



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES**

**CUAUTITLÁN**

**DESARROLLO DE UN MÉTODO ELECTROFORÉTICO PARA  
LA DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS EN  
CERVEZA**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**QUÍMICA**

**PRESENTA:**

**CRISTINA BELEM BARAJAS VALLEJO**

**ASESORA: DRA. ALMA LUISA REVILLA VÁZQUEZ**

**CUAUTITLÁN IZCALLI EDO. DE MEX.**

**2010**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## DEDICATORIAS

*A la memoria de mi abuelita Nina que me quiso mucho y que todo el tiempo confió en mí, donde quiera que te encuentres siempre te recordaré...*

*A mi abuelito Julio Vallejo Ruiz, por sus consejos y su ejemplo de fortaleza.*

*A mi mami Marcela Leonor Vallejo Rodríguez le agradezco con todo mi amor por que lo único que hace es apoyarme, creer en mi y por que no me deja sola, mamacha, este logro también es tuyo, te quiero mucho.*

*A mi papá Alberto Barajas García por todo lo bueno que me enseñó y deseó para mí.*

*A mis hermanitos Israel Alberto, Sofía Carolina y Julián Mauricio, los quiero bebes.*

*A la Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez por su paciencia, consideración, entereza y gran apoyo para la realización de este trabajo.*

*A la Dra. Gabriela Vargas por demostrarme que todo en esta vida es posible.*

*A Martin por ser un apoyo incondicional en las buenas y en las malas. Gracias Kachin*

*A las familias: Barajas, Vallejo y Rodríguez con mucho cariño a todos mis tíos, tías, primos, primas a los que están y a los que se fueron, gracias por saberme dar lo mejor de ustedes y siempre confiar en mi, están todo el tiempo en mi corazón.*

*A mi tío Gerardo por su amistad y su herencia musical la cual me acompañó durante la elaboración de esta tesis*

*A las niñas del servicio social: Marisol, Chable, Karen quienes ayudaron a la realización de este trabajo.*

*A Gabriela Rodríguez por su leal y sincera amistad así como el apoyo para la realización de esta tesis.*

*A mis compañeros del laboratorio L-101 Carlos, Faby, Juan Carlos, Sandy, Elva y Dany, nunca olvidaré los momentos que compartimos juntos, en especial por tantos martes, jueves y viernes de plaza.*

*A mis amigas del football americano del equipo Halcones con quien compartí buenos momentos de desestres, adrenalina y emociones, obviamente también con mucho cariño al Coach Jaime Mondragón Aguilar.*

*A mi amiga Nancy Araceli Cosme Godínez por su amistad y por escucharme siempre.*

*A mis amigas Elena y Erika Daniela, por el aprecio que me tienen y por ser incondicionales.*

*A Víctor Castillo y a Gustavo Reyes por su compañerismo y amistad durante lo largo de la carrera.*

*De manera especial a mis compañeros de OPTA S.A. de C.V. quienes con su apoyo puedo crecer como persona y profesionalista.*

*Al Sr. Draucin por los arreglos al material de vidrio que utilice al elaborar este trabajo.*

*A Alejandro Jaime Velázquez, gracias, totales!*

***AGRADECIMIENTO***

***A LA UNAM FES CUAUTITLAN CAMPO 1, POR PERMITIRME SER PARTE DE ELLA, CON  
ORGULLO LA LLEVARE EN MI CORAZÓN POR SIEMPRE...***

Se agradece el apoyo económico a la DGAPA-UNAM Proyecto  
PAPIIT IN 208608

“Desarrollo y evaluación de nuevos métodos analíticos para la determinación de  
principios activos en formulaciones farmacéuticas por electroforesis capilar”

## INDICE

	<b>Página</b>
<b>1.- INTRODUCCION</b>	<b>1</b>
<b>2.- OBJETIVOS</b>	<b>4</b>
2.1.- Objetivo general	<b>5</b>
2.2.- Objetivos particulares	<b>5</b>
<b>3.- HIPOTESIS</b>	<b>6</b>
<b>4.- GENERALIDADES</b>	<b>8</b>
4.1.- Ácidos carboxílicos	<b>9</b>
4.1.1.- Nomenclatura	<b>9</b>
4.1.2.- Propiedades fisicoquímicas	<b>10</b>
4.1.2.1.- Punto de ebullición	<b>10</b>
4.1.2.2.- Punto de fusión	<b>10</b>
4.1.2.3.- Solubilidad	<b>10</b>
4.1.2.4.- Acidez	<b>10</b>
4.2.- Cerveza	<b>13</b>
4.2.1.-Historia de la cerveza	<b>13</b>
4.2.2.-Componentes de la cerveza	<b>14</b>
4.2.3.- Proceso de elaboración de la cerveza	<b>18</b>
4.2.4.- El flavor	<b>20</b>
4.2.5.- Acidez de la cerveza	<b>20</b>
4.2.6.- Ácidos orgánicos de la cerveza	<b>20</b>
4.3.- Electroforesis capilar	<b>21</b>
4.3.1.- Antecedentes de la electroforesis capilar (EC)	<b>21</b>
4.3.2.- Proceso electroforético	<b>21</b>
4.3.3.- Electroforesis Capilar	<b>21</b>
4.3.4.- Aspectos teóricos del fenómeno electroforético	<b>22</b>
4.3.5.- Electroosmosis	<b>23</b>
4.3.6.- Flujo electroosmótico (FEO)	<b>24</b>
4.3.6.1.- Factores que afectan la movilidad del flujo Electroosmótico	<b>24</b>
4.3.6.2.- Modificador de flujo	<b>24</b>
4.3.7.- Potencial Zeta	<b>25</b>
4.3.8.- Modalidades de separación de la electroforesis capilar	<b>26</b>
4.3.9.- Semejanzas de electroforesis capilar y cromatografía de líquidos de alta resolución	<b>27</b>
4.3.10.- Diferencias entre electroforesis capilar y cromatografía de líquidos de alta resolución	<b>27</b>
4.3.11.- Componentes de un equipo de electroforesis capilar	<b>28</b>
<b>5. EXPERIMENTACIÓN</b>	
5.1.- Equipo	<b>29</b>
5.2.- Material	<b>30</b>
5.3.- Reactivos	<b>30</b>
5.4.- Preparación de soluciones	<b>30</b>
5.5.- Plan de trabajo	<b>33</b>
5.6.- Desarrollo del método electroforético	<b>33</b>
5.7.- Tratamiento de la muestra	<b>33</b>

<b>6. RESULTADOS Y DISCUSION</b>	
6.1.- Optimización del método	35
6.2.- Mezcla de estándares	37
6.3.- Longitud de onda	38
6.4.- Electrolito soporte	39
6.5.- Longitud del capilar	40
6.6.- Lavado entre corridas	41
6.7.- Temperaturas	42
6.8.- Tratamiento de la muestra	43
6.9.- Identificación de ácidos orgánicos mediante electroforesis capilar	46
6.10.- Cuantificación de ácidos orgánicos mediante electroforesis capilar	48
6.11.- Análisis de la cuantificación de ácidos orgánicos en cerveza	56
6.12.- Electroferogramas obtenidos en la cuantificación de ácidos orgánicos en cervezas	57
<b>7.- CONCLUSIONES</b>	<b>62</b>
<b>8.- REFERENCIAS</b>	<b>65</b>

# **INTRODUCCIÓN**

## 1. INTRODUCCIÓN

La elaboración de la cerveza muy a menudo es considerada como uno de los procesos biotecnológicos más antiguos en la historia del hombre. Con el paso del tiempo la química y la bioquímica han explicado y detallado los cambios que suceden durante el proceso de elaboración, de ahí la amplia gama en cuanto a variedad de productos existen y que en calidad se diferencian.

El gusto, aspecto y calidad nutricional, son algunos de los factores que caracteriza la preferencia de la cerveza sobre los consumidores convirtiéndola en una bebida muy popular.

Para cualquier alimento o bebida, las características sensoriales son un parámetro vital mediante el cual el consumidor valora un producto y el caso de la cerveza no es una excepción motivo por el cual en base a su origen, clasificación, gusto, aroma y sensación bucal se ha introducido una unidad denominada “flavor” mediante la cual se puede determinar la calidad de una cerveza.

El dulzor, la acidez, la salidez y el amargor que una cerveza presenta está en función a la estabilidad del flavor, de ahí que sea de suma importancia el estudio de los componentes que denominan este complejo parámetro. (2)

La acidez de una cerveza se debe a la presencia de ácidos en el producto final, procedentes del material con el que fue elaborada, del proceso, de la levadura, y de las condiciones de la fermentación.

Los ácidos orgánicos son constituyentes muy importantes de la cerveza por que tienen efecto sobre el sabor y vida de anaquel, como patrón de una fermentación llevada a cabo normalmente y porque significa la distinción entre diferentes tipos de cerveza, dan indicaciones respecto a las diferencias en la composición de los materiales empleados y en las variaciones de la bebida. (2,4)

La importancia de estudio de los ácidos orgánicos en diversos productos radica en la influencia que presentan sobre el control y estabilidad microbiológica. (11). Cuantificarlos es importante para monitorear el crecimiento y actividad bacteriana esto por razones nutrimentales. (12).

Hasta hace algunos años se había estado analizando a los ácidos orgánicos por medio de técnicas de separación como la cromatografía iónica (IC), cromatografía por exclusión (IEC), cromatografía de gases (GC) y por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAR) (8), sin embargo, la preparación de las muestras de diversas matrices, el tiempo de análisis, el elevado precio de las columnas, el tiempo de vida corto de las mismas, el limitado número de muestras analizadas y el alto consumo de solventes, han hecho de estas técnicas ser poco rentables, sobre todo en la industria donde los parámetros de calidad son exigentes en cuanto a rapidez, eficiencia y eficacia se refiere.

Es por ello que recientemente la electroforesis capilar ha sido una herramienta de separación poderosa (7) que ha complementado a las técnicas cromatográficas ya que parte de presentar diversas áreas de aplicación, presenta grandes ventajas por ser un método analítico sensible, eficiente, de bajo costo, rápido y por generar un mínimo de residuos tóxicos.

El propósito de este trabajo radica en el de desarrollar un método electroforético (EC), que permita cuantificar los ácidos orgánicos presentes en diversas muestras de cervezasmexicanas.

# **OBJETIVOS**

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GENERAL**

- Desarrollar un método analítico por electroforesis capilar para separar, identificar y cuantificar ácidos orgánicos en cervezas mexicanas de mayor consumo.

### **2.2 OBJETIVOS PARTICULARES**

- Determinar las condiciones electroforéticas óptimas para la identificación y separación de ácidos orgánicos en cerveza por Electroforesis Capilar.
- Realizar las curvas de calibración para cuantificar los ácidos orgánicos presentes en cervezas mexicanas de mayor consumo.
- Establecer el procedimiento del tratamiento de una muestra de cerveza que permita la cuantificación de ácidos orgánicos.
- Aplicar el método analítico desarrollado para la cuantificación de los ácidos orgánicos en muestras de cervezas de mayor consumo en nuestro país, con el fin de establecer condiciones de análisis a bajo costo y en menor tiempo.

# HIPÓTESIS

### **3. HIPÓTESIS**

Si conocemos las propiedades físicas y químicas de los ácidos orgánicos como lo son: ácido oxálico, fumárico, málico, tartárico, succínico, pirúvico, acético y benzoico, se podrá desarrollar un método analítico por electroforesis capilar de zona para la cuantificación de estos ácidos orgánicos presentes en muestras de cervezas mexicanas de mayor consumo.

# **GENERALIDADES**

## 4. GENERALIDADES

### 4.1. ÁCIDOS CARBOXÍLICOS

Los ácidos carboxílicos también denominados ácidos orgánicos son aquellas sustancias que poseen al menos un grupo carboxilo. Su nombre de ácido se debe a sus propiedades esenciales, el átomo de hidrogeno del grupo funcional es lábil hasta el punto de ser sustituible (). Puesto que un átomo de oxígeno necesita solo dos enlaces covalentes para satisfacer sus requisitos de valencia no participa ordinariamente en enlaces triples sin embargo, un átomo de carbono se puede unir a dos átomos de oxígeno. La sustitución del hidrógeno de un aldehído por

un grupo -OH produce al ácido carboxílico, compuesto por un grupo carboxilo  $\begin{array}{c} \text{O} \\ || \\ \text{---COH} \end{array}$  que se abrevia  $\text{---CO}_2\text{H}$  o  $\text{---COOH}$  y que es uno de los grupos funcionales base de una gran familia de compuestos relacionados. Todos estos derivados de los ácidos carboxílicos contienen al grupo acilo  $\begin{array}{c} \text{O} \\ || \\ \text{RC---} \end{array}$ . Numerosos ácidos carboxílicos se encuentran en la naturaleza por ejemplo ácido acético, ácido butanoico, ácido hexanoico, ácido cólico etc.

#### 4.1.1 NOMENCLATURA

Las reglas de la IUPAC permiten dos sistemas de nomenclatura dependiendo de la complejidad de la molécula del ácido. Los ácidos carboxílicos que derivan de alcanos de cadena abierta se nombran en forma sistemática reemplazando la *-o* terminal del alcano correspondiente con *-oico* y anteponiendo la palabra *ácido*. En este sistema el átomo de carbono del carboxilo se considera como el C1 al numerar los carbonos de la cadena. Una alternativa se refiere a los compuestos que tienen un grupo  $\text{---COOH}$  enlazado a un anillo los cuales se nombran usando el sufijo *-carboxílico* y anteponiendo la palabra *ácido*. El carbono del  $\text{---COOH}$  está unido al C1 y no se numera en este sistema.

## **4.1.2 PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS DE LOS ÁCIDOS CARBOXÍLICOS**

### **4.1.2.1.- PUNTOS DE EBULLICIÓN**

Los ácidos carboxílicos hierven a temperaturas muy superiores que los alcoholes, cetonas o aldehídos de pesos moleculares debido a la formación de dímeros cíclicos que hace que aumente el punto de ebullición.

### **4.1.2.2 PUNTOS DE FUSIÓN**

Los ácidos carboxílicos que contienen más de ocho átomos de carbono, por lo general son sólidos, los puntos de fusión bajos se deben a la presencia de dobles enlaces (cis) en una cadena larga, la cual impide la formación de una red cristalina estable. A diferencia de los ácidos dicarboxílicos, los puntos de fusión, son elevados ya que teniendo dos carboxilos por molécula, las fuerzas de los puentes de hidrógeno son fuertes, por lo cual se necesitan de altas temperaturas para romper la red de puentes de hidrógeno en el cristal y fundir el diácido.

### **4.1.2.3 SOLUBILIDAD**

Debido a la formación de puentes de hidrógeno con el agua, los ácidos carboxílicos de peso molecular más bajo son miscibles, a medida de que aumenta la longitud de la cadena disminuye la solubilidad. La solubilidad de los ácidos carboxílicos se ve favorecida con solventes de polaridad baja como alcoholes o cloroformo, debido a que el ácido continúa existiendo en la forma dimérica.

### **4.1.2.4 ACIDEZ**

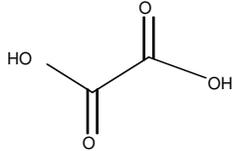
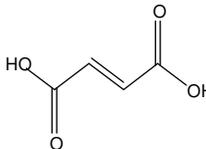
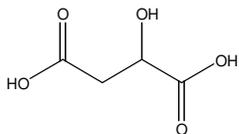
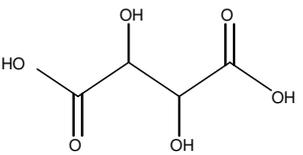
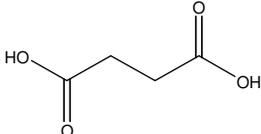
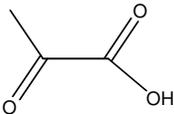
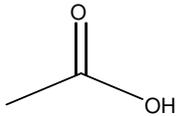
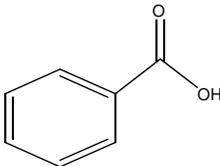
Un ácido carboxílico se puede disociar en agua para dar un protón y un ion carboxilato. Normalmente los valores de la constante de acidez ( $K_a$ ) de los ácidos carboxílicos simples son de alrededor de  $10^{-5}$ . Por ejemplo la constante de acidez del ácido acético ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) es de  $10^{-4.7}$ .

Aunque los ácidos carboxílicos nos son tan ácidos como los ácidos minerales, son mucho más ácidos que otros grupos funcionales. 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 ion carboxilato con la carga 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 ion carboxilato hace que éste sea mucho más estable que un ion alcóxido por tanto, la disociación de un ácido es menos endotérmica que la de un alcohol. Los ácidos carboxílicos son considerados como ácidos débiles, por lo cual los aniones carboxilato resultan ser bases débiles.

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

**Tabla 1. Algunas propiedades de los ácidos orgánicos contenidos en la cerveza**

Ácido Orgánico	Peso Molecular g/mol	Pureza %	Solubilidad	Estructura Química	pKa
Ácido oxálico	90.04	98	Altamente soluble en agua		1.25, 4.29
Ácido fumárico	116.07	99	Altamente soluble en agua		3.2, 4.39
Ácido málico	134.09	98	Altamente soluble en agua		3.45, 5.9
Ácido tartárico	150.09	99.5	Altamente soluble en agua		3.04, 4.37
Ácido succínico	118.09	99	Soluble en metanol		4.2, 5.63
Ácido pirúvico	88.06	99	Altamente soluble en agua		2.49
Ácido acético	60.05	99	Altamente soluble en agua		4.76
Ácido benzóico	122.12	98	Soluble en agua caliente y en metanol		4.2

## 4.2 CERVEZA

Nombre de una bebida alcohólica elaborada por la fermentación de soluciones obtenidas de cereales y otros granos que contienen almidón. Se presume que su nombre proviene del latín clásico *cervisia* o *cerevisia*, por referencia a *Ceres*, diosa de la agricultura.

La cerveza es una mezcla compleja de diferentes compuestos en medio ácido, todos ellos contribuyen a su gusto y características organolépticas (2). Un gran número de ácidos orgánicos están presentes en la cerveza de cuya concentración depende de los materiales crudos, el procedimiento de fermentación, la levadura y las condiciones de fermentación. Una amplia variedad de ácidos orgánicos son producidos durante la fermentación, algunos de los cuales hacen importante contribución al sabor (3). Los ácidos orgánicos (además del CO<sub>2</sub>) afectan la acidez/pH, sabor y tienen efectos positivos fisiológicos (diurético, reducción del ácido úrico) (4).

### 4.2.1 HISTORIA DE LA CERVEZA

La historia de la cerveza está íntimamente ligada a los primeros pasos dados por el hombre, su origen se remonta a la prehistoria, relacionando con la aparición de grupos sociales sedentarios, en la agricultura y la consiguiente necesidad de almacenamiento de los granos el cultivo de cereales y la elaboración de pan.

Los agricultores observaron que esta combinación de granos molidos, puestos en un recipiente y expuestos al medio ambiente normal fermentaba (por la acción de microorganismos existentes en el ambiente). El resultado de lo obtenido les agradó y probaron agregar agua a la pasta resultante del fermento.

Por el siglo XIII, se incorporó el lúpulo a la mezcla, que estaba encargado de darle sabor y aroma debido a sus conocidas cualidades antisépticas, que otorgan estabilidad a la bebida. (15).

La cerveza se elabora a partir de extractos acuosos de los granos de cebada germinada. Las enzimas producidos durante la germinación digieren el almidón del cereal para formar azúcares, que son transformados posteriormente en alcohol por levaduras. Se añade lúpulo para conferir los aromas y “flavores” característicos. (2)

## 4.2.2 COMPONENTES PRINCIPALES DE LA CERVEZA

### Cereal

La elaboración de la cerveza se puede hacer con cualquier cereal, los cuales son preparados para que sus azúcares sean fermentables. Para elaborar la cerveza se utilizan varios cereales en su estado crudo o malteado, siendo la cebada el único que necesariamente debe maltearse y el más utilizado en la cervecería.

Básicamente las maltas se distinguen en cuatro categorías:

**I.- Malta básica:** Maltas claras, poco horneadas con gran poder enzimático, que suelen formar la parte más grande o la totalidad de la mezcla. En concreto estas maltas son llamadas lager, pale o pils, según el fabricante.

**II.-Maltas aditivas:** Son maltas de color que va de ámbar a negro, muy horneado y con poco o nada de poder enzimático. Suelen ser usados en pequeñas cantidades para incidir sobre el color o el gusto de la cerveza o por algún motivo técnico propio de las elaboraciones conocidas como maltas negras, maltas chocolate o maltas tostadas.

**III.- Maltas mixtas:** Estas maltas están más tostadas que las maltas base pero conservan propiedades enzimáticas suficientes al menos para sus propios azúcares, de manera que pueden ser usados como base o como aditivos. En esta categoría encontramos las maltas de color ámbar y caramelo. En esta área, existen dos maltas caramelo particulares llamadas Múnich y Viena muy importantes en la cervecería de esos países.

**IV.- Cereales crudos, tostados o gelatinizados:** Se suelen utilizar en pequeñas cantidades. La calidad de los cereales, sus variedades, y la calidad del proceso de malteo definen en gran medida la calidad de la cerveza.

### Lúpulo

En la elaboración occidental de la cerveza, el lupus es el aditivo principal que se utiliza como equilibrante del dulzor. De esta planta se utiliza la flor hembra sin fecundar. En la base de sus bracteólas, hay unas glándulas que contienen la lupulina, que es el ingrediente que aportará a la cerveza su sabor amargo y los aromas propios. Existen numerosas variedades botánicas del lúpulo que son objeto de investigaciones intensas. Para su comprensión, también se clasifican en categorías:

**Lúpulos amargos:** Son los que aportan más ácidos amargos que aromas. Los representantes más conocidos de esta categoría son el brewer'sgold y el northernbrewer o nordbrauer.

**Lúpulos aromáticos:** Estos aportan más elementos aromáticos que amargos. En este apartado se conocen especialmente el saaz/zatec que definen el estilo pilsner de cerveza, el spalt y el tettnang en el área alemana, y los golding y fuggler en el área anglófona.

**Lúpulos mixtos:** Aportan ambas características juntas aunque menos acentuadas. En esta clasificación está el hallertau y sobre todo sus derivados botánicos, así como el hersbrucker y sus derivados.

El lúpulo es muy delicado, solamente se puede utilizar fresco durante los pocos meses de su cosecha, que coincide con la de la viña: finales de agosto a octubre según las variedades y el sitio. Fuera de este intervalo temporal se tiene que condicionar, de manera que el mercado presenta diversas formas que van desde el lúpulo deshidratado hasta extracto de lúpulo. La variedad y el frescor del lúpulo influyen muy sensiblemente en la calidad final de la cerveza.

## **Otros aditivos**

### **Frutas**

Actualmente se describen cervezas que en una operación ulterior a la fermentación se le añade fruta, zumo de fruta o jarabe, procediendo así una adición de azúcares que provocan una segunda fermentación. Los tipos históricos son la cerveza de cereza (kriek) y la de frambuesa (frambozen). Existen otras de creación mucho más recientes, de kiwi, de albaricoque o de plátano.

### **Plantas**

Hay cervezas aromatizadas con cáñamo, romero, castaña y con especias como el jengibre, coriandro, peladura de naranja de curaçao, pimienta, nuez moscada, etcétera.

### **Otros**

La cerveza puede funcionar como excipiente o soporte de muchas cosas, actualmente en algunas micro-cervecerías francesas a la cerveza se le adiciona miel o vino esto para inferir en su aroma.

## **Agua**

Entre el 85 y 92% de la cerveza es agua. Cada tipo o estilo de cerveza requerirá una calidad diferente de agua. Algunas requieren agua de baja mineralización, otras necesitan aguas duras con mucha cal. Actualmente casi todas las cervecerías tratan las aguas de manera que siempre tenga las mismas características para una misma receta de cerveza.

Entre los minerales del agua que más interesan a los cerveceros están el calcio, los sulfatos y los cloruros. El calcio aumenta la extracción tanto de la malta como del lúpulo en la maceración y en la cocción y rebaja el color y la opacidad (o lo turbia que es) de la cerveza. Los sulfatos refuerzan el amargor y la sequedad del lúpulo. Los cloruros dan una textura más llena y refuerzan la dulzura.

## **Levadura**

Existen dos tipos básicos diferentes de levadura que definen los dos grandes grupos estilísticos de cervezas:

### **I.- La levadura de alta fermentación**

Se encuentra en los tallos de los cereales y en la boca de los mamíferos. Fue descubierta por Louis Pasteur en 1852 en sus investigaciones sobre la cerveza. Esta variedad actúa a temperaturas de entre 12 y 24 °C y se sitúa en la superficie del mosto. A las cervezas que se consiguen con este tipo de fermentación se les llama de alta fermentación o Ales.

### **II.- La levadura de baja fermentación**

Es una variedad descubierta involuntariamente por los cerveceros del sur de Alemania que sometían sus cervezas a una maduración a bajas temperaturas en las cuevas de los Alpes. Estos hongos, se suelen situar en el fondo del fermentador. Las cervezas que se elaboran con esta variedad son las llamadas de baja fermentación o Lager.

### **III.- La levadura de fermentación espontánea**

En estas cervezas el elaborador no selecciona ninguna levadura sino que permite que todas las levaduras en suspensión en el aire se introduzcan en el mosto. Así se instalan, a parte del *Saccharomyces*, más de 50 fermentadores diferentes entre los cuales hay que citar el *Lactobacillus* (es una bacteria), que produce el ácido láctico, y el *Brettanomyces*, que produce el ácido acético. Estas cervezas son pues ácidas por definición, y su elaboración requiere procedimientos especiales destinados a rebajar la acidez.

**Tabla 2.- Componentes principales de la cerveza (2)**

<b>Malta</b>	Está constituida por granos de cebada germinados durante un periodo limitado de tiempo, y luego desecados.
<b>Lúpulo</b>	Flor indispensable para la elaboración de la cerveza debido a su sabor amargo agradable y su aroma suave característico además de dar permanencia a la espuma.
<b>Levadura</b>	Hongos microscópicos unicelulares que transforman los glúcidos y los aminoácidos en alcohol y CO <sub>2</sub> .
<b>Agua</b>	Las características del agua de fabricación influyen sobremanera en la calidad de la cerveza. En la fabricación de cerveza se utiliza agua potable cuyas características organolépticas deben ser completamente normales.
<b>Adjuntos</b>	Debido a la alta fuerza diastática (fermento) de la malta es necesario agregar cereales no malteados a la cerveza para que su estabilidad sea buena. El uso de adjuntos produce cervezas de un color más claro con un sabor más agradable con mayor luminosidad y mejores cualidades de aceptación de enfriamiento.
<b>Carbohidratos</b>	Provenientes de la cebada malteada, su contenido en la cerveza oscila entre los 2 o 3 g/100 mL. Son la principal fuente de azúcares fermentables.
<b>Proteínas</b>	Contiene de 0,2 a 0,6 g/100mL. de material proteico teniendo su origen en la cebada malteada la cual presenta del 10-12 % de proteína. La mayoría de las cervezas contienen todos los aminoácidos esenciales.
<b>Minerales</b>	Debido a su contenido de agua mayor al 90% la cerveza contiene diversos iones minerales. El contenido mineral difiere entre un país y otro por la composición del agua. Se les atribuye un efecto sobre el flavor significativo.
<b>Vitaminas</b>	Presenta vitaminas hidrosolubles, especialmente las del grupo B. Un consumo moderado de la cerveza hace relevante el aprovechamiento de las mismas.
<b>Fibra</b>	Contiene entre 0,3 y 1 g/100 mL. de fibra, resultante de las paredes celulares de la cebada la cuáles están constituidas por $\beta$ - glucano, polisacáridos no amiláceos.

### 4.2.3.- PROCESO DE ELABORACIÓN DE LA CERVEZA

#### **Germinación de la malta**

El grano de cebada, seleccionado, limpiado y humedecido, se extiende en una gran sala llamada cámara de germinación, la cual está acondicionada a 18-20°C. Enseguida con ayuda del Galland, (aparato formado por dos cilindros, uno metálico exterior y otro interior giratorio de tela metálica) en donde caen las semillas desde una tolva; por un eje interior sale una corriente de aire húmedo. El proceso dura de ocho a nueve días y se interrumpe con una corriente de aire a 25°C que deseca los granos (malta verde). Enseguida se tuestan en hornos especiales entre 100 y 200°C y se muelen hasta reducirlos a harina.

#### **Maceración**

Transformación del almidón en azúcar fermentable, que se realiza entre 60 y 70°C mediante la diastasa y dura unas 3 horas. El agua caliente se añade a las cubas que tienen agitadores en las que está la harina de malta. Hirviendo el líquido se detiene la acción enzimática, y las proteínas indeseables coagulan y precipitan. Se filtra en una cuba decantadora (lauter), provista de doble fondo agujereado, o bien en filtros prensa. El filtrado, llamado mosto, se hierve en grandes depósitos, en donde se adiciona la cantidad precisa de lúpulo. Se filtra, se enfría y airea.

#### **Fermentación**

Se introducen levaduras que se clasifican en:

**Altas**, formadas por cultivos de *Saccharomyces cerevisiae*, que suben a la parte posterior del tanque de fermentación (cervezas "ale"). El proceso empieza alrededor de los 9°C; la temperatura asciende unos pocos grados en la fermentación tumultuosa, y finalmente desciende alrededor de 5°C en el enfriamiento. Al cabo de unos días comienza la fermentación lenta, que dura de quince a veinte días, según la fábrica y el tipo de cerveza.

**Bajas**, formadas por cultivos de *Saccharomyces carlsbergensis*, que se depositan en la parte inferior, con temperaturas entre 15 y 20°C (cervezas "Lager").

## Maduración

Este proceso consiste en dejar reposar el líquido en tanques especiales durante algunos meses. Se adicionan agentes antioxidantes, ácido sulfuroso o ácido ascórbico, para evitar el cambio de gusto. A veces se filtra con ayuda de agentes clarificantes.

## Envasado

El contenido de anhídrido carbónico se regula en el tanque embotellador. El envasado de la cerveza se realiza en botellas, botes, cubas o barriles, generalmente se pasteuriza. La cantidad de alcohol oscila del 2 al 6%. Gracias al envasado la cerveza llega a su hogar con las mayores garantías de conservación, sabor y cuerpo.



Figura 1. Proceso de fabricación de la cerveza[21]

#### 4.2.4.- EL FLAVOR

La evaluación sensorial en la cerveza se basa en la rueda del flavor que incorpora aspectos de textura y percepción bucal. La unidad del flavor (UF) es un número adimensional, útil, que proporciona un indicador que involucra gusto, aroma y sensación bucal (2).

La complejidad de la composición y producción de cerveza ofrece numerosas opciones para su alteración con el tiempo sobre todo por el diverso grupo de componentes presentes en medio ácido.

#### 4.2.5 ACIDEZ DE LA CERVEZA

Se debe a la presencia de ácidos orgánicos en el producto final, que proceden de la levadura. Los niveles finales de estos ácidos orgánicos están en función del vigor de la fermentación.

#### 4.2.6 ÁCIDOS ORGÁNICOS EN LA CERVEZA

**Tabla 3. Concentraciones Típicas de Ácidos Orgánicos en Cervezas**

Ácido orgánico	Cervezas Americanas [9] (ppm)	Cervezas Mexicanas [17] (ppm)	Cervezas TIPO LAGER Klampfl [14] (ppm)
Acético	50-200	-	105 $\pm$ 1.1
Benzoico	-	200-1000	-
Cítrico	50-600	5000-10000	178 $\pm$ 1.1
Fumárico	0-8	3000	-
Glutárico	-	-	-
Láctico	50-500	2000	556 $\pm$ 1.1
Málico	20-150	-	68 $\pm$ 1.4
Oxálico	-	-	31 $\pm$ 1.3
Pirúvico	20-100	-	108 $\pm$ 1.3
Succínico	40-200	-	-
Tartárico	-	150	-

## **4.3 ELECTROFORESIS CAPILAR**

### **4.3.1 ANTECEDENTES DE LA ELECTROFORESIS CAPILAR**

Las primeras experiencias separativas utilizando los principios electroforéticos fueron realizadas en los años 30 por Tiselius usando un tubo en U que contenía disoluciones libres o no soportadas, posteriormente se utilizaron columnas y soportes planos como sílice, papel, almidón o poliacrilato humedecidos con disoluciones acuosas.

Aunque su uso y aplicación para identificación y cuantificación de proteínas y otras macromoléculas dio resultados favorables, estas técnicas presentaron inconvenientes porque eran lentas, laboriosas, además de presentar poca reproducibilidad y no permitir la automatización.

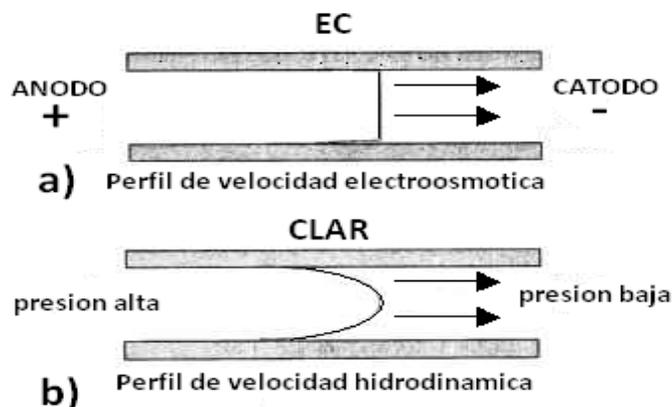
Fue entonces hasta finales de los años 60 cuando surge la electroforesis capilar, resultando novedoso el uso de capilares en vez de superficies planas haciendo viable la técnica al eliminar el calentamiento por efecto Joule (6).

### **4.3.2 PROCESO ELECTROFORETICO**

Es el movimiento diferencial o migración de iones en disolución por atracción o repulsión en un campo eléctrico. Teniendo un electrodo positivo y uno negativo colocados en una disolución conteniendo iones de diferente carga, aniones con carga negativa y cationes con carga positiva, se mueven a través de la disolución hacia el electrodo de carga opuesta. (6)

### **4.3.3 ELECTROFORESIS CAPILAR**

La electroforesis capilar es una técnica de separación basada en la migración de un compuesto cargado bajo la influencia de un campo eléctrico. El flujo electroosmótico (FEO) generado por los grupos silanol de la superficie interna del capilar da como resultado una corriente plana del frente del líquido que contrasta con el frente parabólico de la cromatografía líquida de alta resolución (Fig. 3).



**Figura 2 (a) EC Electroósmosis produce un flujo uniforme en más del 99.9% de la sección transversal del capilar. La velocidad disminuye en las inmediaciones de la pared capilar. (b) CLAR Perfil parabólico de velocidad de un flujo hidrodinámico con velocidad máxima en el centro del tubo y velocidad 0 en las paredes.(8)**

Las separaciones dependen de la movilidad de los analitos, según su forma, tamaño y carga. Se emplea un sistema amortiguador para mantener el pH, controlando a su vez el flujo electroosmótico.

La ventaja de esta técnica es que el capilar de sílice fundida que generalmente se cubre con una capa de poliimina para darle mayor rigidez y resistencia, tiene una ventaja a través de ella que permite el pasaje de la luz UV. Con esta técnica descrita es posible separar cationes, aniones, proteínas, macromoléculas y sustancias no cargadas en forma simultánea.

#### 4.3.4 ASPECTOS TEÓRICOS DEL FENÓMENO ELECTROFORÉTICO

La fuerza que actúa como motor de separación en la electroforesis es el voltaje aplicado. Las especies cargadas eléctricamente (iones) disueltos o suspendidos en un electrolito y sujetos a un voltaje son obligados a migrar al electrodo con carga opuesta. Las separaciones ocurren cuando los cationes se mueven en una dirección y los aniones en otra, o cuando las velocidades de migración de especies cargadas son diferentes.

La velocidad de migración se expresa como:

$$v = \mu_e E$$

donde  $v$  es la velocidad de migración de cada ion ( $m \cdot s^{-1}$ ),  $\mu_e$  es la movilidad electroforética ( $m^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}$ ) y  $E$  es el campo eléctrico aplicado dividido por la longitud total del capilar. La movilidad electroforética es el factor que indica la rapidez con la que se mueve un ion o soluto a través de la disolución de separación y esta descrita por la siguiente ecuación:

$$\mu_e = \frac{q}{6\pi\eta r}$$

Donde  $q$  es la carga del ion,  $\eta$  es la viscosidad de la disolución y  $r$  es el radio de la partícula o ion en disolución. Para medir la velocidad y la movilidad electroforética es necesario conocer el tiempo (tiempo de migración) que tarda un soluto en migrar desde el punto de inyección hasta el detector y se expresa de la siguiente manera:

$$t_m = \frac{L_T}{v_e} = \frac{L_T^2}{\mu_e V}$$

donde  $L_T$  es la longitud total del capilar (m) y  $V$  es el voltaje aplicado (V), conociendo este tiempo se podrá calcular la velocidad y movilidad electroforética de cualquier analito mediante las expresiones:

$$v_e = \frac{L_D}{t_m}$$

$$\mu_e = \frac{L_D}{t_m (L_T/V)}$$

donde  $L_D$  representa la longitud del capilar hasta la ventana de detección. Estas expresiones determinan la velocidad y la movilidad electroforética aparente, los valores reales se obtienen considerando el fenómeno de electroósmosis.

#### 4.3.5 ELECTROOSMOSIS

Es el fenómeno provocado por la carga negativa que se produce entre las moléculas del agua del búfer y de la superficie del medio de soporte, la ionización el agua produce iones oxonio ( $H_3O^+$ ), estos están cargados positivamente, por lo que al aplicar el voltaje se origina un flujo de disolvente debido al desplazamiento de los contraiones.

### 4.3.6 FLUJO ELECTROOSMÓTICO

El uso de capilares de sílice provoca un flujo electroosmótico(FEO) que hace mover a iones y moléculas presentes en el medio electroforético hacia el cátodo. A pH superiores a 6, en la superficie interna de los capilares de sílice, que contiene grupos hidroxilo, se formara una capa de protones ( $H^+$ ) cerca de la pared cargada negativamente Fig. 3. Estas cargas positivas incluyendo las moléculas de solvatación de agua son atraídas hacia el cátodo provocando el FEO, que mueve igualmente a las especies neutras que se encuentran en el medio electroforético. La velocidad de este FEO,  $V_{FEO}$  en cm/s es:

$$V_{FEO} = \left( \frac{\epsilon_0 \epsilon \xi}{4\pi\eta} \right) E$$

Donde  $\epsilon_0$  es la constante dieléctrica del vacío,  $\epsilon$  es la constante dieléctrica de la disolución de la separación,  $\xi$  es el potencial zeta,  $\eta$  es la viscosidad de la disolución de la separación y E es el campo eléctrico aplicado.

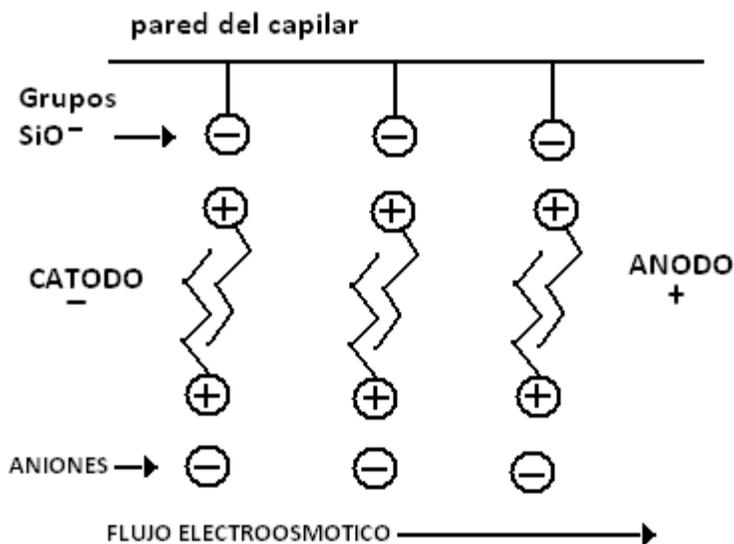
#### 4.3.6.1 FACTORES QUE AFECTAN LA MOVILIDAD DEL FEO

Los principales factores que afectan a la movilidad electroosmótica son la constante dieléctrica, la viscosidad de la disolución de separación y el valor del potencial zeta. El uso de aditivos y modificadores de la disolución de trabajo pueden influir en la constante dieléctrica y la viscosidad de separación, la cual a su vez depende de la temperatura a la cual se lleva a cabo la separación electroforética.

#### 4.3.6.2 MODIFICADOR DE FLUJO

Comúnmente se utilizan aminos cuaternarios como modificadores de flujo, como se muestra en la figura X estas sustancias poseen una parte hidrofílica y otra parte hidrofóbica donde la parte hidrofílica con carga positiva establece interacciones de tipo iónico con los grupos silanol a lo largo de toda la pared del capilar, mientras que la parte hidrofóbica establece interacciones con la parte hidrofóbica de moléculas similares de amina cuaternaria dejando expuesta la parte

hidrofílica de las moléculas que no están adheridas a la pared del capilar estas últimas quedan en contacto con los aniones contenidos en el buffer



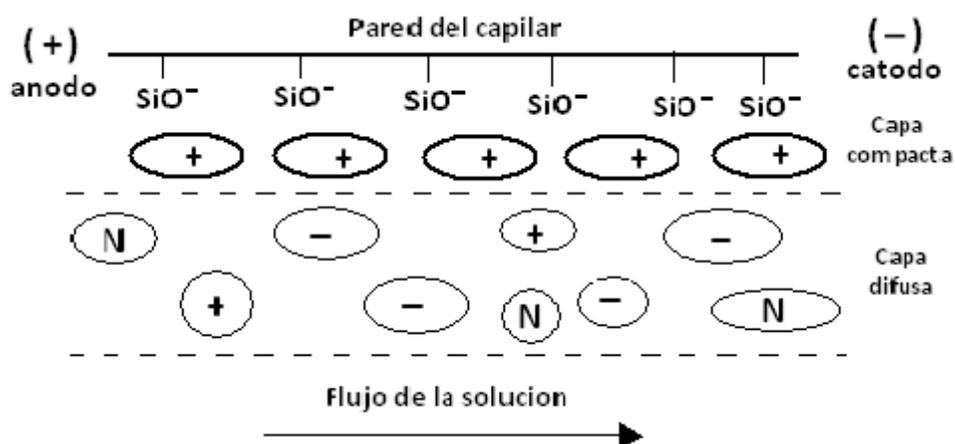
**Figura 3. Representación de un modificador de flujo en EC (3)**

De manera particular en este trabajo se utilizó el bromuro de tetradeciltrimetilamonio (TTAB) este modificador se utilizó en concentraciones menores a su concentración micelar crítica (CMC) (3)

#### 4.3.7 POTENCIAL ZETA

El potencial zeta ( $\xi$ ) es proporcional a la densidad de carga en la pared del capilar, la cual a su vez es dependiente del pH, la movilidad variará acorde con el pH de la disolución de separación, de tal forma que a elevados valores de pH, la movilidad del FEO será significativamente más importante que a  $\text{pH} < 4$ , esto debido a la baja ionización de los grupos silanol. A  $\text{pH} > 7$ , la movilidad del FEO es suficiente para asegurar la completa migración de la mayoría de los iones hacia el cátodo independientemente de su carga. El potencial zeta también depende de la fuerza iónica, si esta se eleva, la doble capa se comprime y reduce la movilidad del FEO. La movilidad electroforética de un soluto ( $\mu_a$ ) se calcula utilizando su velocidad de migración observada, que corresponde al vector suma de la movilidad electroforética real o efectiva ( $\mu_e$ ) y la movilidad de flujo electroosmótico ( $\mu_{FEO}$ ).

$$\mu_a = \mu_e + \mu_{FEO}$$



**Figura 4. Doble capa eléctrica creada por la superficie de sílice cargada negativamente y los cationes próximos. Predominio de cationes en la parte difusa de la doble capa produce el flujo electroosmótico hacia el cátodo cuando se aplica un campo externo (ANDREA WESTON)**

#### 4.3.8 MODALIDADES DE SEPARACIÓN DE LA ELECTROFORESIS CAPILAR.

**Tabla 3. Modalidades de la separación de la EC**

Modos de separación	SIMBOLO	PRINCIPIO DE SEPARACIÓN
Electroforesis capilar de zona	ECZ	Carga/tamaño
Cromatografía capilar electrocinética micelar	CCEM	Interacción hidrofóbica con micelas del surfactante
Electroforesis capilar quirál	ECQ	Formación de complejos estereoespecíficos
Electroforesis capilar por afinidad	ECA	Interacciones moleculares entre ligando y analito.
Cromatografía capilar electrocinética micelar con microemulsiones	CCEMM	Mecanismos electroforéticos y reparto cromatográfico
Electroforesis capilar en gel	ECG	Tamaño molecular
Isoelectroenfoque capilar	IIEEC	Punto isoeléctrico
Isotacoforesis capilar	ITFC	Capacidad de migración entre tampones de distinta naturaleza
Electrocromatografía capilar	ECC	Movilidad en una solución libre y retención cromatográfica.

#### 4.3.9 SEMEJANZAS ENTRE EC Y CLAR

Tanto la EC y CLAR se consideran como técnicas separativas complementarias que al trabajar con muestras en estado líquido presentan ciertas semejanzas como las siguientes:

- Operan con detección on-line y utilizan sistemas de detección que recogen la señal respuesta frente al tiempo.
- Capacidad de hacer análisis cualitativos y cuantitativos.
- Los resultados de la EC y de CLAR (electroferogramas o cromatogramas) muestran los analitos separados y son caracterizados por su tiempo de migración.
- Pueden ser acopladas a más de un sistema de detección.
- Pueden utilizarse empleando diversos modos.
- Los sistemas de EC y CLAR pueden ser automáticos.

#### 4.3.10 DIFERENCIAS ENTRE EC Y CLAR

**Tabla 4. Comparación entre la ECy CLAR.**

CAPACIDADES	ELECTROFORESIS CAPILAR	CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN
Separación de macromoléculas en disolución	✓	✗
Lograr eficacias cercanas a los millones de platos teóricos.	✓	✗
Perfil de flujo	perfil de flujo plano	Flujo laminar o parabólico
Longitud del paso de luz en la celda de detección	Milímetros	Micrómetros
Volumen de muestra	μL	nl
Costo de análisis	Alto	Bajo

#### 4.3.11 Componentes de un equipo de EC

- Capilar
- Fuente de poder
- Par de electrodos
- Depósitos (viales)
- Sistema de enfriamiento
- Detector (Arreglo de diodos)
- Sistema de adquisición de datos

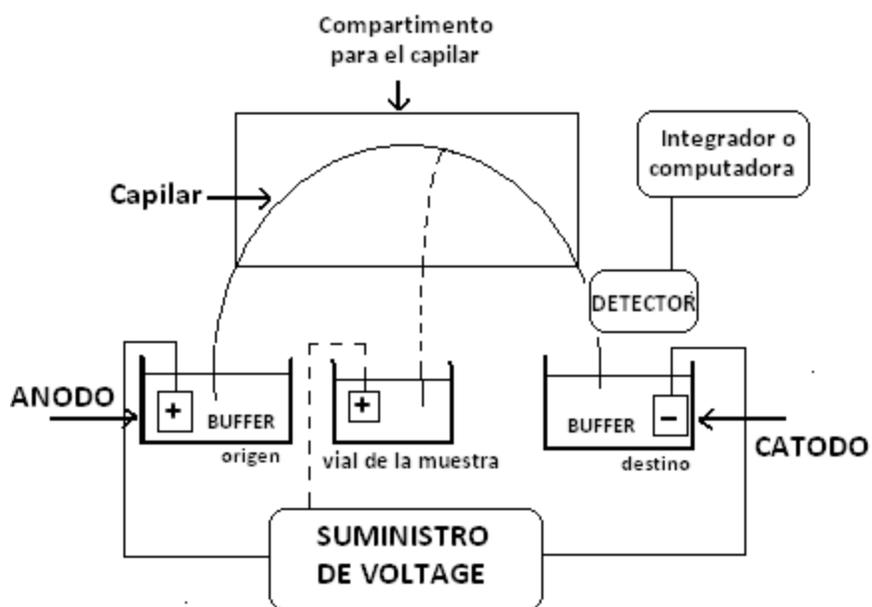


Figura 5. Componentes de un equipo de Electroforesis Capilar.(3)

# **EXPERIMENTACIÓN**

## 5. EXPERIMENTACIÓN

### 5.1 Equipo

- PACE MDQ sistema de electroforesis capilar BeckmanCoulter, (Fullerton, CA, USA) con detector de arreglo de diodos y UV visible, utilizando como sistema de adquisición de datos el software 32 KARAT 5.0 o PACE System MDQ, Instrument
- Capilar de sílice fundida de 75µm de diámetro interno, 60 cm de longitud total (LT), 52.5cm de longitud efectiva (LE).
- Balanza Analítica BoecoGermany.
- Agitador magnético ThermolyneCimarec® 2
- Ultrasonido Transsonic 570
- Sistema purificador de agua Millipore
- PotenciómetroHanna Instruments

### 5.2 Material

- Vasos de precipitados 50, 100 y 250 mL.
- 4 matraces volumétricos de 10 mL.
- 1 Pipeta volumétrica 25 mL
- 2 pipetas volumétricas de 0.5 mL.

### 5.3 REACTIVOS

- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (J.T. Baker)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$  (J.T. Baker)
- HClconcentrado (J.T. Baker)
- NaOH hojuelas (J.T. Baker)
- TTAB (bromuro de tetradeciltrimetilamonio) (Sigma-Aldrich)
- CTAB (Bromuro de cetiltrimetilamonio) (Sigma-Aldrich)
- Resina de intercambio aniónico (cloruros)Dowex® 1x2,  $\text{Cl}^-$  (Sigma- Aldrich).
- Ácido clorhídrico (JT Baker)

### Estándares

Todos los estándares acético, benzoico, cítrico, fumárico, glutárico, láctico, málico, oxálico, pirúvico, succínico, tartárico respectivamente son de grado analítico y son obtenidos de la marca Sigma-Aldrich exceptuando al ácido cítrico monohidratado, el cual es distribuido por Baker Analyzed.

## Muestras

Las muestras a analizar (Tabla 5) son de la cervecera Grupo Modelo de la variedad de productos se eligen únicamente siete, (Negra modelo vidrio, Victoria Tradicional vidrio, Modelo Especial vidrio, Modelo Especial lata, Corona Extra barril, Corona Extra vidrio, Corona Extra lata) siendo estos los de mayor consumo en nuestro país.

**Tabla. 5. Presentación de las muestras analizadas.**

<b>CERVEZA</b>	<b>PRESENTACIÓN</b>	<b>VOL(mL)</b>	<b>MUESTRA</b>
<b>NEGRA MODELO</b>	BOTELLA DE VIDRIO	<b>325</b>	
<b>VICTORIA TRADICIONAL</b>	BOTELLA DE VIDRIO	<b>355</b>	
<b>MODELO ESPECIAL</b>	BOTELLA DE VIDRIO	<b>325</b>	
<b>MODELO ESPECIAL</b>	LATA DE ALUMINIO	<b>355</b>	
<b>CORONA EXTRA</b>	BOTELLA DE VIDRIO BARRIL	<b>325</b>	
<b>CORONA EXTRA</b>	BOTELLA DE VIDRIO	<b>355</b>	
<b>CORONA EXTRA LIGHT</b>	LATA DE ALUMINIO	<b>355</b>	
<b>O'DOUL'S</b>	LATA DE ALUMINIO	<b>355</b>	
<b>XX LAGER</b>	BOTELLA DE VIDRIO	<b>325</b>	
<b>CORONA FAMILIAR</b>	BOTELLA DE VIDRIO	<b>1200</b>	

#### 5.4 Preparación de soluciones

*Búfer de fosfatos 7.5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> • H<sub>2</sub>O y 2.5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> • 12 H<sub>2</sub>O 0.5 mM TTAB pH 6.40, 50 mL.*

Pesar 0.0517 g de fosfato de sodio monobásico y 0.0417 g de fosfato de sodio decahidratado, mezclar y disolver en agua desionizada, si es necesario ajustar con unas gotas de NaOH 0.1 N a pH 6.40, adicionar esta mezcla a 0.0084 g de TTAB, agitar hasta completa homogenización y posteriormente llevar a volumen de aforo. La preparación es diaria.

##### *Estándares*

Los estándares de los ácidos oxálico, tartárico, málico, succínico, pirúvico, y acético, se prepararon por disolución en agua desionizada (10g/l) y se almacenaron en refrigeración durante un mes exceptuando el ácido fumárico y ácido benzoico los cuales se disolvieron en etanol manteniéndose a temperatura ambiente durante 15 días.

##### *Preparación de la mezcla de estándares*

Se analizaron de manera individual los estándares de los ácidos orgánicos oxálico, fumárico, tartárico, málico, succínico, pirúvico, acético y benzoico, con las condiciones de trabajo anteriormente descritas, a concentraciones iniciales de 50 ppm.

## 5.5 Plan de trabajo

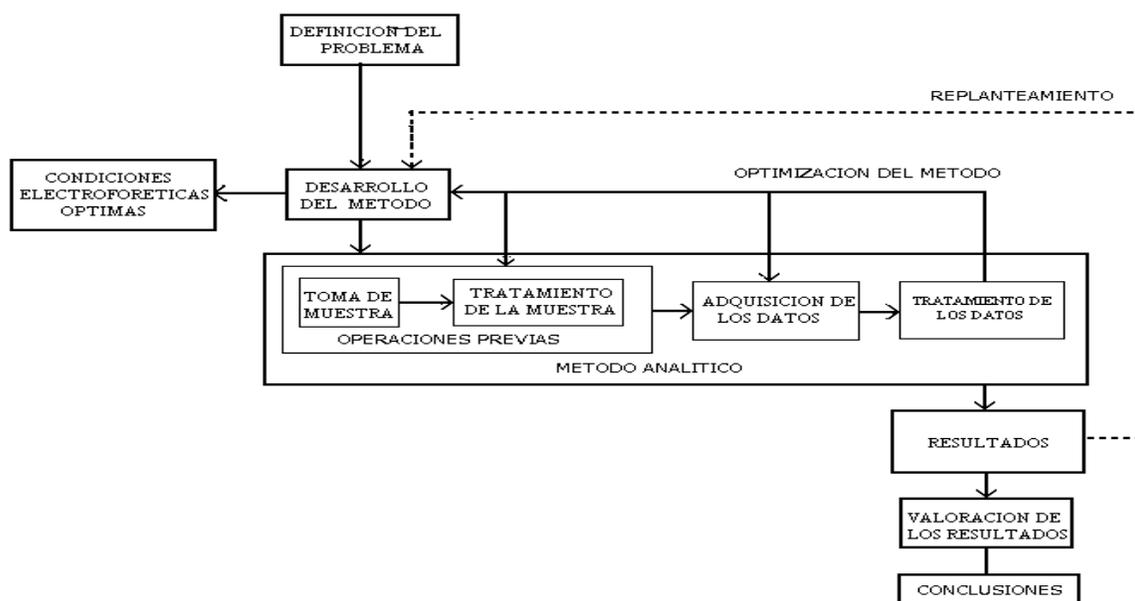


Figura 6. Diagrama de flujo de las actividades a desarrollar.

## 5.6 Desarrollo del método electroforético

### Etapas del desarrollo del método

ETAPA I.- Establecer las condiciones electroforéticas óptimas para la separación y cuantificación de los ácidos orgánicos mediante EC.

ETAPA II.- Establecer el tratamiento de la muestra más adecuado para la eliminación de interferencias.

ETAPA III.- Aplicar el método el método analítico para la identificación y cuantificación de los ácidos orgánicos en muestras comerciales de cerveza.

### 5.7 Tratamiento de la muestra.

Una vez establecidas las condiciones óptimas para la separación electroforética se evaluó el tratamiento de la muestra.

Debido a la complejidad de la matriz se propone llevar a cabo diferentes tratamientos con el fin de eliminar la cantidad máxima de interferencias.

# **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Optimización del método

Tomando como base la metodología de Mató Inés y cols. [11] quienes, proponen que, para determinar ácidos orgánicos (oxálico, fórmico, tartárico, málico, succínico, maleico, glutárico, pirúvico, acético, láctico, cítrico, butírico, benzoico, sórbico, ascórbico, y glucónico) en bebidas, reporta tiempos de análisis menores a los 4 min., empleando un buffer de fosfatos (7.5 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  + 2.5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) a un pH 6.40 y 2.5 mM TTAOH y 0.24 mM  $\text{CaCl}_2$  como modificador selectivo para el caso de ácido cítrico, ocupando un capilar de longitud total de 60 cm con una longitud efectiva de 52.5 cm y una longitud de onda de 185 nm y utilizando polaridad inversa a -25 kV.

En este trabajo se identificaron y cuantificaron los ácidos oxálico, fumárico, málico, tartárico, succínico, pirúvico, acético y benzoico en mezcla, para cervezas, sustituyendo el modificador de flujo hidróxido de tetradeciltrimetilamonio (TTAOH) por bromuro de tetradeciltrimetilamonio (TTAB), (14) el cual es un reactivo de uso común y omitiendo el uso  $\text{CaCl}_2$  debido a que para este estudio no se incluyó al ácido cítrico.

**Tabla 6.- Condiciones electroforéticas de trabajo**

	CONDICIONES DE TRABAJO INICIALES	CONDICIONES DE TRABAJO FINALES
<b>CAPILAR</b>	75 $\mu\text{m}$ de diámetro interno, 60 cm de longitud total, 52.5cm de longitud efectiva.	75 $\mu\text{m}$ de diámetro interno, 77 cm de longitud total, 66.5 cm de longitud efectiva
<b>BÚFER</b>	7.5 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ Y 2.5 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2.5 mM TTAB y pH 6.40	7.5 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ Y 2.5 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.5 mM TTAB y pH 6.40
<b>INYECCIÓN</b>	1.5 psi 10 s	1.0 psi 10 s
<b>VOLTAJE</b>	-25 Kv	-25 Kv
<b>TEMPERATURA</b>	25° C	20° C
<b>DETECCIÓN</b>	191 nm	205 nm

La tabla 6 muestra como se llego a las condiciones de trabajo realizando ligeros cambios, entre los más notorios la utilización de un capilar de mayor longitud.

Buffer de fosfatos  
pH = 6.4

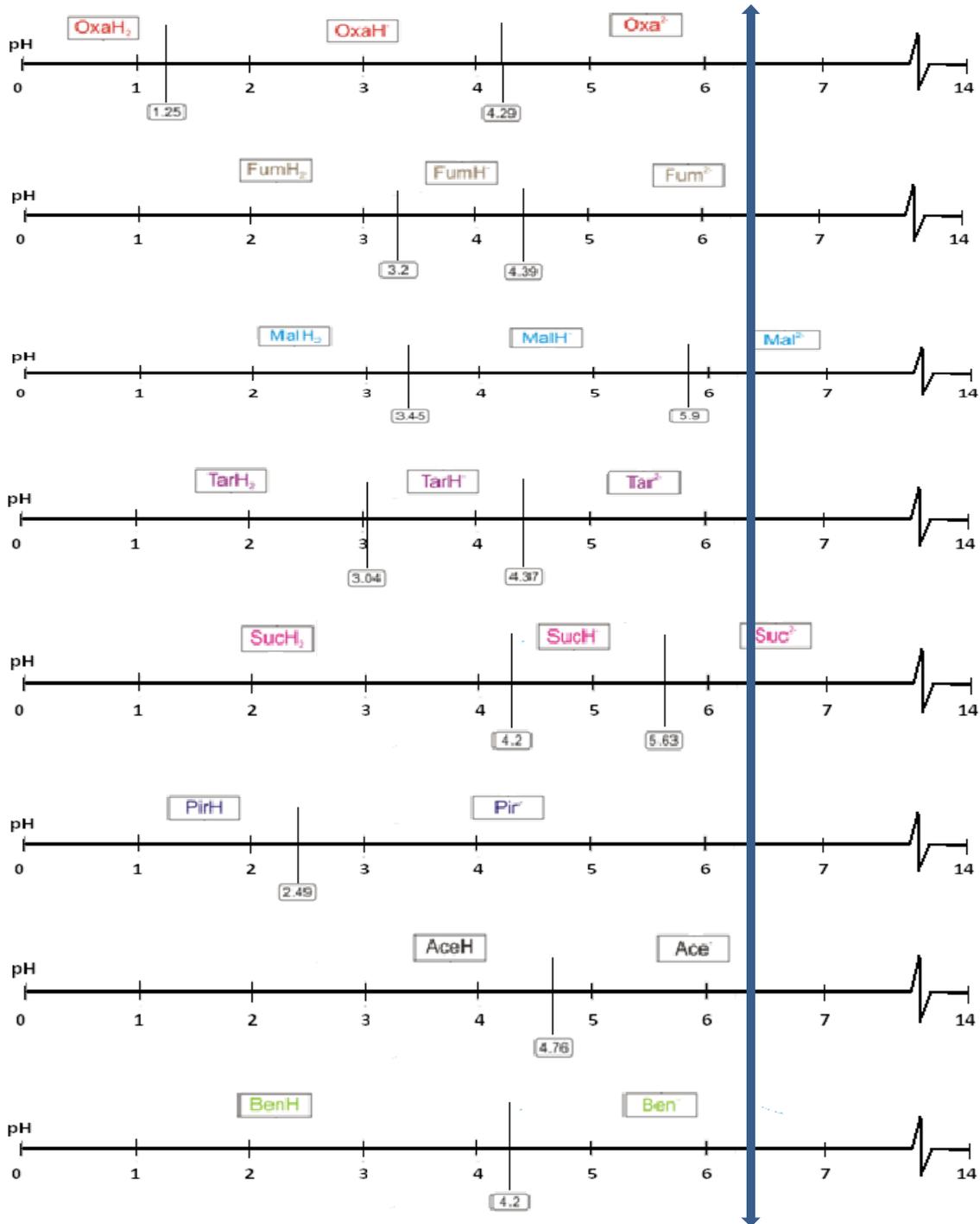


Figura 7. Escalas de pKa para ácidos orgánicos en cervezas mexicanas y el valor de buffer de fosfatos pH = 6.4

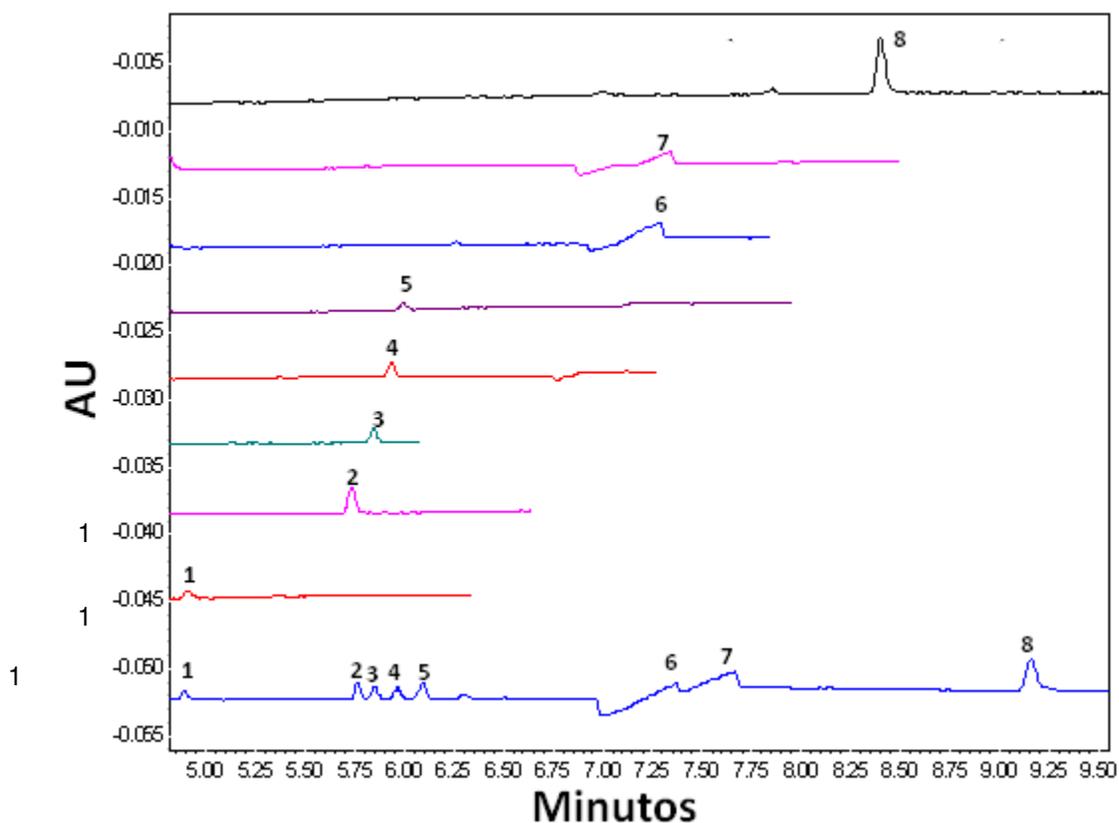
En la figura 7 se aprecian las condiciones de pH impuestas por el buffer de fosfatos el cual fue de 6.4 y las especies presentes en solución de cada ácido orgánico analizado a este valor de pH.

## 6.2 Mezcla de estándares

Con el fin de observar señales definidas y con resoluciones mayores o iguales a 1.5, se obtienen las siguientes concentraciones cada estándar tabla 6.

**Tabla 7. Concentración de los ácidos orgánicos (ppm) en la mezcla de estándares**

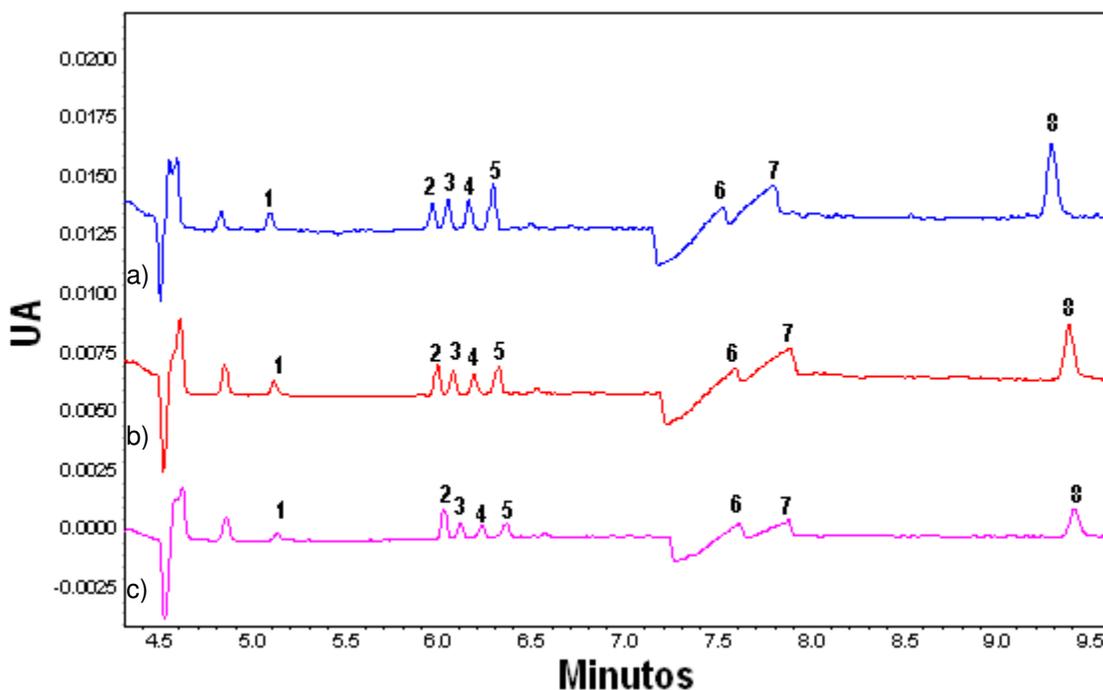
	ÁCIDO ORGÁNICO	CONC (ppm)
1	Oxálico	1
2	Fumárico	0.5
3	Málico	10
4	Tartárico	10
5	Succínico	5
6	Pirúvico	5
7	Acético	10
8	Benzoico	0.5



**Figura 8. Electroferogramas de los ácidos orgánicos contenidos en la Tabla 7 por separado y en mezcla**

### 6.3 Longitud de onda

El equipo utilizado para este estudio, consta de un detector de arreglo de diodos, que permite llevar a cabo un análisis a diferentes longitudes de onda, (191 a 309 nm). Para elegir la mejor longitud de onda se realizó un barrido de la mezcla de estándares y se observó que a 205 nm se obtiene una línea base satisfactoria esto debido a que los componentes del buffer no absorben significativamente, además de llevar el análisis a tres longitudes de onda 200 nm, 205 nm y 210 nm. Puede observarse que en el máximo de absorción (200nm) la respuesta analítica es más alta, pero la línea base no es adecuada debido al ruido que presenta, a 210 nm se observa que tanto la línea base como la respuesta analítica ya no son confiables debido al ruido y al decremento de la absorbancia para cada señal por eso se considera como óptima la longitud de onda de 205 nm.



**Figura 9. Mezcla de estándares utilizando capilar longitud total de 60 cm, búfer de fosfatos pH= 6.4, 0.5 mM de TTAB, -25 kV, 20°C, a) 200 nm, b) 205nm, c) 210nm**  
**Identificación de picos: (1) oxálico, (2) fumárico, (3) tartárico, (4) málico, (5) succínico, (6) pirúvico, (7) acético, (8) benzoico**

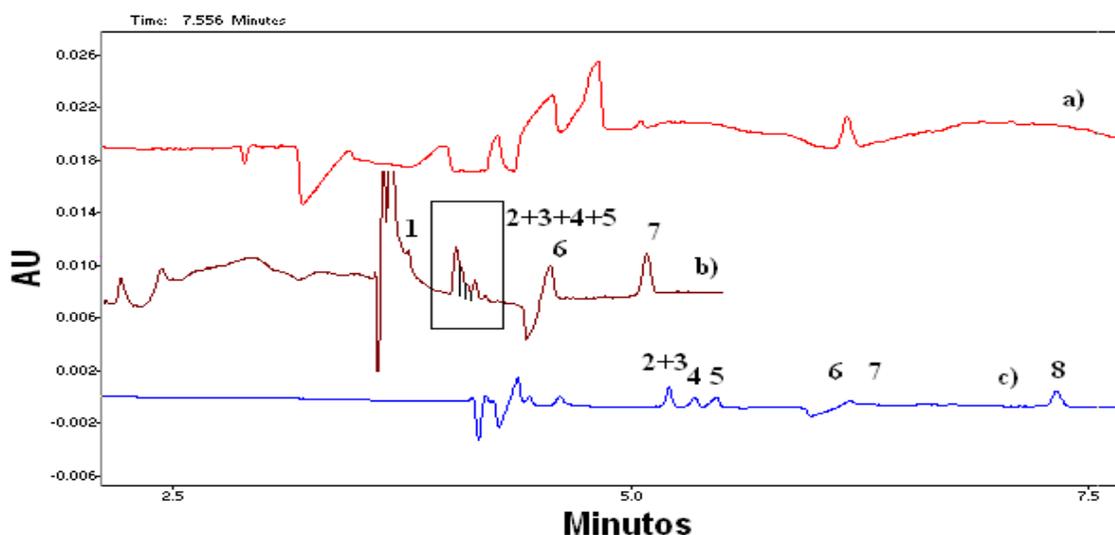
## 6.4 Electrolito soporte

El electrolito de fosfatos presenta una movilidad similar a la de los ácidos orgánicos además de que la adición del TTAB, favorece la dirección del flujo electroosmótico en la determinación de los aniones(11).

Se utilizó el buffer descrito en la tabla 6, sin embargo no dió buenos resultados sino hasta que se disminuyó la concentración del modificador del flujo a 0.5 mM del TTAB basándose en la concentración micelar crítica de este surfactante.

Una vez cambiada la concentración del modificador se obtuvo que los mejores resultados para la determinación de los analitos en estudio, fue utilizado un buffer a partir de una mezcla de fosfatos (7.5 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  + 2.5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) y 0.5 mM TTAB a un pH constante de 6.4.

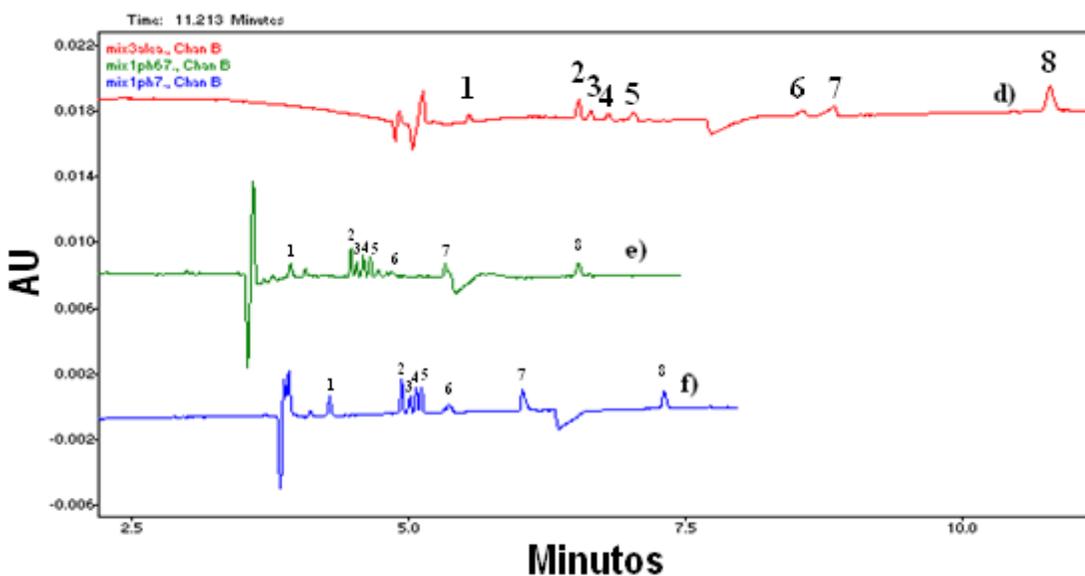
A pesar de que se observan las señales en un tiempo de análisis menor a los 6 minutos, la separación de los analitos en mezcla no es adecuada y se puede observar en la figura 1, inciso b, por lo cual se decide cambiar el pH del electrolito soporte y probar la separación a pH de 5.0 y 7.0 (Fig.1, inciso a y c respectivamente). También se intentó variar la concentración de TTAB sin resultados positivos.



**Figura 10.** Mezcla de estándares utilizando capilar longitud total de 60 cm, búfer de fosfatos con 0.5 mM de TTAB, -25 kV, 25° C, 200 nm. a) pH = 5.0, b) pH = 6.40, c) pH = 7.0  
*Identificación de picos: (1) oxálico, (2) fumárico, (3) tartárico, (4) málico, (5) succínico, (6) pirúvico, (7) acético, (8) benzoico.*

## 6.5 Longitud del capilar

Debido a que el primer capilar de sílice fundida que se utilizó en el desarrollo de este trabajo de las siguientes características: 65 cm LT y 56 cm LE y 75  $\mu\text{m}$  de diámetro interno de, no permitió una adecuada separación como se observa en la figura 1, se cambio por uno de mayor longitud 77cm longitud total(LT), 66.5 cm longitud efectiva (LE), 75  $\mu\text{m}$ d.i. demanteniendo las condiciones anteriormente descritas observándose una separación más adecuada, fig.2 (d)



**Figura 11. Mezcla de estándares. Capilar de longitud total de 77 cm. d) pH= 6.40, e) pH= 6.70, f) pH = 7.0. Identificación de picos: (1) oxálico, (2) fumárico, (3) tartárico, (4) málico, (5) succínico, (6) pirúvico, (7) acético, (8) benzoico.**

Se estudio también la influencia del pH cambiando los valores ligeramente a 6.7 y 7 para encontrar la mejor separación en base al parámetro de resolución (Tabla 8). Se seleccionó trabajar a pH de 6.4 debido a que los valores de resolución son en general iguales o mayores a 1.5 y los picos presentan un área mayor.

**Tabla 8. Tabla comparativa de Rs en función del pH de trabajo.**

Par de picos evaluados	RESOLUCIÓN			
	6.4*	6.4 <sup>#</sup>	6.7 <sup>#</sup>	7.0 <sup>#</sup>
1 – 2	6,10	11,95	5,93	9,36
2 – 3	0,79	1,45	1,93	1,13
3 – 4	1,01	2,06	1,07	1,04
4 – 5	0,87	2,44	1,04	0,82
5 – 6	4,76	9,88	2,78	3,94
6 – 7	3,70	1,46	5,83	5,39
7 – 8	-	6,57	11,36	8,53

\*capilar longitud total de 60 cm, longitud efectiva de 52.5cm

# capilar longitud total de 77 cm, longitud efectiva de 66.5cm

El tiempo de análisis aumento a 5 minutos más de lo ya reportado, donde se considera el incremento de la longitud del capilar así como el modificador de flujo (TTAB) empleado.

### 6.6 Lavado entre corridas

Se observó que durante el desarrollo de este método, los tiempos de migración no eran reproducibles ya que el tiempo de retención para cada analito disminuía a demás de que la resolución entre cada una de las señales se veía afectada, por lo cual se realizaron una serie de lavados al capilar variando el tiempo, la presión y la temperatura con el fin de encontrar una estabilidad en cuanto a las áreas y tiempos de migración para cada ácido orgánico.

**Tabla 9. Coeficientes de variación (C.V.) en función del área de pico en las diferentes condiciones de lavado**

Ac. Orgánico	% C.V. Áreas			
	30psi 1 min 25 °C	20 psi 3 min 25 °C	25psi 5 min 25 °C	20 psi 5 min 20 °C
Oxálico	27,99	11,10	1,62	1,04
Fumárico	5,69	3,16	1,53	1,23
Tartárico	5,09	7,66	9,55	1,21
Málico	3,98	3,82	3,56	2,08
Succínico	7,22	12,94	23,84	0,44
Pirúvico	54,74	9,08	4,62	0,39
Acético	20,59	8,08	0,21	0,60
Benzoico	11,45	3,78	141,13	1,50

**Tabla 10. % Coeficientes de variación en función de los tiempos migración de las diferentes condiciones de lavado**

Ac. Orgánico	C.V.% Tiempos			
	30psi 1 min 25 °C	20 psi 3 min 25 °C	25psi 5 min 25 °C	20 psi 5 min 20 °C
Oxálico	10,15	0,82	0,05	1,23
Fumárico	10,80	0,93	0,05	1,34
Tartárico	10,92	0,97	0,09	1,37
Málico	11,12	1,00	0,09	1,39
Succínico	11,21	1,02	0,10	1,42
Pirúvico	12,69	0,93	0,11	1,44
Acético	12,84	0,90	0,12	1,37
Benzoico	13,95	1,01	0,16	1,71

En la tabla 10 se observa que el C.V. para 20 psi por 5 min a 20°C es menor que para cualquiera de las condiciones trabajadas, por el contrario para los tiempos la menor variación se encuentra a 25 psi durante 5 min a 25°C.

Debido a que las áreas hacen referencia a la concentración de cada analito se considera como el mejor lavado entre corridas el que se realizó a 20psi 5min a 20°C, además de que el C.V. para los tiempos bajo estas condiciones no sobrepasa el 2% de variación.(garduño)

Las inyecciones se realizaron por cuadruplicado observando que los tiempos de migración no presentaron variación, así como tampoco las áreas, esto de acuerdo al cálculo del C.V. se tiene que el lavado óptimo para el capilar entre corridas es de 20 psi durante 5 min. a una temperatura de 20 ° C ( Ver tablas 9 y 10 respectivamente)

### 6.7 Temperatura

En los primeros análisis se trabajó con una temperatura de 25 °C, sin embargo surgieron inconvenientes para mantener estables los tiempos de retención de los analitos, la longitud del capilar tuvo mucho que ver, siendo este 12 cm más largo que el propuesto por Mató (11), el calor que se genera dentro de este influye directamente en la viscosidad del buffer haciendo que los picos de los analitos salgan antes provocando una unión entre si viéndose afectada el área y por ende la resolución entre estos, de esta manera se eligió la temperatura a 20 °C tanto en los

lavados de capilar así como en cada uno de los análisis los resultados de acuerdo al C.V. también se observan en la figura 7 inciso b).

## **6.8. TRATAMIENTO DE LA MUESTRA**

Antes de introducir la muestra al equipo, fue necesario llevar a cabo un tratamiento adecuado con el fin de medir la señal para cada analito, eliminando la mayor parte de las interferencias.

Se estudiaron cuatro tratamientos para la cerveza y se describen a continuación:

### **Tratamiento 1**

Tomar una alícuota de 25 mL

Desgasificación manual durante 10 min.

Sonicación durante 20 min

Decoloración con 1g de carbón activado agitándose durante 1 min hasta completa homogenización seguida de una filtración por gravedad utilizando papel Whatman No. 40 de 125 mm de diámetro

Neutralizar con NaOH 0.1 N a pH = 7.8 utilizando potenciómetro.

Colocar en una columna cromatográfica de vidrio de 10 cm de longitud y 1 cm de diámetro 5g de resina aniónica Dowex SB2C previamente tratada bajo la 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 en un vaso de precipitados de 50 mL bajo la columna.

Filtrar lentamente por esta columna 2 mL de la muestra ya sonicada decolorada y neutralizada.

Agregar 25 mL de agua desionizada.

Separar el eluyente.

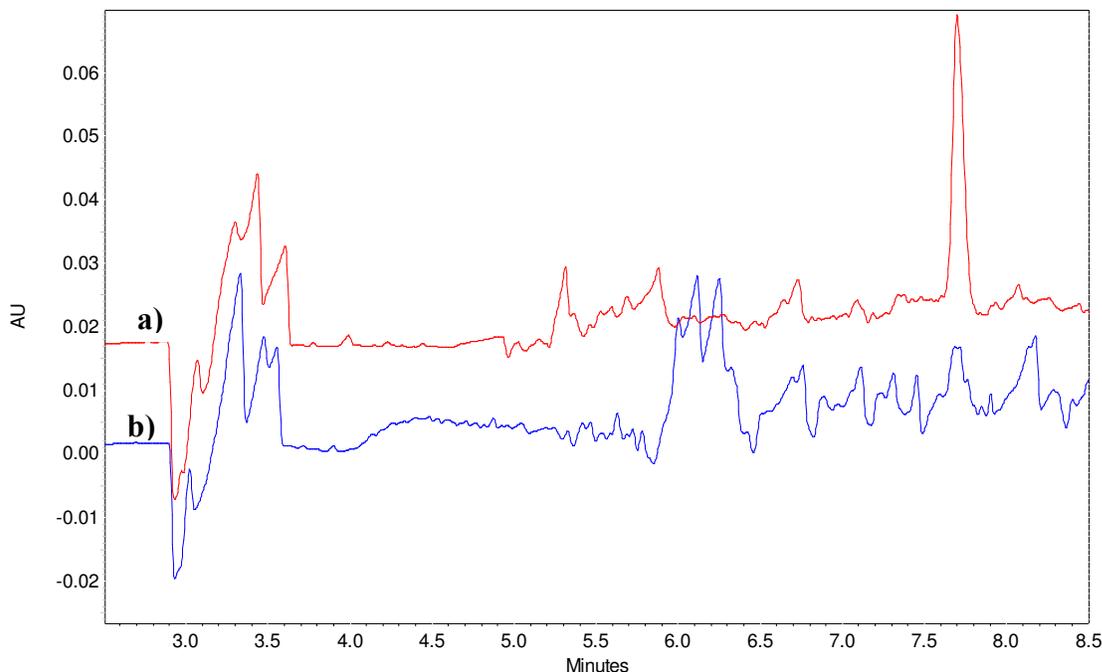
Colocar un matraz aforado de 50 mL bajo la columna.

Adicionar a la columna 25 mL de HCl 0.1 N.

Lavar con agua desionizada hasta recuperar un volumen de aforo de 50 mL.

Filtrar con un ayuda de un Acrodisco de 0.45  $\mu$ m.

Colocar en un vial y realizar la corrida en equipo de electroforesis capilar.



**Figura12.Evaluación del Tratamiento 1 de la muestra: a) directa; b) con dilución 1:5**

Los resultados para este tratamiento no muestran resultados satisfactorios debido a que al analizarlo en el equipo muestra señales sin definición aun con dilución 1:5, a demás de que el tiempo que se invierte para llevar a cabo este intercambio aniónico es de aproximadamente 2 horas y media.

## **Tratamiento 2**

Tomar una alícuota de 25 mL

Desgasificación manual durante 10 min.

Sonicación durante 20 min

Decoloración con 1 g de carbón activado agitándose durante 1 min hasta completa homogenización seguida de una filtración por gravedad utilizando papel WhatmanNo. 40 de 125 mm de diámetro

Ajustar con NaOH 0.1 N a pH = 4.56 utilizando potenciómetro.

Filtrar con ayuda de un Acrodisco de 0.45  $\mu\text{m}$ .

Colocar en un vial y realizar la corrida en equipo de electroforesis capilar.

Se observan señales indefinidas por lo cual se realiza una dilución de 1/10

### Tratamiento 3 (sin decoloración)

Tomar una alícuota de 25 mL

Desgasificación manual durante 10 min.

Sonicación durante 20 min

Ajustar con NaOH 0.1 N a pH = 4.56 utilizando potenciómetro.

Filtrar con un ayuda de un Acrodisco de 0.45  $\mu\text{m}$  de poro.

Colocar en un vial y realizar la corrida en equipo de electroforesis capilar.

Se observan señales indefinidas por lo cual se realiza una dilución de 1:10

### Tratamiento 4

Tomar una alícuota de 25 mL

Desgasificación manual durante 10 min.

Sonicación durante 20 min

Filtrar con un ayuda de un Acrodisco de 0.45  $\mu\text{m}$  de poro.

Realizar una dilución de 1:5

Colocar en un vial y realizar la corrida en equipo de electroforesis capilar.

Entre los últimos dos tratamientos se llevó a cabo una comparación para saber si el ajuste de pH interfiere en el análisis y como se observa en la figura 11 las señales son más definidas omitiendo dicho ajuste con NaOH.

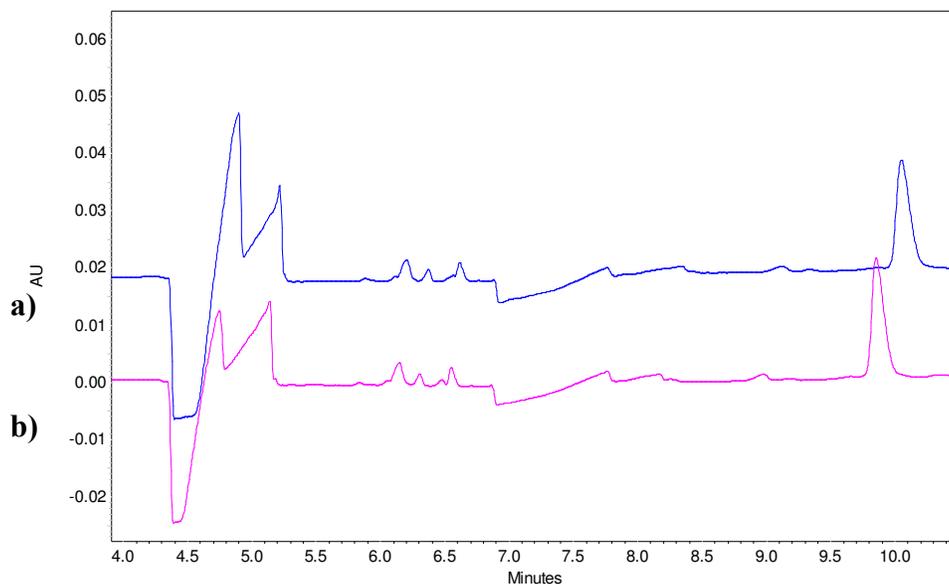
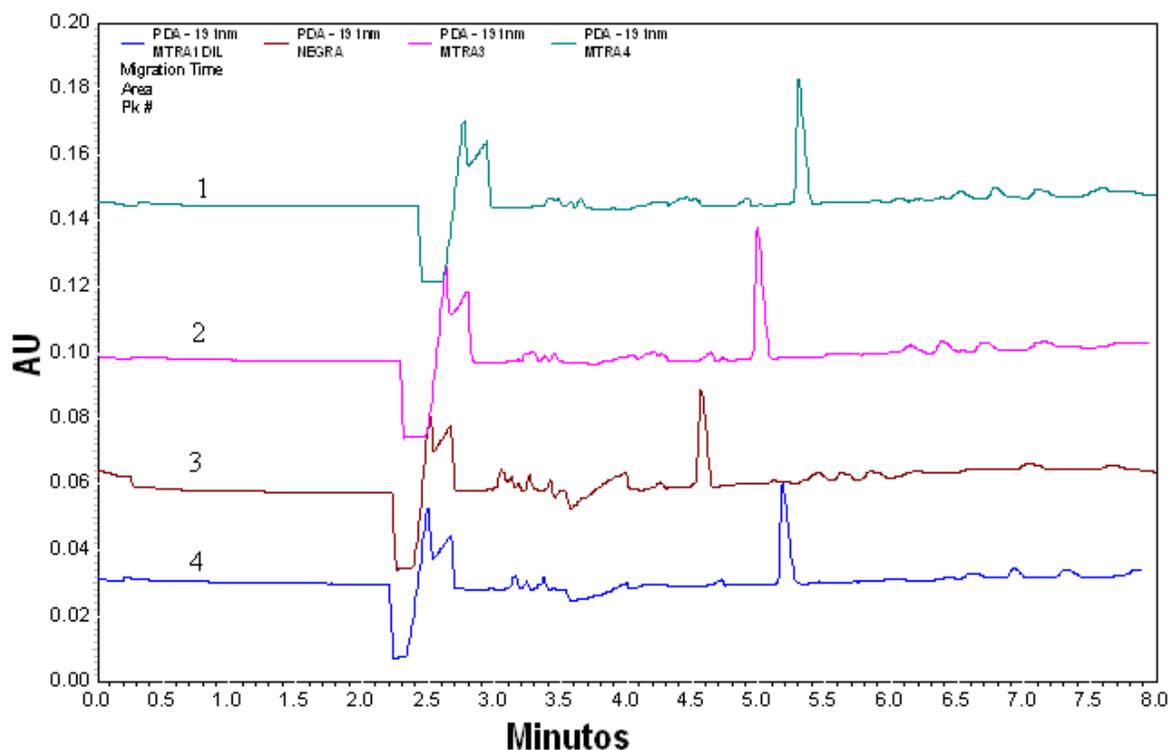


Figura 13. Evaluación de a) Tratamiento 3 y b) tratamiento 4

De los cuatro tratamientos estudiados, el tratamiento 4 fue el que generó mejores resultados, y fue el que se empleó para la identificación de los analitos en todas las muestras.

### 6.9 Identificación de ácidos orgánicos mediante EC

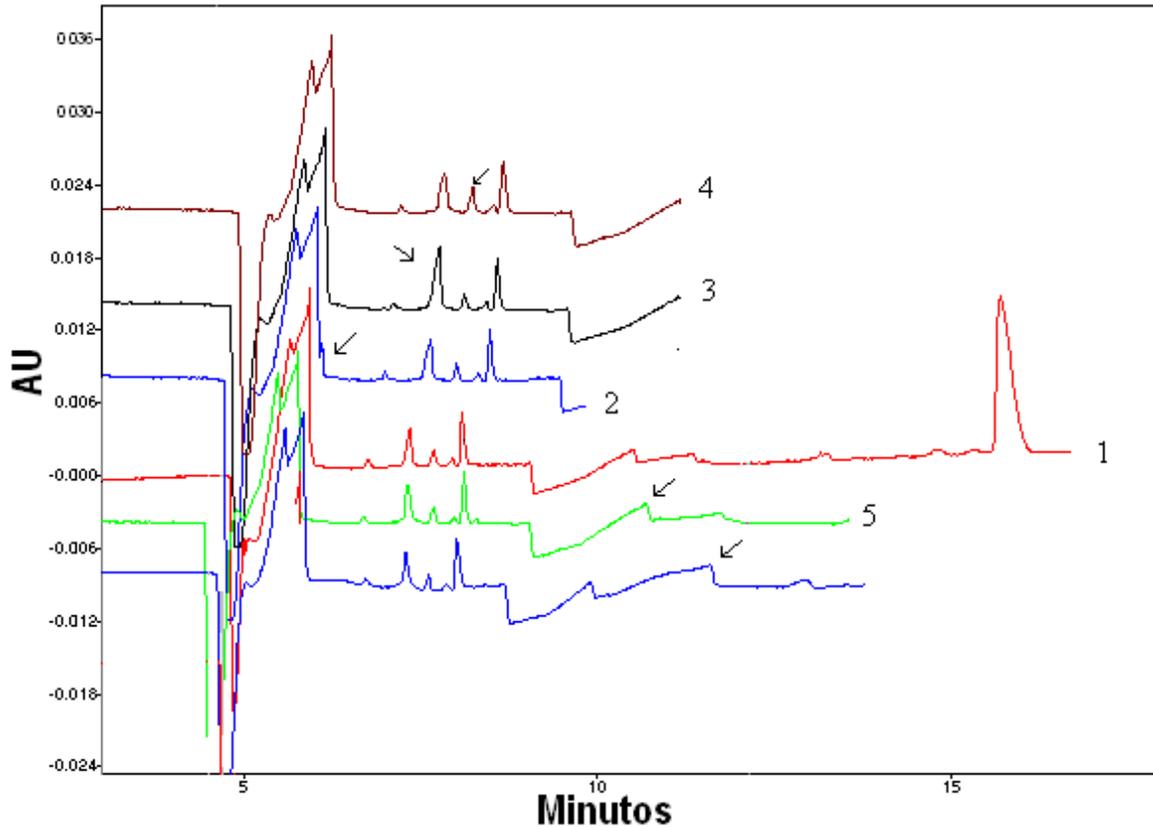
Se llevó a cabo la identificación de los ácidos orgánicos en una muestra comercial de cerveza Negra Modelo, debido a que esta es la de mayor interés ya que esta presentaba más señales (posibles ácidos orgánicos) a comparación de otro tipo de cervezas de la misma cervecera (Fig. 12).



**Figura14. Muestras de cerveza del grupo modelo.**

**(1) Modelo Lata, (2) Corona extra clara, (3) Negra Modelo y (4) Corona Extra. Todas con una dilución 1:10.**

A fin de identificar con certeza la presencia de cada ácido orgánico, se procedió a la fortificación simple de la muestra adicionando una concentración conocida de cada analito previo al tratamiento realizado a la muestra Negra Modelo, obteniendo los siguientes electroferogramas (Figura 15).



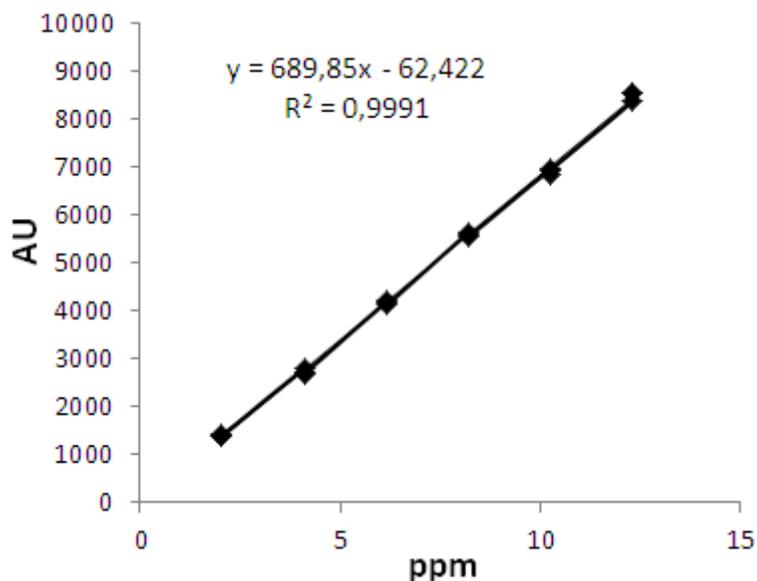
**Figura 15. Identificación de ácidos orgánicos en una muestra de cerveza Negra modelo, dilución 1:10. (1) Muestra de cerveza sin fortificación, (2) adición de ácido oxálico 6 ppm, (3) adición de ácido fumárico 3ppm, (4) adición de ácido málico 30 ppm, (5) adición de ácido pirúvico 30 ppm, (6) adición de ácido acético 72 ppm**

Una vez identificados los ácidos orgánicos en las diferentes muestras, se procederá a la cuantificación de los mismos mediante una curva de calibración, bajo las mismas condiciones de análisis.

### 6.10.- Cuantificación de ácidos orgánicos mediante EC

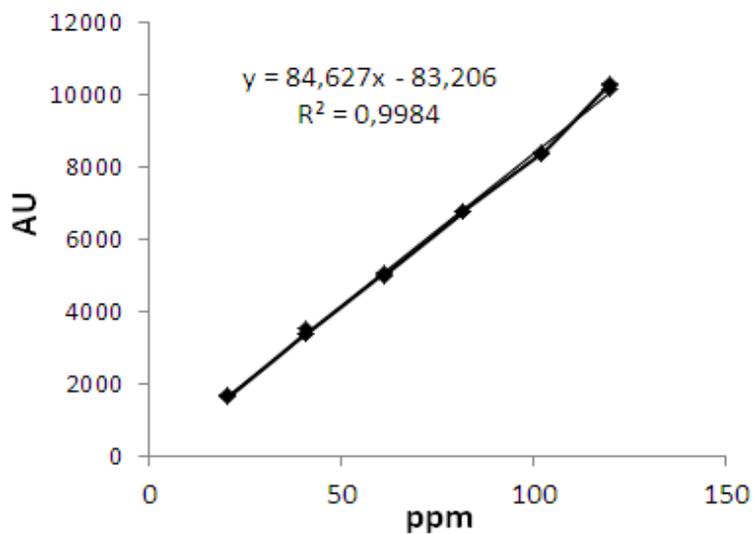
Se realizaron las curvas de calibración mediante mezclas de los estándares, variando la concentración de los sistemas de acuerdo a las referencias, obteniendo los resultados siguientes.

<b>Tabla 11. Datos de la curva de calibración de, ácido oxálico</b>			
	<b>Área</b>	<b>[ppm]</b>	<b>A/ [ppm]</b>
<b>S1</b>	1375	2,05	670,732
	1402	2,05	683,902
	1399	2,05	682,439
<b>S2</b>	2796	4,1	681,951
	2731	4,1	666,098
	2691	4,1	656,341
<b>S3</b>	4195	6,15	682,114
	4220	6,15	686,179
	4117	6,15	669,431
<b>S4</b>	5642	8,2	688,049
	5597	8,2	682,561
	5551	8,2	676,951
<b>S5</b>	6960	10,25	679,024
	6853	10,25	668,585
	6941	10,25	677,171
<b>S6</b>	8389	12,3	682,033
	8564	12,3	696,260
	8548	12,3	694,959
	<b>PROM</b>		<b>679,1545</b>
	<b>DS</b>		<b>10,0515</b>
	<b>CV</b>		<b>1,48%</b>



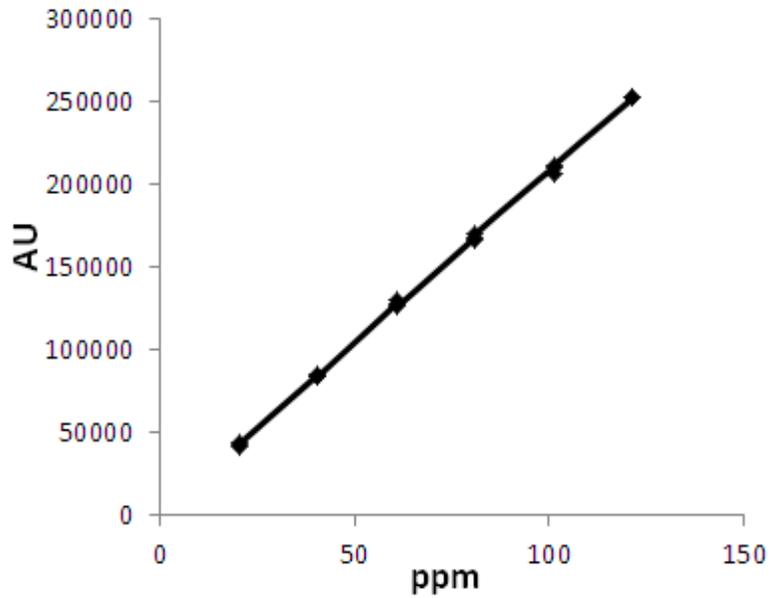
**Figura 16. Curva de calibración para ácido oxálico en buffer de fosfatos pH=6.4**

<b>Tabla 12. Datos de la curva de calibración de ácido málico</b>			
	<b>Área</b>	<b>[ppm]</b>	<b>A/ [ppm]</b>
<b>S1</b>	1677	20,4	82,206
	1703	20,4	83,480
	1632	20,4	80,000
<b>S2</b>	3412	40,8	83,627
	3529	40,8	86,495
	3390	40,8	83,088
<b>S3</b>	5082	61,23	82,999
	5004	61,23	81,725
	5016	61,23	81,921
<b>S4</b>	6751	81,6	82,733
	6789	81,6	83,199
	6783	81,6	83,125
<b>S5</b>	8390	102,06	82,207
	8423	102,06	82,530
	8351	102,06	81,824
<b>S6</b>	10325	120	84,355
	10257	120	83,799
	10164	120	83,039
	<b>PROM</b>		<b>82,9084</b>
	<b>DS</b>		<b>1,3274</b>
	<b>CV</b>		<b>1,60%</b>



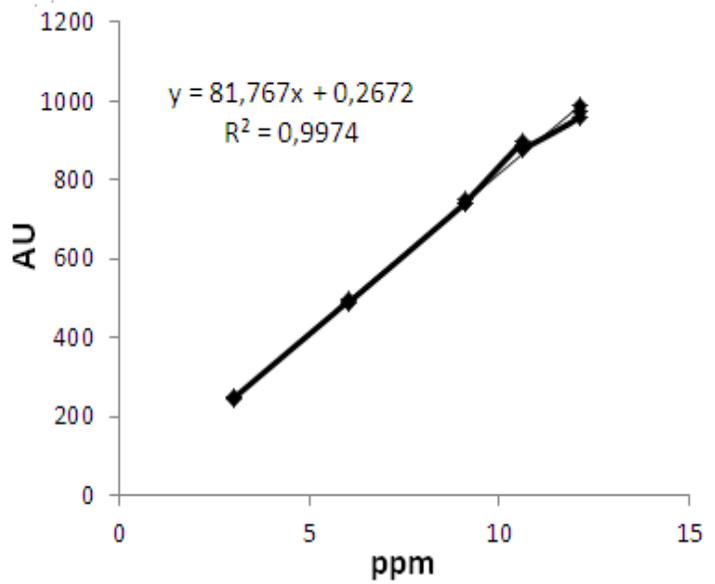
**Figura 17. Curva de calibración para ácido málico en buffer de fosfatos pH = 6.4.**

<b>Tabla 13. Datos de la curva de calibración de ácido fumárico</b>			
	<b>Área</b>	<b>[ppm]</b>	<b>A/[ppm]</b>
<b>S1</b>	252885	121,29	2084,962
	253124	121,29	2086,932
	252448	121,29	2081,359
<b>S2</b>	211748	101,08	2094,856
	207268	101,08	2050,534
	210833	101,08	2085,803
<b>S3</b>	170265	80,86	2105,676
	167258	80,86	2068,489
	168248	80,86	2080,732
<b>S4</b>	126125	60,64	2079,898
	130589	60,64	2153,513
	128345	60,64	2116,507
<b>S5</b>	84044	40,43	2078,753
	83995	40,43	2077,541
	85106	40,43	2105,021
<b>S6</b>	43265	20,21	2140,772
	44325	20,21	2193,221
	42142	20,21	2085,205
	<b>PROM</b>		<b>2098,3208</b>
	<b>DS</b>		<b>34,1774</b>
	<b>CV</b>		<b>1,63%</b>



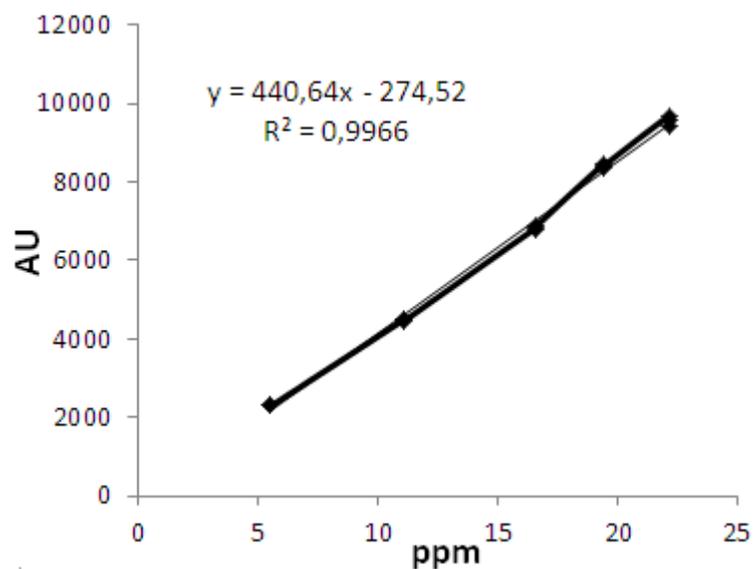
**Figura 18. Curva de calibración de ácido fumárico en buffer de fosfatos pH=6.4**

<b>Tabla 14. Datos de la curva de calibración de ácido tartárico</b>			
	<b>Área</b>	<b>[ppm]</b>	<b>A/[ppm]</b>
S1	245	3,03	80,858
	248	3,03	81,848
	248	3,03	81,848
S2	495	6,06	81,683
	489	6,06	80,693
	491	6,06	81,023
S3	741	9,09	81,518
	750	9,09	82,508
	742	9,09	81,628
S4	897	10,605	84,583
	889	10,605	83,828
	879	10,605	82,885
S5	961	12,12	79,290
	988	12,12	81,518
	975	12,12	80,446
	<b>PROM</b>		<b>81.7439</b>
	<b>DS</b>		<b>1.3241</b>
	<b>CV</b>		<b>1.62%</b>



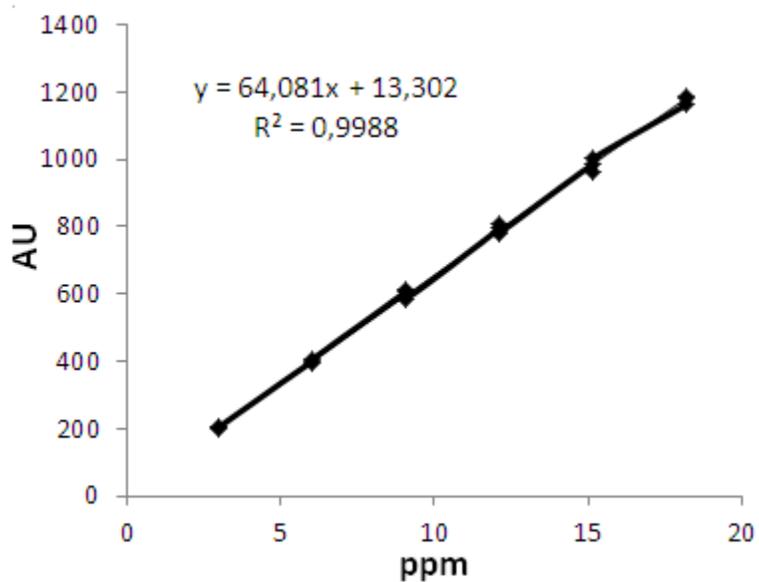
**Figura 19. Curva de calibración para ácido tartárico en buffer de fosfatos pH=6.4**

<b>Tabla 15. Datos de la curva de calibración de ácido pirúvico</b>			
	<b>Área</b>	<b>[ppm]</b>	<b>A/[ppm]</b>
S1	2305	5,5394	416,110
	2298	5,5394	414,846
	2291	5,5394	413,583
S2	4489	11,0787	405,192
	4510	11,0787	407,087
	4453	11,0787	401,942
S3	6838	16,6181	411,479
	6788	16,6181	408,470
	6877	16,6181	413,826
S4	8441	19,3878	435,377
	8365	19,3878	431,457
	8392	19,3878	432,850
S5	9693	22,1575	437,459
	9594	22,1575	432,991
	9404	22,1575	424,416
	<b>PROM</b>		<b>419.1391</b>
	<b>DS</b>		<b>12.1108</b>
	<b>CV</b>		<b>2.88%</b>



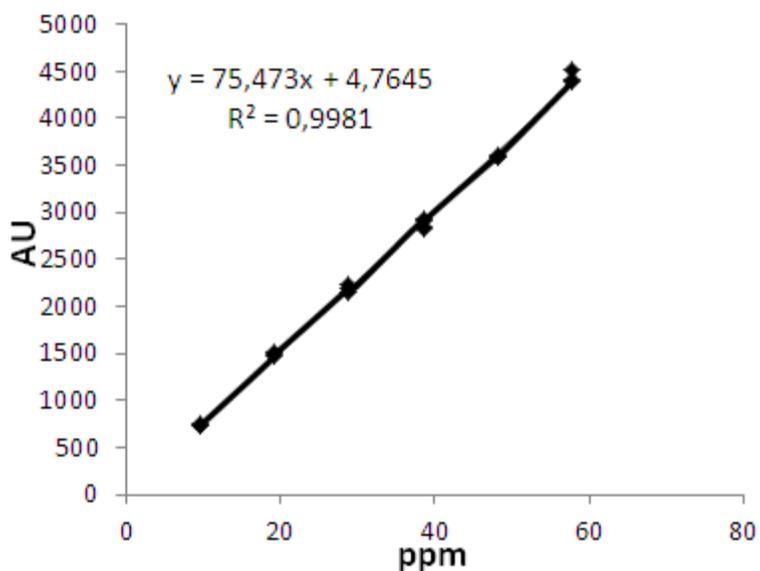
**Figura 20. Curva de calibración para ácido pirúvico en buffer de fosfatos pH=6.4**

<b>Tabla 16. Datos de la curva de calibración de ácido succínico</b>			
	<b>Área</b>	<b>[ppm]</b>	<b>A/[ppm]</b>
<b>S1</b>	203	3,032	67,667
	199	3,032	66,333
	206	3,032	68,667
<b>S2</b>	402	6,065	67,000
	397	6,065	66,167
	407	6,065	67,833
<b>S3</b>	608	9,097	67,556
	614	9,097	68,222
	586	9,097	65,111
<b>S4</b>	796	12,130	66,333
	811	12,130	67,583
	784	12,130	65,333
	782	12,130	65,167
<b>S5</b>	986	15,162	65,733
	961	15,162	64,067
	1002	15,162	66,800
<b>S6</b>	1164	18,194	64,667
	1185	18,194	65,833
	1179	18,194	64,801
	<b>PROM</b>		<b>66,362</b>
	<b>DS</b>		<b>1,323</b>
	<b>CV</b>		<b>1,99%</b>



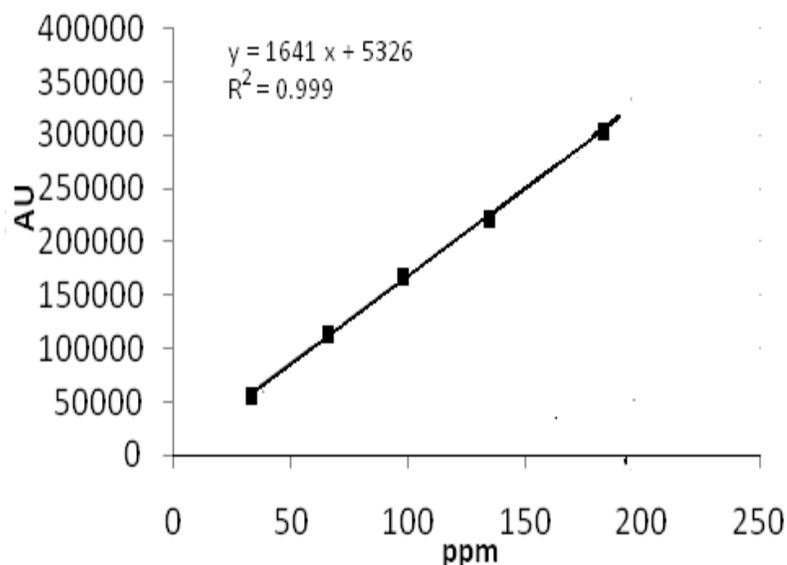
**Figura 21. Curva de calibración para ácido succínico en buffer de fosfatos pH=6.4**

<b>Tabla 17. Datos de la curva de calibración de ácido acético</b>			
	<b>Área</b>	<b>[ppm]</b>	<b>A/[ppm]</b>
<b>S1</b>	748	9,642	77,577
	741	9,642	76,851
	732	9,642	75,918
<b>S2</b>	1467	19,284	76,073
	1511	19,284	78,355
	1489	19,284	77,214
<b>S3</b>	2198	28,926	75,987
	2234	28,926	77,232
	2143	28,926	74,086
<b>S4</b>	2922	38,568	75,762
	2817	38,568	73,040
	2846	38,568	73,792
	2904	38,568	75,296
<b>S5</b>	3601	48,21	74,694
	3592	48,21	74,507
	3586	48,21	74,383
<b>S6</b>	4392	57,852	75,918
	4412	57,852	76,264
	4512	57,852	77,992
	<b>PROM</b>		<b>75,839</b>
	<b>DS</b>		<b>1,485</b>
	<b>CV</b>		<b>1,96%</b>



**Figura 22. Curva de calibración de ácido acético en buffer de fosfatos pH=6,4**

<b>Tabla 18. Datos de la curva de calibración de ácido benzoico</b>			
	<b>Área</b>	<b>[ppm]</b>	<b>A/[ppm]</b>
S1	333776	200.052	1668.446
	333265	200.052	1665.892
	332988	200.052	1664.507
S2	276581	166.71	1659.055
	271574	166.71	1629.020
	277498	166.71	1664.555
S3	229296	133.36	1719.376
	227941	133.36	1709.216
	226514	133.36	1698.515
S4	170923	100.02	1708.888
	172364	100.02	1723.295
	174171	100.02	1741.362
S5	114937	66.68	1723.710
	115075	66.68	1725.780
	114694	66.68	1720.066
S6	58316	33.34	1749.130
	57364	33.34	1720.576
	56742	33.34	1701.920
	<b>PROM</b>		<b>1699.6283</b>
	<b>DS</b>		<b>33.1241</b>
	<b>CV</b>		<b>1.94%</b>



**Figura 23. Curva de calibración para ácido benzoico en buffer de fosfatos pH=6.4**

**Tabla 19.- Resumen de resultados de las curvas de calibración.**

<b>Acido orgánico</b>	<b>Ecuación lineal</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>% C.V.</b>
Oxálico	$y = 689.85x - 62.422$	0.9991	1.48
Fumárico	$y = 2070.2x + 1419.1$	0.9996	1.63
Tartárico	$y = 81.767x + 0.2672$	0.9974	1.62
Málico	$y = 83.264x - 19.712$	0.9994	1.60
Succínico	$y = 64.081x + 13.298$	0.9988	1.99
Pirúvico	$y = 440.64x - 274.52$	0.9966	2.88
Acético	$y = 75.473x + 4.7645$	0.9981	1.96
Benzoico	$y = 1641.6x + 5326.7$	0.999	1.94

### 6.11.- Análisis de la cuantificación de ácidos orgánicos en cervezas.

**Tabla 20.- Concentraciones (mg/l) de ácidos orgánicos en cervezas del grupo modelo determinadas por EC utilizando como modificador de flujo TTAB.**

Acido orgánico	Modelo especial lata	Negra modelo	Modelo especial vidrio	Corona light	Corona extra Barril	Victoria tradicional	Corona	Corona Familiar	O'doul's	XX lager	Valores reportados
Oxálico	1.9	1.8	1.6	1.0	1.3	1.5	1.1	1.3	5.7	2.6	31*
Fumárico	6.5	1.0	1.9	0.9	1.4	2.4	3.4	2.2	3.1	1.7	0-8**
Tartárico	-	29.0	54.1	43.8	47.2	68.3	-	32.3	-	-	150***
Málico	105.2	41.5	58.8	46.4	37.9	46.6	116.0	40.7	181.8	-	20-150**
Succínico	71.0	27.2	28.0	28.2	8.04	32.3	33.5	32.9	27.4	79.7	40-200**
Pirúvico	52.4	45.7	51.3	36.8	44.5	27.7	46.9	45.5	37.6	-	20-100**
Acético	-	126.1	154.9	100.5	167.5	62.9	135.2	82.3	59.7	273.2	50-200**

Referencias \*[14]\*\*[9] \*\*\* [17]

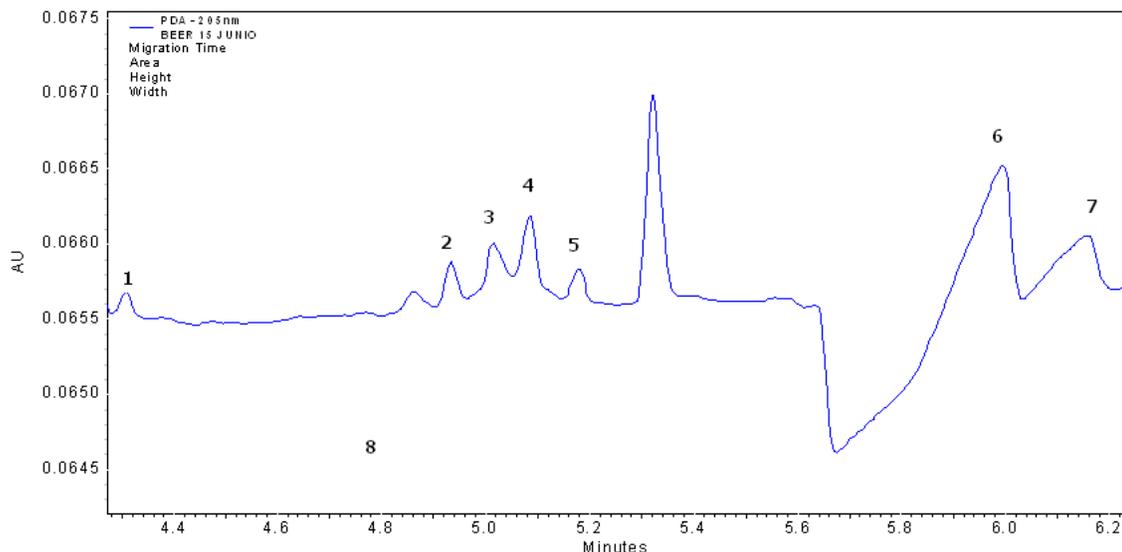
Se observa que la cantidad de ácidos orgánicos presentes en las muestras de cerveza analizadas, no rebasan los valores reportados, a excepción del ácido málico de la cerveza O'doul's sin alcohol, que sobrepasa el límite de los valores reportados.

Se incluyó el estudio del ácido benzoico en las muestras de cerveza analizadas, utilizándose como marcador en el análisis en cuanto a tiempo, además de considerar la posible adición de este ácido como conservador, sin embargo en las muestras analizadas no fue detectado dicho ácido, el método es capaz de cuantificar cantidades de hasta 0.5 ppm de ácido benzoico.

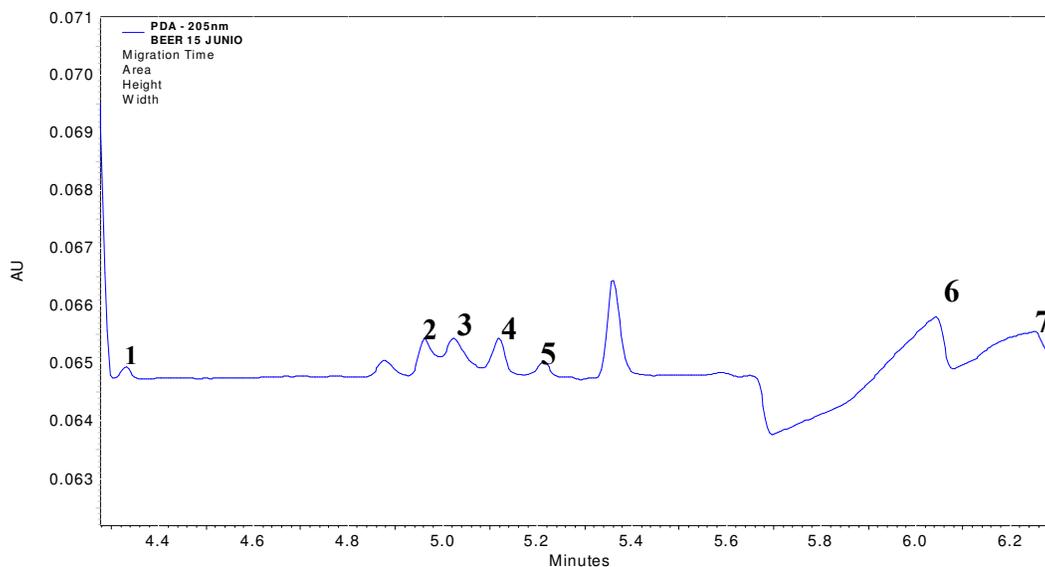
El método obtuvo resultados confiables en cuanto a la identificación y cuantificación de los ácidos orgánicos en 10 diferentes tipos de cerveza bajo la optimización de las condiciones de trabajo.

El conocimiento de la cantidad de ácidos orgánicos en muestras comerciales nos indica parte de sus propiedades y su forma de elaboración.

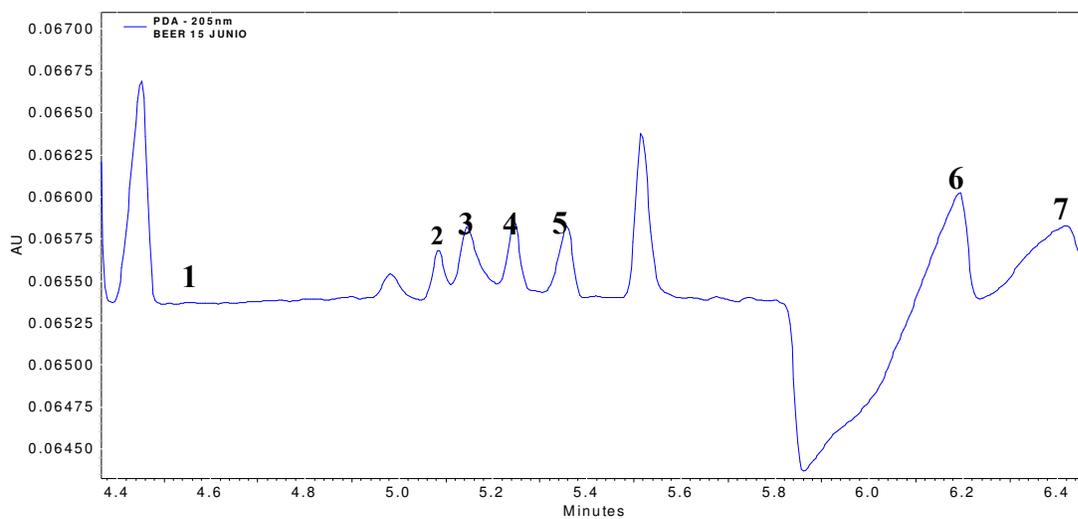
## 6.12 Electroferogramas obtenidos de la cuantificación de ácidos orgánicos en cervezas.



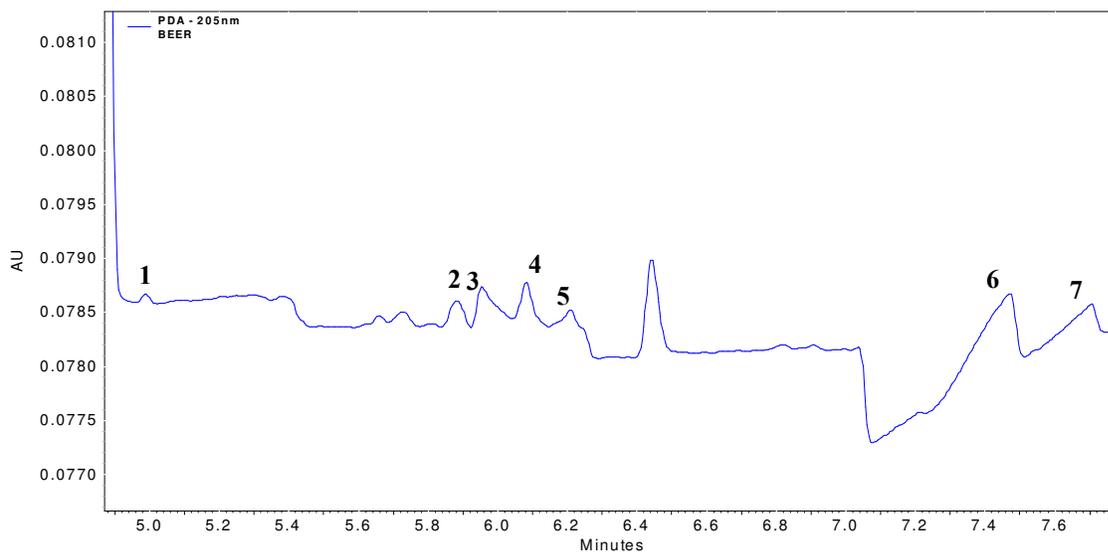
**Figura 24.** Separación obtenida para la muestra Negra Modelo. (1) *Ac. Oxálico*, (2) *Ac. fumárico*, (3) *Ac. Tartárico*, (4) *Ac. Málico* (5) *Ac. Succínico* (6) *Ac. Acético*, (7) *Ac. Pirúvico*.



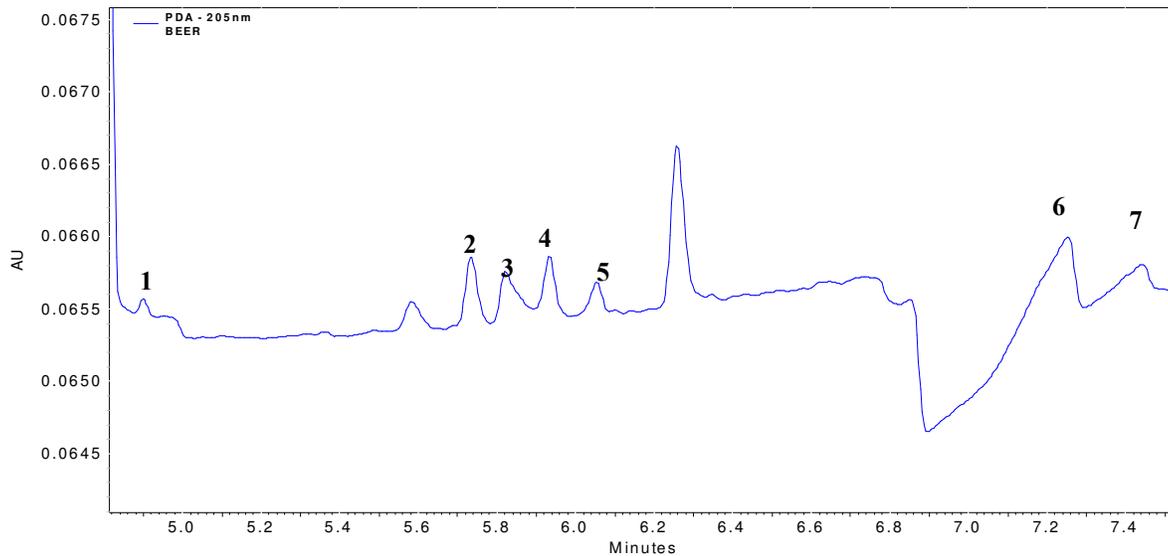
**Figura 25.** Separación obtenida para la muestra Modelo Especial vidrio. (1) *Ac. Oxálico*, (2) *Ac. fumárico*, (3) *Ac. Tartárico*, (4) *Ac. Málico* (5) *Ac. Succínico* (6) *Ac. Acético*, (7) *Ac. Pirúvico*.



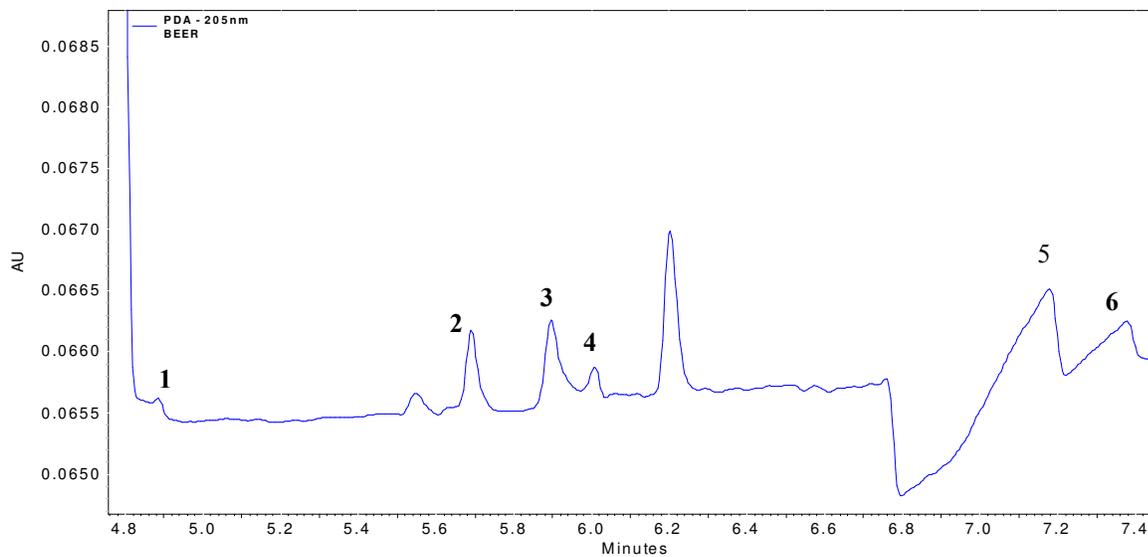
**Figura 26.** Separación obtenida para la muestra Corona Light. (1) *Ac. Oxálico*, (2) *Ac. fumárico*, (3) *Ac. Tartárico*, (4) *Ac. Málico* (5) *Ac. Succínico* (6) *Ac. Acético*, (7) *Ac. Pirúvico*.



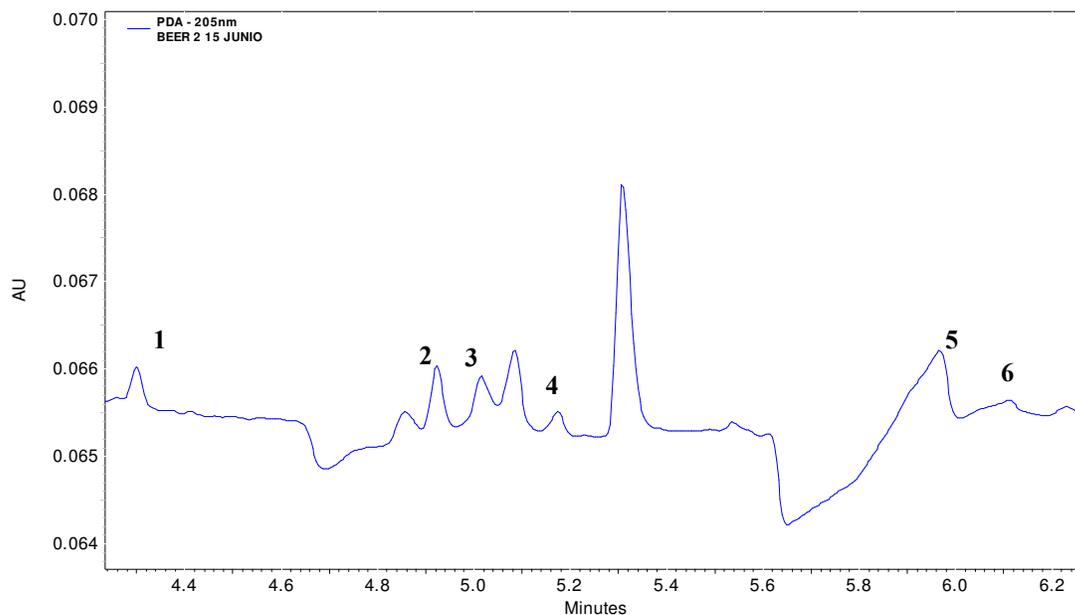
**Figura 27.** Separación obtenida para la muestra Corona Extra Barril. (1) *Ac. Oxálico*, (2) *Ac. fumárico*, (3) *Ac. Tartárico*, (4) *Ac. Málico* (5) *Ac. Succínico* (6) *Ac. Acético*, (7) *Ac. Pirúvico*.



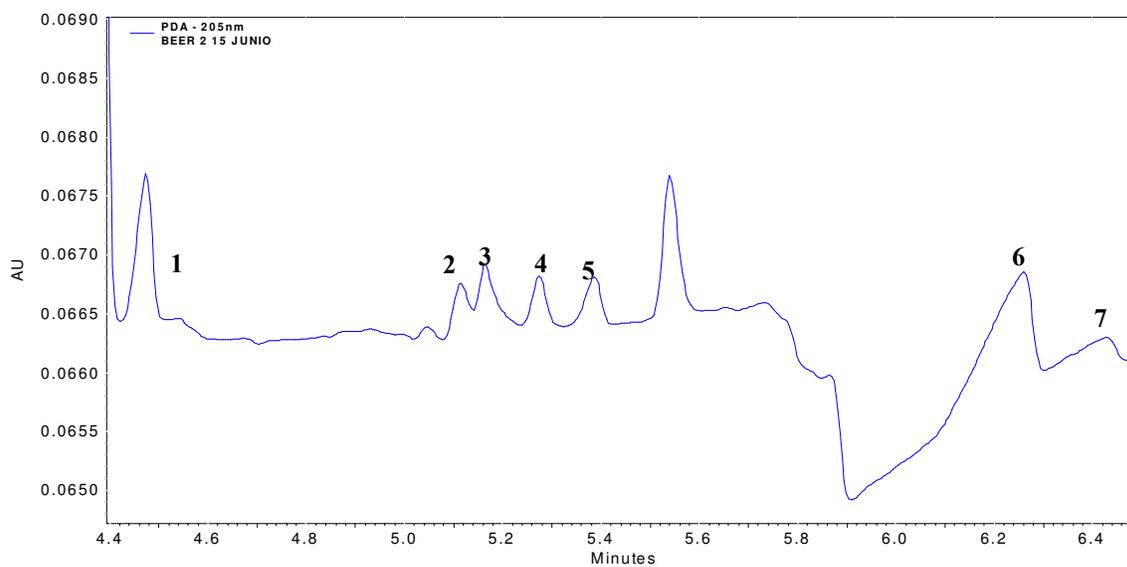
**Figura 28.** Separación obtenida para la muestra Victoria tradicional. (1) *Ac. Oxálico*, (2) *Ac. fumárico*, (3) *Ac. Tartárico*, (4) *Ac. Málico* (5) *Ac. Succínico* (6) *Ac. Acético*, (7) *Ac. Pirúvico*.



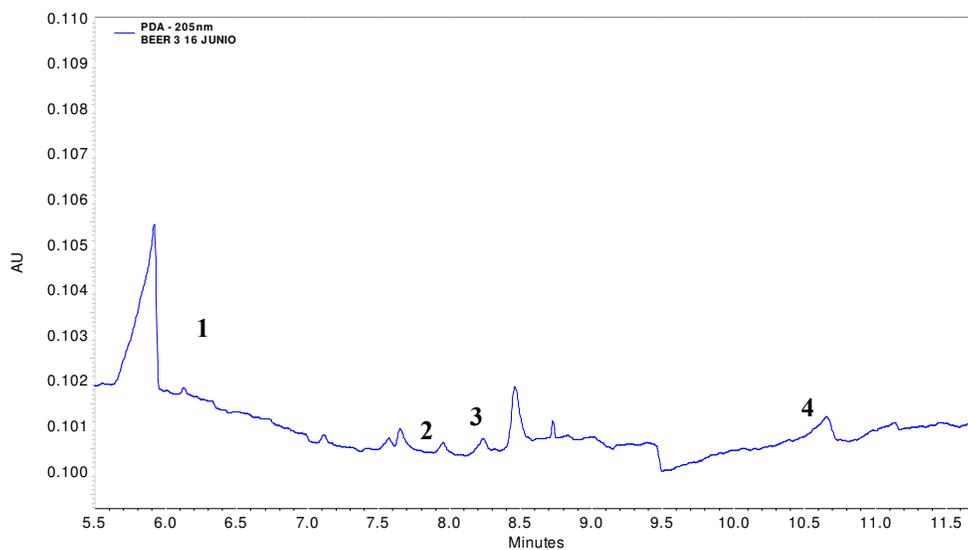
**Figura 29.** Separación obtenida para la muestra Corona Extra. (1) *Ac. Oxálico*, (2) *Ac. fumárico*, (3) *Ac. Málico* (4) *Ac. Succínico* (5) *Ac. Acético*, (6) *Ac. Pirúvico*.



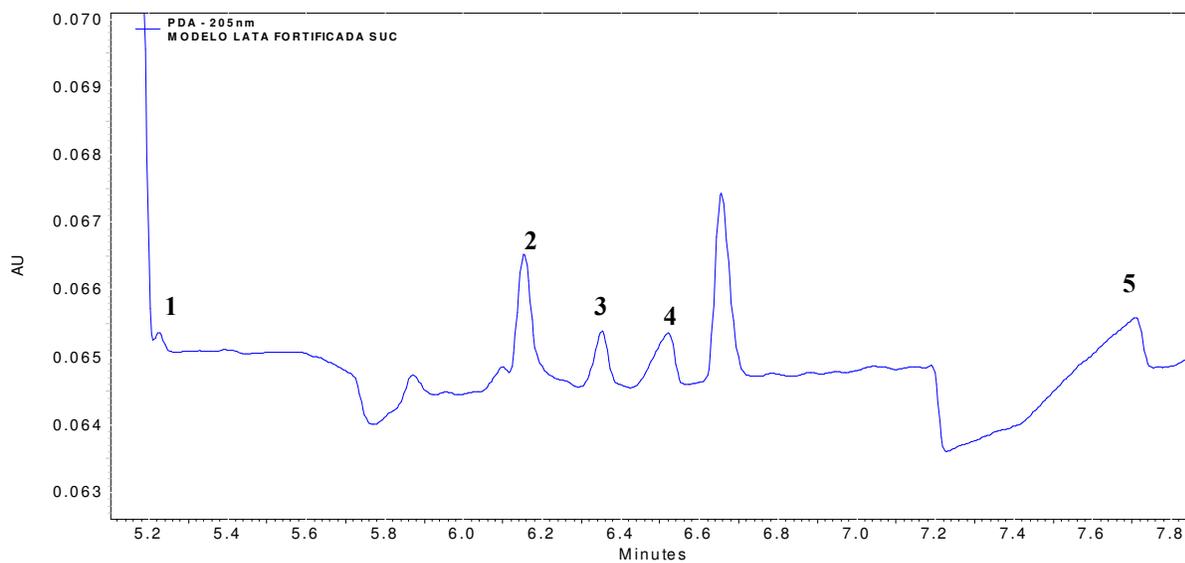
**Figura 30.** Separación obtenida para la muestra O'doul's. (1) *Ac. Oxálico*, (2) *Ac. fumárico*, (3) *Ac. Málico* (4) *Ac. Succínico* (5) *Ac. Acético*, (6) *Ac. Pirúvico*.



**Figura 31.** Separación obtenida para la muestra Corona Familiar. (1) *Ac. Oxálico*, (2) *Ac. fumárico*, (3) *Ac. Tartárico*, (4) *Ac. Málico* (5) *Ac. Succínico* (6) *Ac. Acético*, (7) *Ac. Pirúvico*.



**Figura 32.** Separación obtenida para la muestra XX Lager. (1) *Ac. Oxálico*, (2) *Ac. fumárico*, (3) *Ac. Succínico* (4) *Ac. Acético*.



**Figura 33.** Separación obtenida para la muestra Modelo lata. (1) *Ac. Oxálico*, (2) *Ac. fumárico*, (3) *Ac. Málico*, (4) *Ac. Succínico*, (5) *Ac. Pirúvico*.

# CONCLUSIONES

## 7. CONCLUSIONES

Se desarrolló un método analítico electroforético para separar, identificar y cuantificar ácidos orgánicos en cervezas del grupo Modelo determinándose las condiciones electroforéticas óptimas para la identificación y separación de los ácidos orgánicos por Electroforesis Capilar.

Se estableció un procedimiento para el tratamiento de una muestra de cerveza que permitió la eliminación de interferencias en la determinación de ácidos orgánicos.

El método desarrollado para la cuantificación de los ácidos orgánicos, se aplicó en muestras de cerveza del grupo Modelo que permitió comprobar que cada tipo de cerveza muestra diferente composición en cuanto a estos analitos.

Se establece que el tiempo de análisis que incluye el tratamiento de la muestra y llega hasta el resultado analítico (de ocho muestras de cerveza) que es la cuantificación de los ocho ácidos orgánicos, es de una hora treinta minutos.

# REFERENCIAS

## 8. REFERENCIAS

1. Bamforth, C.W. *Brewing New Technologies*. Edit. CRC Press, FL, USA, 2006. Págs. 317.
2. Baxter, E. Denisse, *Cerveza. Calidad, higiene y características nutricionales*. Edit. Acribia. España, Zaragoza. 2001. Págs. IX, 43-47.
3. Baker R.Dale, *Capillary Electrophoresis*. Ed. John Wiley & Sons Inc.1995 pgs. 34-35,95.
4. Castillo Rodríguez, *Fundamentos de electroforesis capilar*. Universidad Nacional Autónoma de México. Estado de México. 2005. Págs.19-26.
5. Cortacero-Ramírez, Sonia, Segura-Carretero, Antonio, Hernáinz-Bermúdez de Castro, Miguel, Fernández-Gutiérrez, Alberto. *Journal of Chromatography A*, 1064 (2005) 115–119.
6. Castiñeira, R. M. Peña a, C. Herrero, and S. García-Martín *Journal Of Food Composition And Analysis* (2002) 15, 319–331.
7. Fernández, Gutiérrez Alberto. *Electroforesis Capilar: Aproximación según la técnica de detección*. Biblioteca de Ciencias Experimentales de Granada. Granada , España, 2005 Págs.11-15.
8. Fox MaryeAnne, *Química Orgánica*, 2da. Ed. Pearson Education, Estados Unidos, Massachusetts. Pags.127-129.
9. Harris Daniel C. *Análisis Químico Cuantitativo*, 3 ra. Ed., Reverté, New York, Estados Unidos, 2007, Pags.117-118.
10. Hardwick. W.A. The properties of beer. In: Hardwick, W.A. (Ed), *Handbook of brewing*, New York: Marcel Dekker, Inc. 1995p.566.
11. Hough, J.S. Briggs, D.E, Stevens, J. S. and Youn, T.W. Metabolims of worst by yeast. *Malting and Brewing Science*. London: Chapman and Hall. (1981) p.595.
12. Inés Mató, José F. Huidobro, Jesús Simal-Lozano, M Teresa Sancho, *AnalyticaChemical Acta* 565 (2006) 190-197.
13. Jesús m. Izco, Mónica Tormo, and Rafael Jiménez-Flores *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, 50 (7), 1765-1773.
14. Jian Chen, Brett E Preston, Melissa J. Zimmerman *Journal of Chromatography A.*, 781 (1997) 205-213
15. Kampfl Christian, *Journal Agric. Food Chem.* (1999), 987-990

16. McMurry, John Química Orgánica, 7ma. Ed. CENGAGE Learning. México 2008, D.F
17. Marsili, R. T.; Ostapenko, H.; Simmons, R. E.; Green, D. E. High performance liquid chromatographic determination of organic acids in dairy products. J. Food Sci. **1981**, 46, 52-57.
18. Norma Oficial Mexicana NOM-142-SSA1-1995, Bienes y Servicios. Bebidas Alcohólicas. Especificaciones sanitarias, etiquetado sanitario y comercial.
19. Varela, José. Desarrollo de un método Cromatográfico (HPLC) para la determinación de ácidos orgánicos en cerveza. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Edo. De México, 2009. Pág.42.
20. <http://www.zonadiet.com/bebidas/a-cerveza-tipos.htm>(marzo 2010)
21. <http://www.cervezaysalud.com>(julio 2009)
22. [http://www.clubplaneta.com.mx/bar/proceso\\_de\\_elaboracion\\_de\\_la\\_cerveza.htm](http://www.clubplaneta.com.mx/bar/proceso_de_elaboracion_de_la_cerveza.htm)  
(septiembre 2009)
22. <http://www.javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/neurobioquimica/libros/celular/electroforesis.html>(septiembre 2009)