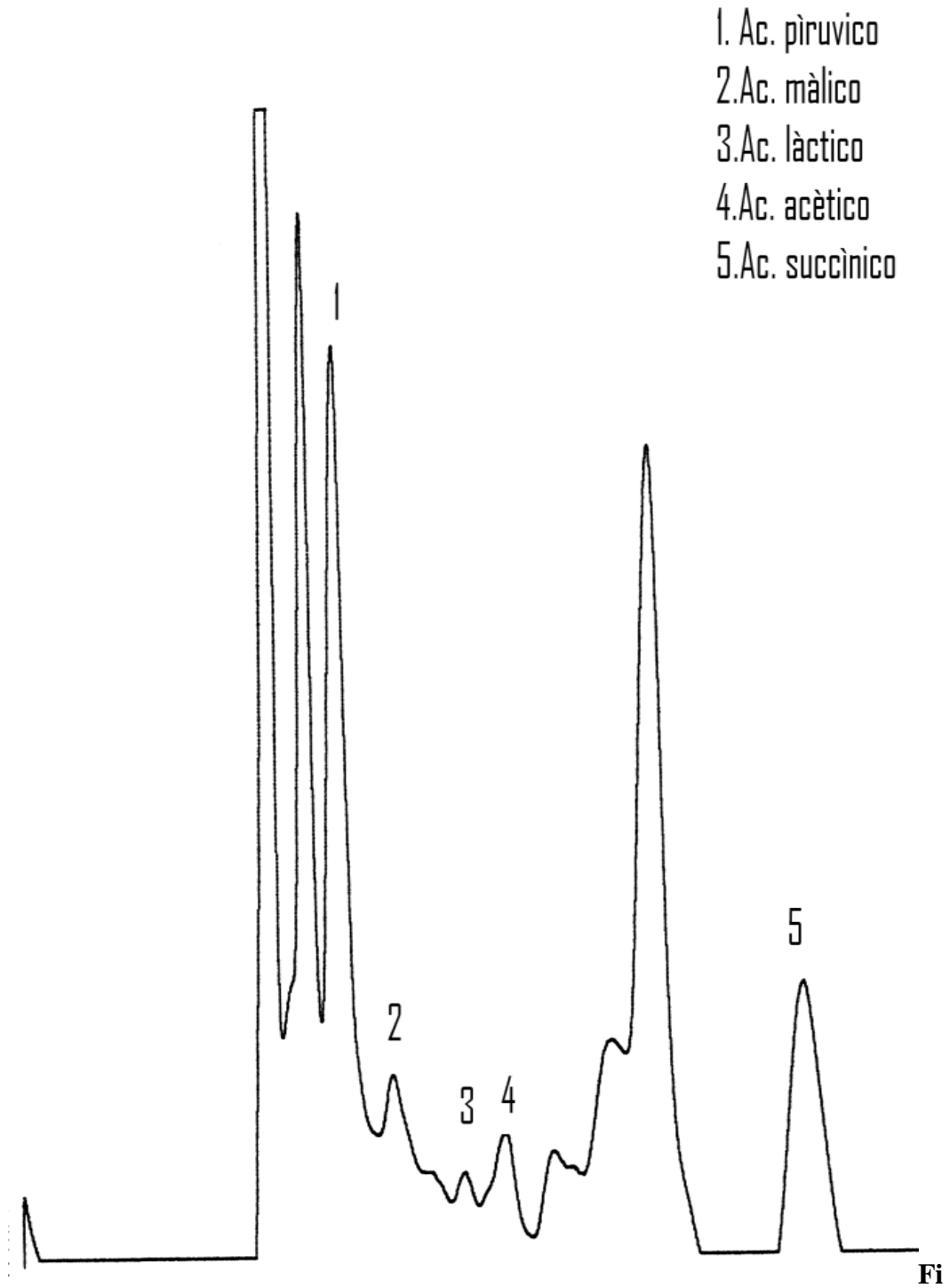
ácido	NEGRA MODELO	VICTORIA TRADICIONAL	MODELO ESPECIAL VIDRIO	MODELO ESPECIAL LATA	CORONA EXTRA BARRILITO	CORONA EXTRA B. VIDRIO	CORONA EXTRA LATA	CON. TÍPICA *
pH	4,7	4,7	4,7	4,7	4,7	4,7	4,7	
pirúvico	28,6	37,38	43,43	43,43	36,83	32,35	35,23	20-100
málico	64,97	192,9	152,25	153,61	233,79	233,44	152,5	20-150
láctico	46,68	304,8	60,01	59,78	203,91	184,66	133,49	50-500
acético	62,44	187,79	162,65	172,69	29,48	207,75	195,82	50-200
cítrico	ND	84,4	186,01	156,01	ND	83,81	50,87	50-600
succínico	415,74	476,2	ND	ND	119	481,49	450,49	40-200
fumárico	ND	ND	0,38	1,121	ND	ND	ND	0-8
TOTAL	618,43	1283,47	604,73	586,641	623,01	1223,5	1018,4	

* Concentración típica encontrada en cervezas americanas.

Como se muestra en la tabla 14 las concentraciones totales de ácidos orgánicos en algunos analitos estudiados rebasan a las reportadas en cervezas americanas se hace la suposición de que la concentración aumenta por que:

1. Las cervezas analizadas son mexicanas, y la concentración total de ácidos orgánicos en cerveza depende en parte de la cepa de levadura utilizada en la elaboración de la cerveza.
2. Las áreas de los picos cromatográficos se desplazaron hacia arriba de la línea base y posiblemente el integrador tomó dicha área como total y por consiguiente esta área es muy elevada.

De la misma manera se presenta el cromatograma obtenido para la cerveza NEGRA MODELO. Similares cromatogramas fueron obtenidos de las demas cuantificaciones.



g. 14. Separación obtenida para la CERVEZA NEGRA MODELO.

La Tabla 15 da una descripción de los sabores que proporcionan los diferentes ácidos al sabor de la cerveza, así como un intervalo de concentración para cada ácido. Aunque los valores están referidos a cervezas americanas, los datos son muy similares a cualquier tipo de cerveza producido a nivel mundial.

Tabla 15. Sabor característico que brindan los diferentes ácidos a la cerveza.

Ácido orgánico	Descripción del sabor	Concentración típica en cervezas americanas (ppm)
pirúvico	ácido, placentero, salado	20-100
málico	ácido y placentero	20-150
láctico	ácido y agradablemente suave	50-500
acético	Agrio, avinagrado y picante	50-200
cítrico	ácido poco agradable	50-600
succínico	astringente ácido y jabonoso	40-200
fumárico	-----	0-8

Referencias de la tabla [2,10,25-30]

Los factores que regulan la producción de ácidos orgánicos en cerveza son aún desconocidos. Las proporciones de estos ácidos dependen de las diferentes cepas de levaduras. Las deficiencias de alguna vitamina en particular como la tiamina favorece la formación de ácido pirúvico. Muchos oxiácidos son el resultado del metabolismo de aminoácidos, de ahí que el contenido de éstos sea importante. Los ácidos volátiles tales como el ácido acético se presume que es el resultado de la hidrólisis de la acetil CoA, así como otros ácidos son el resultado de la biosíntesis de lípidos.

Las mediciones cromatográficas realizadas permitieron evidenciar variaciones entre la concentración y tipo de ácidos orgánicos presentes en cada cerveza de la misma marca. Estas diferencias encontradas especialmente respecto a la concentración de ácidos orgánicos entre las muestras de cerveza parecen estar relacionadas con las cepas de levadura utilizadas para la fermentación.

No obstante, la variación cuantitativa de ácidos orgánicos en las diversas muestras estudiadas, en general mostraron los mismos tipos de ácidos orgánicos; es decir los perfiles cromatográficos en todas las cervezas analizadas tuvieron el mismo estereotipo.

De los ácidos orgánicos identificados el ácido pirúvico, málico, láctico y acético se presentaron en todas las cervezas analizadas, a diferencia de los otros tres que son ácido cítrico, succínico y el fumárico solo se encontraron en dos de las siete muestras analizadas.

La excepción a lo mencionado recientemente fue la cerveza modelo especial presentación botella de vidrio y la cerveza modelo especial presentación botella de lata.

Así de esta forma se encontró que cada cerveza tiene un sabor característico [25, 26], los ácidos orgánicos como tal no representan ningún valor cualitativo de acuerdo su concentración, es decir, de manera individual o en conjunto solo brindan ese sabor placentero característico de cada cerveza de acuerdo a su concentración que aun en el momento de la fermentación los factores que regulan su producción son desconocidos. Sin embargo, es muy importante cuidar su concentración total pues si no brindaría sabores no deseados en una cerveza.

CONCLUSIONES

Aunque los ácidos orgánicos no están actualmente considerados como factores esenciales para la calidad de la cerveza, esta situación puede modificarse, dado el mayor conocimiento actual de sus actividades respecto al sabor que brindan en conjunto.

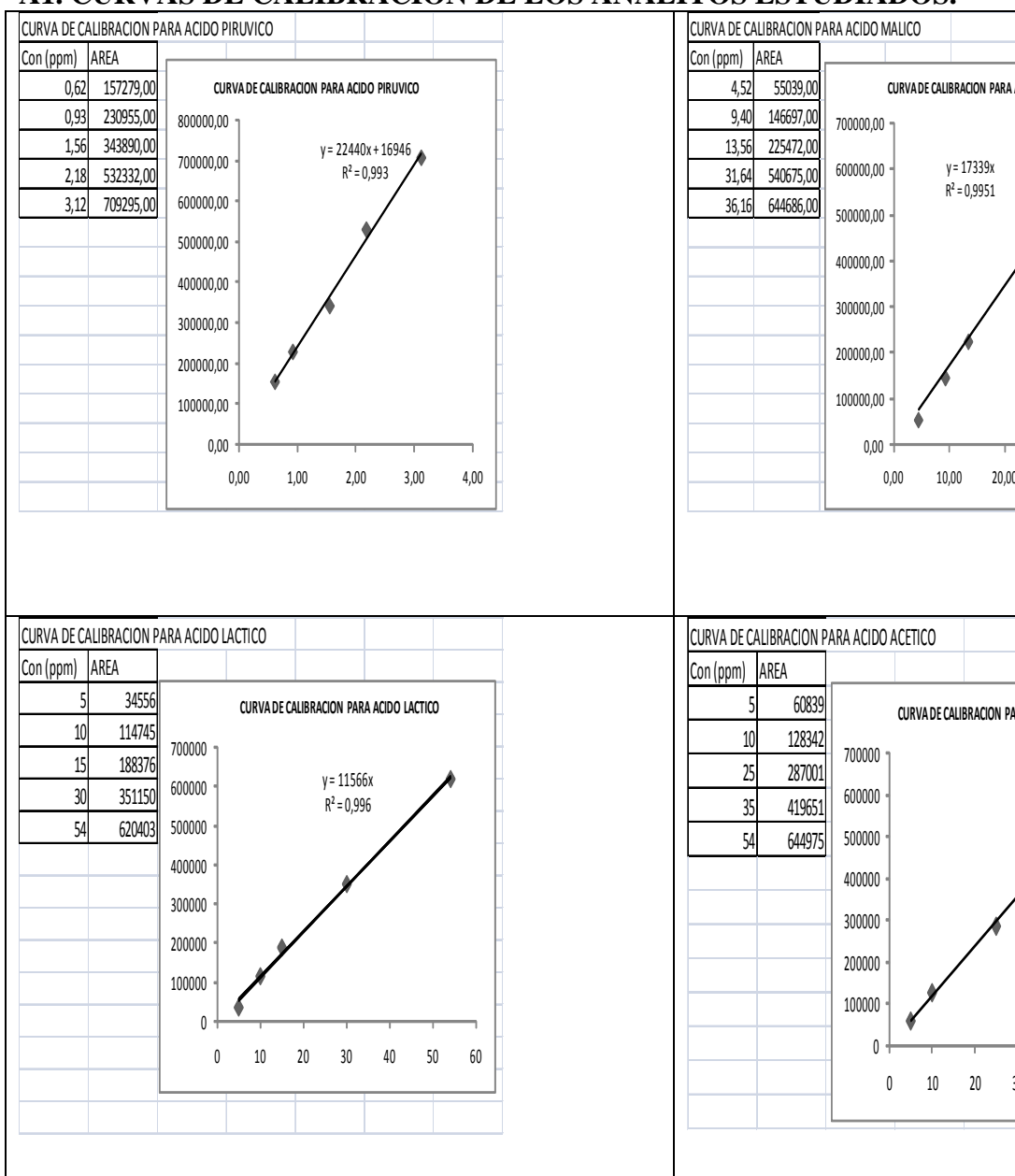
El método optimizado cumplió todas las expectativas deseadas al principio de este trabajo, pues se logró determinar las condiciones óptimas para la separación de los estándares ácidos orgánicos por HPLC.

Se estableció el procedimiento adecuado para el tratamiento de las muestras que garantice que los ácidos orgánicos se mantengan íntegros en la muestra final.

Se aplicó el método desarrollado para la cuantificación de los ácidos orgánicos en muestras comerciales. Sin embargo, al escudriñar la bibliografía solo podemos concluir que los ácidos orgánicos en la cerveza le brindan sabor placentero y en ocasiones sabor desagradable como el caso del ácido cítrico, pero respecto a su calidad no intervienen.

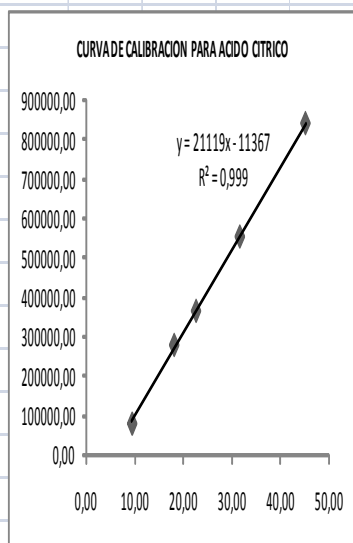
ANEXOS

A1. CURVAS DE CALIBRACION DE LOS ANALITOS ESTUDIADOS.



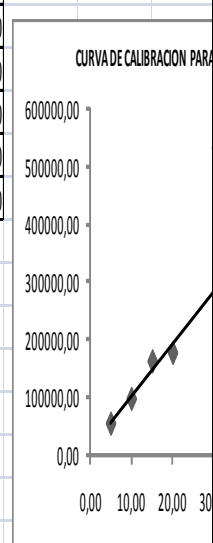
CURVA DE CALIBRACION PARA ACIDO CITRICO

Con (ppm)	AREA
9,40	78197,00
18,08	277697,00
22,60	363916,00
31,64	552423,00
45,20	839748,00



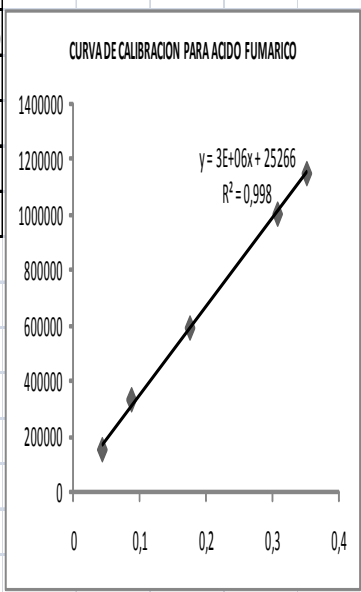
CURVA DE CALIBRACION PARA ACIDO SUCCINICO

Con (ppm)	AREA
5,04	55262,00
10,08	98156,00
15,20	163365,00
20,16	178058,00
54,24	505474,00

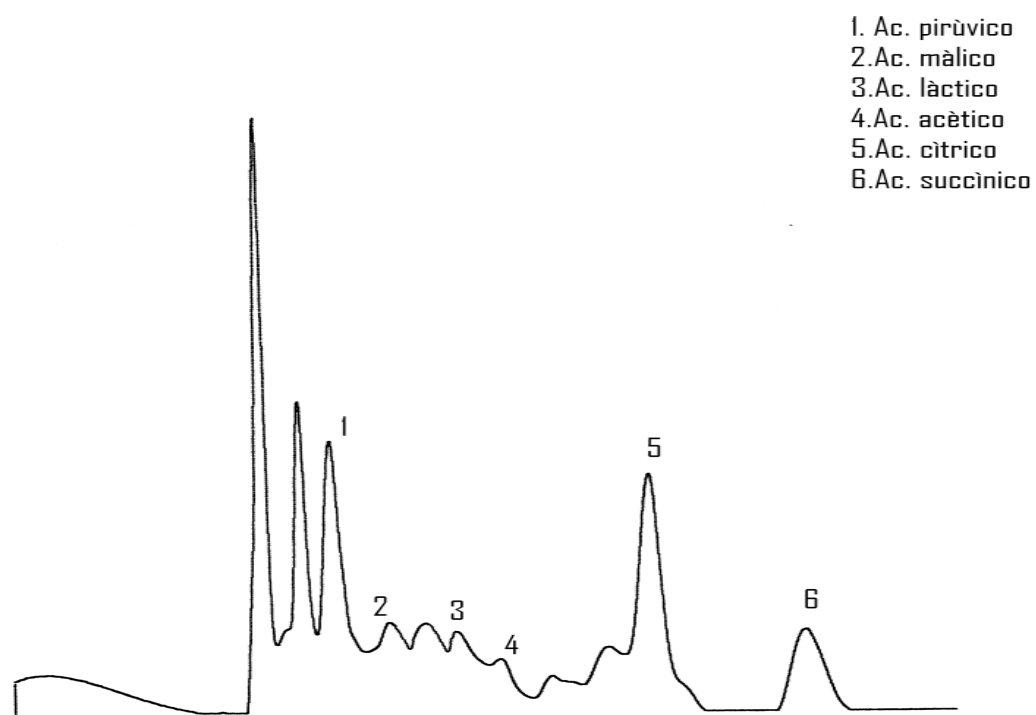


CURVA DE CALIBRACION PARA ACIDO FUMARICO

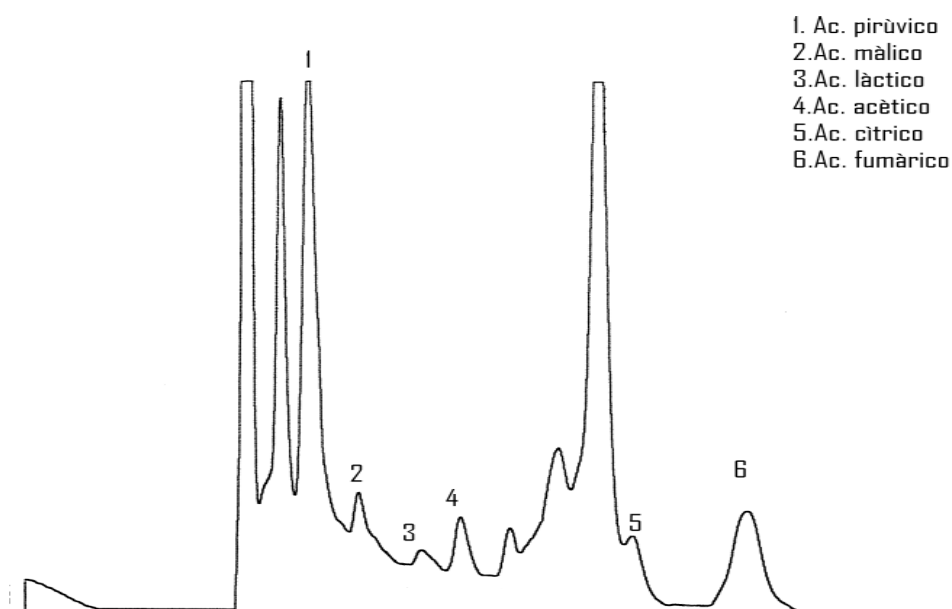
Con (ppm)	AREA
0,044	146846
0,088	328503
0,176	589269
0,308	1003629
0,352	1151102



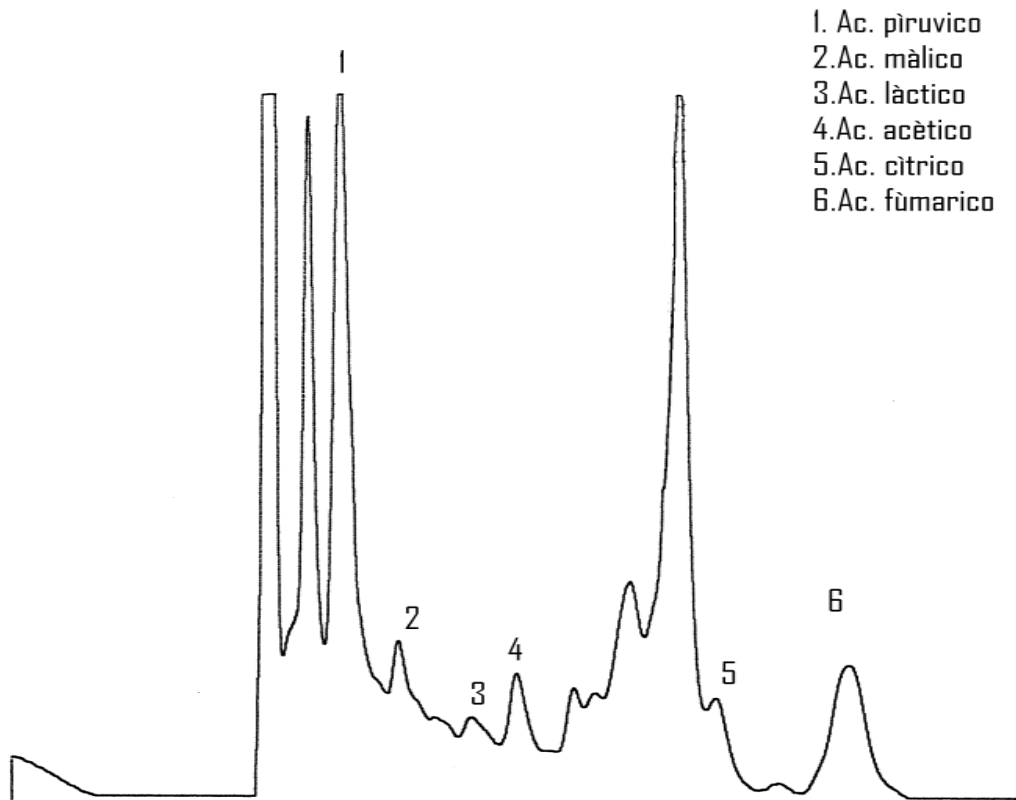
A2. CROMATOGRAMAS OBTENIDOS DE LA CUANTIFICACION DE ACIDOS ORGANICOS EN CERVEZAS.



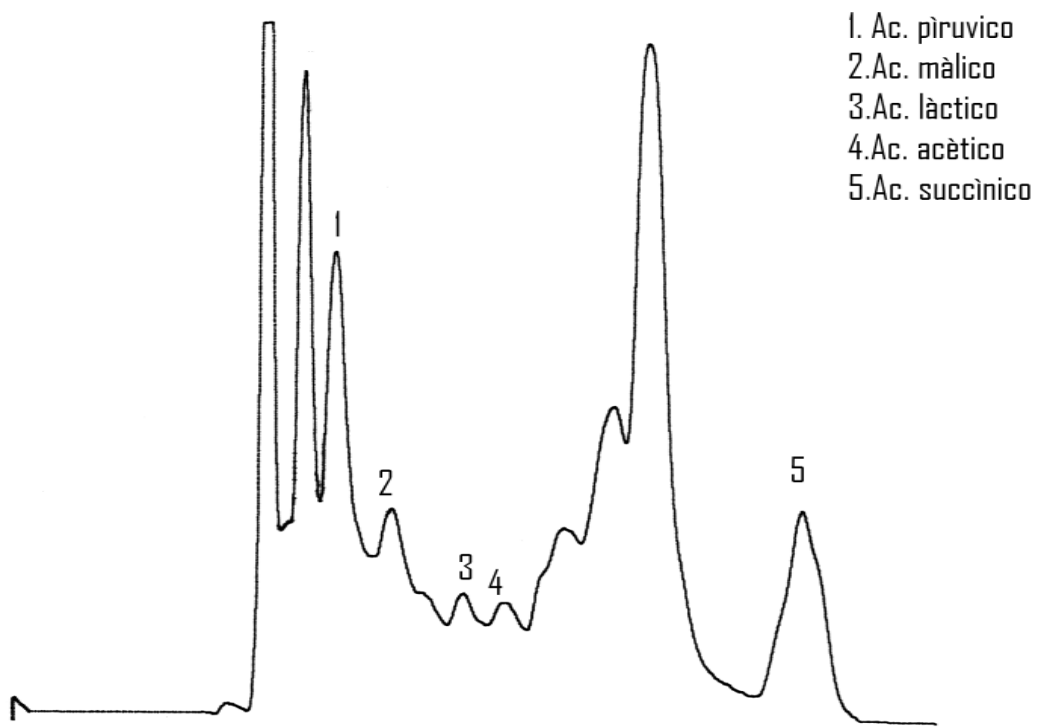
Separación obtenida para la cerveza VICTORIA TRADICIONAL.



Separación obtenida para la cerveza MODELO ESPECIAL PRESENTACION BOTELLA DE VIDRO.

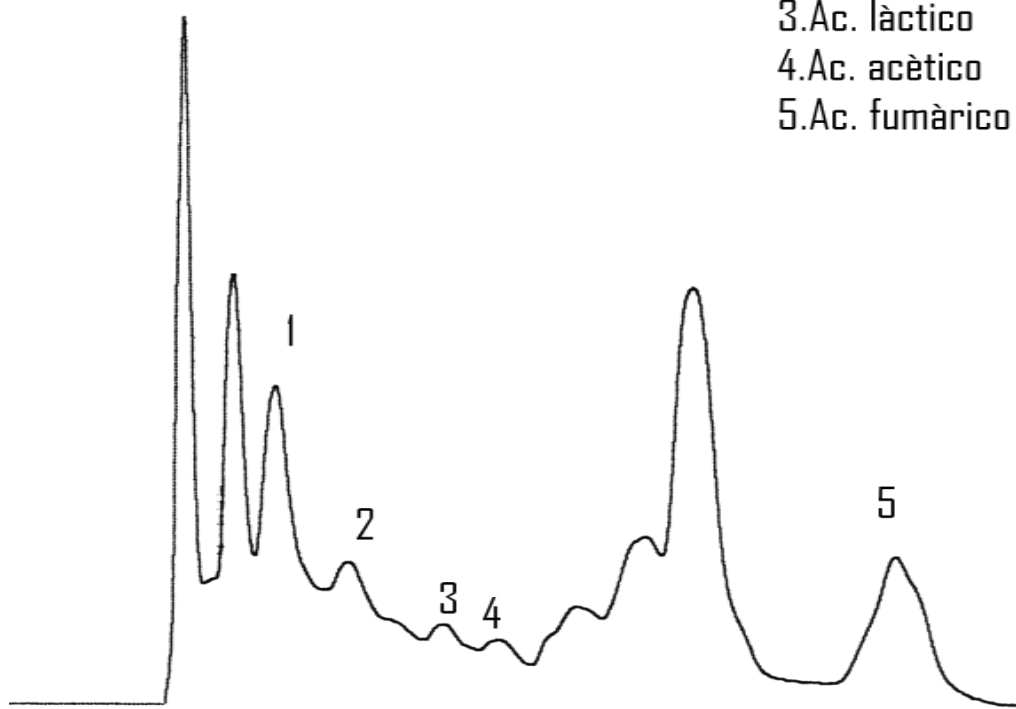


Resultado obtenido de la cerveza MODELO ESPECIAL PRESENTACION BOTELLA DE LATA DE ALUMINO.



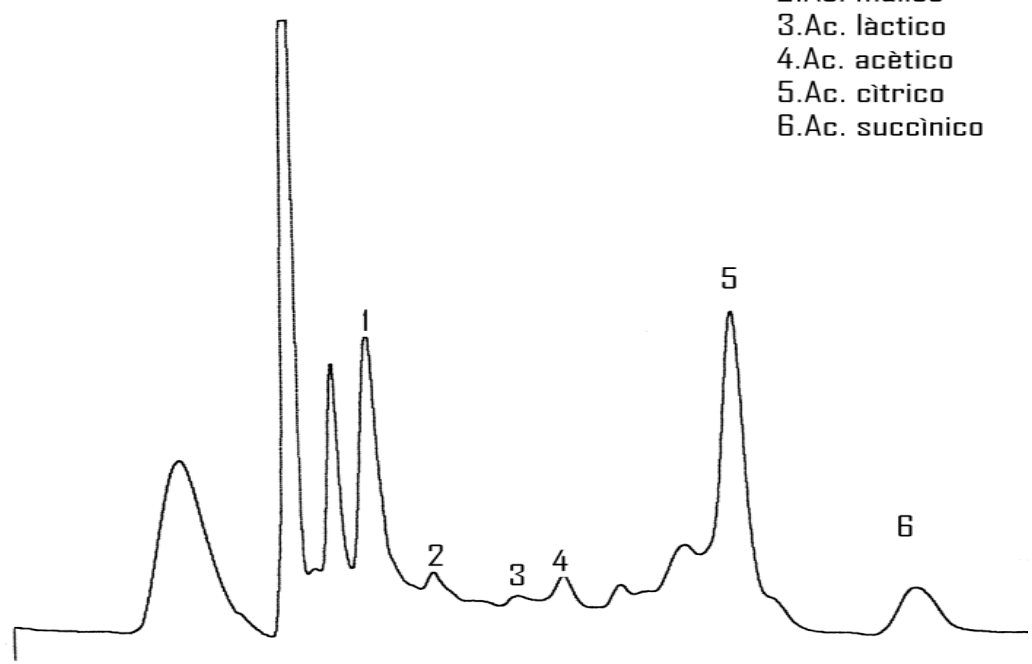
Separación obtenida para la cerveza CORONA EXTRA BOTELLA DE VIDRIO

- 1. Ac. pìruvico
- 2.Ac. màlico
- 3.Ac. làctico
- 4.Ac. acètico
- 5.Ac. fumàrico



Resultado de cerveza CORONA EXTRA BOTELLA DE VIDRIO BARRIL.

- 1. Ac. pìruvico
- 2.Ac. màlico
- 3.Ac. làctico
- 4.Ac. acètico
- 5.Ac. cìtrico
- 6.Ac. succìnico



Resultados obtenidos para la cerveza CORONA EXTRA BOTELLA DE LATA DE ALUMINO,

REFERENCIAS

- [1] De Stefano, A. and Montana, L. Minor components of beer: a review. *Alcologia*, 8, p. 43-45 (1996).
- [2] Hardwick, W. A. The properties of beer. In: Hardwick, W. A. (Ed.), *Handbook of brewing*. New York: Marcel Dekker, Inc. p. 566 (1995).
- [3] Charalambous, G. Involatile constituents of beer in brewing science. In: POLLOCK, J. R. A. (Ed.) *Brewing Science* Vol. 2 Edn. New York: Academic Press, pp. 167, 176 (1987).
- [4] S. Boyles. Method for the analysis of inorganic and organic acid anions in all phases of beer production using gradient ion chromatography. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **50**: 61–63 (1992).
- [5] F.X. Castane. HPLC determination of alcohol in beer. *Cerveza Malta* **31**: 14–23 (1994).
- [6] A. Coquet, W. Haerdi, R. degli Agosti, and J.L. Veuthey. Determination of sugar by liquid chromatography with post-column catalytic derivatization and fluorescence detection. *Chromatographia* **38**: 12–16 (1994).
- [7] J.J. Hunter, J.H. Visser, and O.T. De Villiers. Preparation of grapes and extraction of sugars and organic acids for determination by high performance liquid chromatography. *Am. J. Enol. Vitic.* **42**: 237–44 (1991).
- [8] M. Calull, R.M. Marcé, and F. Borrull. Determination of carboxylic acids, sugars, glycerol and ethanol in wine and grape must by ionexchange high performance liquid chromatography with refractive index detection. *J. Chromatogr.* **590**: 215–22 (1992).

- [9] Sendra, J., y Carbonell J. 1999. Centro de Información Cerveza y Salud del IATA/CSIC. Evaluación de las propiedades nutritivas, funcionales y sanitarias de la cerveza, en comparación con otras bebidas. Madrid, España, p. 65.
- [10] Hough, J. S., Briggs, D. E., Stevens, J. S. and Young, T. W. Metabolism of wort by yeast. *Malting and Brewing Science*. London: Chapman and Hall, p. 595 (1981)
- [11] Instituto Tecnológico Agroalimentario AINIA. 2000. Proyecto mejores técnicas disponibles en el sector cervecero.
- [12] Master Brewing Association of the Americas. 1982. Beer Packaging. MBAA Published, Madison, Wisconsin, p. 624.
- [13] O'Connor-Cox, E.S.C., Yiu P.M. y Ingledeu, A.M. 1991. Pasteurization: Thermal death of microbes in brewing. *MBAA Technical Quarterly*. 28(2): 67-77.
- [14] Kyle, J. 1998. Measuring points and PU Pick-Up. *MBAA Technical Quarterly*. 35(4): 203-207.
- [15] Vicente, J. 1999. Proceso de selección y entrenamiento de panelistas especializados en la evaluación de la calidad sensorial de la cerveza. Tesis Lcdo., Universidad Agraria la Molina, Lima, Perú., p. 115.
- [16] Master Brewing Association of the Americas. 2002. El cervecero en la práctica. 3^{ra} edición. MBAA published, St. Paul, Minnesota, p. 830.
- [17] Charalambous, G. 1980. The analysis and control of less desirable flavors in foods and beverages. *Academic Press, Inc., London*, p. 358.
- [18] Tomás Pérez-Ruiz, Carmen Martínez-Lozano, Virginia Tomás, Jesús Martín. High-performance liquid chromatographic separation and quantification of citric, lactic, malic, oxalic and tartaric acids using a post-column photochemical reaction

and chemiluminescence's detection. *Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Murcia, 30071 Murcia, Spain.*

[19] Shelly Li¹, James S. Fritz*. Organic modifiers for the separation of organic acids and bases by liquid chromatography *Ames Laboratory, US Department of Energy and Department of Chemistry, 322 Wilhelm Hall, Iowa State University, Ames, IA 50011, USA*

[20] Luigi Montanari, Giuseppe Perretti, Fausta Natella, Alessia Guidi and, Paolo Fantozzi Luigi Montanari: Organic and Phenolic Acids in Beer: *National Institute of Nutrition, Rome (Italy)*

[21] Guanghou Shui, Lai Pen Leong. Separation and determination of organic acids and phenolic compound in fruits juices and drinks by High-Performance Liquid Chromatography. *Food Science and Technology Programme. Singapore. 2002*

[22] M. Castellari, E. Sartini, U. Spinabelli, C. Riponi, and S. Galassi Determination of Carboxylic Acids, Carbohydrates, Glycerol, Ethanol, and 5-HMF in Beer by High-Performance Liquid Chromatography and UV–Refractive Index Double Detection *Istituto di Industrie Agrarie, Università degli Studi di Bologna, via S. Giacomo, 7-40126 – Bologna, Italy*

[23] L.C. Nogueira, M.F. Martins, J.F.C. Silva, S.C. Cunha, Quantification of organic acids in different hplc/uv i.m.p.l.v.o. *Laboratório de Bioquímica Nutricional e de Alimentos, Instituto de Química, Universidade Janeiro, Brasil.*

[24] Eniko Tatara, Victor G. Mihucz, Boglarka Kmethy, Gyula Zaray, Ferenc Fodord Determination of organic acids and their role in nickel transport within cucumber plants *Department of Inorganic and Analytical Chemistry, L. Eotvos University,*

[25] Christina Schoenberger, Martin Krottenthaler, and Werner Back. Sensory and Analytical Characterization of Nonvolatile Taste-Active Compounds in Bottom-Fermented Beers *Technologie der Brauerei, I Weihenstephan Lehrstuhl für*, Freising Bavaria, Germany.

[26] T. Boekhout Vincent Robert, Vincent Robert. Yeasts in Food Behr's Verlag DE – Editor USA 2003 pp 357-59.

[27] D. E. Briggs, J. S. Hough, R. Stevens, Tom W. Malting and Brewing Science. Publicado por Springer, USA 1982. pp 595-99

[29] J F Jackson, H F Linskens Analysis of Taste and Aroma Publicado por Springer, 2002. pp 29-34

[30] Brian J. B. Wood Microbiology of fermented foods: V. 1&2 Publicado por Springer, 1998 pp 509-11