



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES Y
SEMIVOLÁTILES EN CERVEZA POR MICROEXTRACCIÓN EN
FASE SÓLIDA-CROMATOGRFÍA DE GASES-ESPECTROMETRÍA
DE MASAS Y SU RELACIÓN CON EL PERFIL SENSORIAL

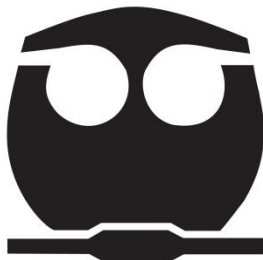
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUÍMICO DE ALIMENTOS

P R E S E N T A:

ANGEL FERNANDO OLVERA SUMANO



MÉXICO, D.F.

2013



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.

JURADO ASIGNADO:

Presidente	FRANCISCO ROJO CALLEJAS
Vocal	DULCE MARIA GOMEZ ANDRADE
Secretario	ARACELI PATRICIA PEÑA ALVAREZ
1er suplente	PATRICIA SEVERIANO PEREZ
2do suplente	SILVIA CITLALLI GAMA GONZALEZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA

Laboratorio 101 de Cromatografía. Departamento de Química Analítica. Edificio B
División de Estudios de Posgrado, Facultad de Química, UNAM.

Laboratorio 4-D. Departamento de Alimentos y Biotecnología. Edificio A, Facultad
de Química, UNAM.

ASESOR:

Dra. Araceli Patricia Peña Álvarez

SUPERVISOR TECNICO:

Dra. Patricia Severiano Pérez

SUSTENTANTE:

Angel Fernando Olvera Sumano

Este trabajo se presentó en el XXVI CONGRESO NACIONAL DE
QUÍMICA ANALÍTICA Guadalajara, Jal. Junio 2013.

AGRADECIMIENTOS

RESUMEN.....	1
I. OBJETIVOS.....	3
1.1 GENERALES.....	3
1.2 PARTICULARES	3
II. INTRODUCCIÓN.....	4
III. ANTECEDENTES	6
3.1 BEBIDAS ALCOHÓLICAS.....	6
3.1.1 <i>Bebidas Fermentadas destiladas</i>	6
3.1.2 <i>Bebidas Fermentadas no destiladas</i>	6
3.2 CERVEZA.....	8
3.2.1 <i>Clasificación</i>	9
3.2.2 <i>Congéneres</i>	12
3.2.2.1 <i>Alcoholes</i>	13
3.2.2.2 <i>Terpenos</i>	14
3.2.2.3 <i>Ésteres</i>	15
3.3 MÉTODOS GENERALES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CONGÉNERES	16
3.3.1 <i>Métodos Físicos</i>	16
3.3.2 <i>Métodos Químicos</i>	17
3.3.3 <i>Métodos Enzimáticos</i>	17
3.3.4 <i>Biosensores, Electrodo y otros detectores</i>	17
3.3.5 <i>Métodos Instrumentales</i>	18
3.4 CROMATOGRAFÍA DE GASES.....	18
3.4.1 <i>Definición de Cromatografía</i>	18
3.4.2 <i>Instrumentación</i>	19
3.4.3 <i>Gas Acarreador</i>	20
3.4.4 <i>Sistema de Inyección de Muestras</i>	20
3.4.5 <i>Columna y Horno</i>	22
3.4.6 <i>Detectores</i>	24
3.4.7 <i>Cromatografía de Gases Espectrometría de Masas (GC-MS)</i>	24
3.5 MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN EN GC.....	26
3.5.1 <i>Estándar Interno</i>	26
3.5.2 <i>Normalización de Áreas</i>	27
3.5.3 <i>Normalización de Áreas con Factor de Respuesta</i>	27
3.5.4 <i>Estándar Externo</i>	28

3.5.5 Adiciones Patrón.....	28
3.6 MÉTODOS DE PREPARACIÓN DE MUESTRA	28
3.6.1 Micro Extracción en Fase Sólida (SPME)	30
3.6.2 Head Space (HS).....	31
3.7 EVALUACIÓN SENSORIAL.....	33
IV. DESARROLLO EXPERIMENTAL	37
4.1 APARATOS.....	37
4.2 MATERIALES.....	37
4.3 REACTIVOS Y ESTÁNDARES.	38
4.4 MUESTRAS	38
4.5 METODOLOGÍA ANALÍTICA	39
4.5.1 Caracterización y Cuantificación de alcoholes por GC-FID.....	39
4.5.1.1 Determinación de factores de respuesta.	39
4.5.1.2 Lavado de ácido silícico	40
4.5.1.3 Determinación de alcoholes en Cerveza	40
4.5.1.4 Condiciones Cromatográficas	40
4.5.1.5 Caracterización de alcoholes superiores y metanol por SPME-HS-GC-FID.	41
4.5.1.6 Confirmación de metanol en muestras por SPME-HS-GC-FID.	41
4.5.1.7 Condiciones Cromatográficas	42
4.5.2 Caracterización de compuestos volátiles y semi-volátiles por SPME-HS-GC-MS.....	42
4.5.2.1 Condiciones Cromatográficas	42
4.6 METODOLOGÍA SENSORIAL	43
4.6.1 Generación de descriptores.....	43
4.6.2 Evaluación de las muestras.....	44
4.6.3 Análisis de Datos	44
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	46
5.1 CARACTERIZACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE METANOL Y ALCOHOLES SUPERIORES	46
5.1.1 Modo de Inyección, y cálculo de Factores de Respuesta relativos.	46
5.1.2 Caracterización y cuantificación de metanol.....	49
5.1.3 Caracterización y cuantificación de Alcoholes superiores.....	52
5.2 CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES Y SEMIVOLÁTILES POR SPME-HS-GC-MS.	57
5.3 ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES (PCA) PARA LAS FAMILIAS DE COMPUESTOS IDENTIFICADOS.	66
5.4 EVALUACIÓN SENSORIAL	69

VI. CONCLUSIONES	79
VII. PERSPECTIVAS	79
VIII. ANEXO	82
ANEXO I	82
ANEXO II	84
IX. BIBLIOGRAFIA	87

LISTA DE ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
Cor	Cerveza Corona
FCP*	Perfil de Libre Elección
GC*	Cromatografía de Gases
GC-FID*	Cromatografía de Gases usando Detector de Ionización de Flama
GC-MS*	Cromatografía de Gases- Espectrometría de Masas
GLC*	Cromatografía Gas-Líquido
GPA*	Análisis Procruster Generalizado
HS*	Head Space (Espacio de Cabeza)
MPA	Cerveza Minerva Pale-Ale
MSI	Cerveza Minerva Stout Imperial
NM	Cerveza Negra Modelo
PA	Poliacrilato
PCA*	Análisis de Componentes Principales
PDMS	Polidimetilsiloxano
QDA*	Análisis Descriptivo Cuantitativo
SPME*	Microextracción en Fase Sólida
SPME-HS*	Microextracción en Fase Sólida modo Head Space
SPME-HS-GC-FID*	Microextracción en Fase Sólida modo Head Space seguido de Cromatografía de Gases usando Detector de Ionización de Flama
SPME-HS-GC-MS*	Microextracción en Fase Sólida modo Head Space seguido de Cromatografía de Gases- Espectrometría de Masas
Tec	Cerveza Tecate
tr	Tiempo de retención
Vic	Cerveza Victoria

*Por sus siglas en inglés.

RESUMEN

En este proyecto se caracterizaron algunos de los compuestos orgánicos volátiles y semivolátiles (congenéricos) presentes en dos diferentes tipos de Cerveza (Lager y Ale), producidas en el territorio mexicano, mediante Cromatografía de Gases (GC, por sus siglas en inglés), para posteriormente relacionarlo con los resultados de un Análisis Sensorial.

Se implementó una metodología previamente desarrollada, para el análisis de bebidas alcohólicas fermentadas-destiladas (Mezcal y Tequila) al análisis de bebidas alcohólicas fermentadas (Cerveza). La metodología utiliza Cromatografía de Gases (GC) y Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (GC-MS, por sus siglas en inglés).

El contenido de metanol y alcoholes superiores fue determinado mediante factores de respuesta relativos utilizando GC y un detector de Ionización de Llama (GC-FID, por sus siglas en inglés). Se encontró que las bebidas no exceden los límites permitidos en la normatividad (300 mg de metanol/ 100mL alcohol anhidro y 500 mg de alcoholes superiores/ 100mL alcohol anhidro respectivamente). La identificación de los compuestos se realizó comparando el tiempo de retención obtenido con una disolución estándar de los alcoholes superiores (iso-butanol, propanol, hexanol, alcohol isoamilico y alcohol bencílico) y metanol.

Mediante Microextracción en Fase Sólida modo Head Space (SPME-HS, por sus siglas en inglés) seguida de GC-MS se caracterizaron 51 compuestos orgánicos volátiles y semi-volátiles en seis muestras de cerveza (4 Lager y 2 Ale). Las principales familias de compuestos identificados fueron: ésteres etílicos, terpenos, alcoholes, compuestos carbonílicos, entre otros. Se sabe que estas familias de compuestos proporcionan características organolépticas a la matriz en la cual están involucrados. En cada una de las cervezas analizadas, estos analitos están presentes en distintas proporciones.

Usando un panel de 12 jueces no entrenados se analizaron las muestras de cerveza mediante un Perfil Sensorial Rápido (Perfil de Libre Elección), los jueces

evaluaron el aspecto, olor, sabor y las sensaciones de las muestras. Los resultados fueron analizados utilizando Análisis de Procruster Generalizado (GPA, por sus siglas en inglés). Se observó que el análisis es direccionado por el aspecto de las muestras, por lo cual se decidió realizar un GPA únicamente de olor, sabor y sensaciones. El GPA fue capaz de agrupar las cervezas dependiendo de su tipo (Lager y Ale).

Sensorialmente existen diferencias que permiten agrupar las muestras en Lager y Ale, estas diferencias son atribuidas a los congéneres identificados, los cuales dependiendo su proporción conferirán diferentes características sensoriales a las bebidas.

I. OBJETIVOS

1.1 GENERALES

☞ Caracterizar los compuestos volátiles y semivolátiles en cervezas producidas en México mediante GC, para aportar información que ayude a la caracterización química de las cervezas producidas en el territorio mexicano.

☞ Evaluar los atributos sensoriales en cervezas producidas en México mediante un Análisis Sensorial.

1.2 PARTICULARES

☞ Caracterizar compuestos orgánicos volátiles y semivolátiles mediante GC-MS en cervezas Lager y Ale producidas en México.

☞ Caracterizar y cuantificar el contenido de alcoholes superiores y metanol mediante GC-FID en cervezas Lager y Ale producidas en México.

☞ Correlacionar los compuestos identificados analíticamente y los atributos evaluados sensorialmente.

II. INTRODUCCIÓN

En general las bebidas alcohólicas se dividen en dos grandes grupos: aquellas que son el producto final de una fermentación alcohólica y cuyo contenido alcohólico no es muy alto (Cerveza y Vino), y aquellas que se obtienen destilando los productos obtenidos por fermentación alcohólica (Tequila, Ron, etc.). Los mostos contienen azúcares o almidones sacarificables, que al ser o no destilados tendrán una graduación alcohólica de 2% a 55% v/v a 20°C.

México puede considerarse como un país de producción cervecera, en 2008 ocupó el lugar número siete a nivel mundial con 48.91 millones de hectolitros producidos en solo seis meses.¹ De acuerdo con la Cámara Nacional de la Industria de la Cerveza y la Malta, el consumo per-cápita en México se ha mantenido en 62 litros por persona al año.²

Actualmente hay una gran variedad de cervezas sin embargo, existe una distinción básica en la familia de la cerveza: “la fermentación”. Las condiciones de fermentación y los microorganismos empleados para esta, producen tres tipos de cervezas: Lager, Ale y Lambica, siendo esta última únicamente originaria de Bélgica.

En general, el sabor de la cerveza, es consecuencia de una mezcla muy compleja de gran cantidad de compuestos, entre ellos metabolitos volátiles generados en pequeñas concentraciones durante la fermentación. Estos reciben el nombre de congenéricos o congéneres. Los más importantes son compuestos que se encuentran en diferentes proporciones agrupados en las siguientes especies químicas: alcoholes, ésteres, terpenos y carbonilos. Los congenéricos, por su presencia y concentración en las cervezas caracterizan y hacen únicos a los diferentes tipos de estas, por lo cual, todo lo que influye en su producción contribuye a las características distintivas.

Hasta el momento no se han encontrado reportados estudios de este tipo en cervezas Lager y Ale de producción mexicana, este trabajo proporcionará información para caracterizar y cuantificar los compuestos volátiles y semivolátiles

presentes en estas bebidas para posteriormente correlacionarlos mediante un análisis sensorial y así determinar cuáles son los compuestos que posiblemente conferirán diferentes características sensoriales a las bebidas.

III. ANTECEDENTES

3.1 BEBIDAS ALCOHÓLICAS

En general todas las bebidas espirituosas provienen de una fermentación alcohólica principalmente de mostos de origen vegetal, producida por una levadura del género *Saccharomyces*, el producto principal de esta fermentación es el etanol. Las bebidas alcohólicas se pueden dividir en dos grandes grupos: aquellas que son el producto final de una fermentación alcohólica y cuyo contenido alcohólico no es muy alto (Cerveza, Sidra, Vino, etc.), y aquellas que se obtienen sometiendo a destilación los productos obtenidos de la fermentación alcohólica (Tequila, Mezcal, Ron, etc.).

Los mostos a fermentar, contienen azúcares o almidones sacarificables (cereales como cebada, arroz, maíz, caña de azúcar, mieles incristalizables, jarabe de glucosa, jarabes de fructosa, frutas, tubérculos, etc.), que al ser o no sometidos a procesos posteriores (destilación, rectificación, redestilación, añejamiento, etc.) tendrán una graduación alcohólica de 2% a 55% v/v a 20°C.³

3.1.1 Bebidas Fermentadas destiladas

De acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-142-SSA1-1995 una bebida alcohólica destilada, es un producto obtenido por destilación de líquidos fermentados que se hayan elaborado a partir de materias primas vegetales en las que la totalidad o una parte de sus azúcares fermentables, hayan sufrido como principal fermentación, la alcohólica.³ Como ya se mencionó, las bebidas alcohólicas obtenidas por destilación, podrán ser sometidos a procesos posteriores (rectificación, redestilación, añejamiento, etc.).

3.1.2 Bebidas Fermentadas no destiladas

Del mismo modo, las bebidas alcohólicas fermentadas no destiladas provienen de mostos de origen vegetal (uva, manzana, pera, arroz, cebada, maíz)

y tienen un bajo contenido alcohólico. Estas, únicamente pueden ser sometidas o no a procesos de maduración, los cuales les brindaran un perfil característico.

La Tabla 3.1 muestra la clasificación de algunas bebidas alcohólicas destiladas y no destiladas, y muestra cual es la materia prima principal de la que provienen.

Tabla 3.1. Materia prima principal de algunas bebidas alcohólicas destiladas y no destiladas.⁴

	Sustrato	No destiladas	Destiladas
F R U T A S	Uva	Vino, Champaña, Vinos espumosos	Brandy, Coñac, Armañac, Pisco, Grappa
	Manzana	Sidra, Sidra espumosa	Calvados
	Pera	Perry	
	Cereza	Kirsch	
C E R E A L E S	Cebada	Cerveza	Whiskey, Whisky
	Maíz	Tesgüino	Bourbon, Whisky de maíz, Whisky de Tennessee
	Arroz	Sake	---
	Sorgo	Kaffir	---



V A R I O S	Papa	---	Vodka, Ginebra, Akvavit	 
	Caña	---	Ron, Aguardiente, Cachaza, Pinga, Charanda	
	Agaves	Pulque	Tequila, Mezcal	

3.2 CERVEZA

Se entiende por cerveza, bebida alcohólica no destilada, con un bajo contenido alcohólico, en México se establece menos de 6 % (v/v) (grados Gay Lussac °GL) pero en otros países puede llegar a contener hasta 18° GL. Es elaborada por la fermentación de uno o varios cereales, carbonatada por consecuencia de la fermentación y saborizada por la infusión del lúpulo. En sentido más estricto dentro del territorio mexicano el Diario Oficial de la Federación estableció una definición para la cerveza, “Bebida alcohólica fermentada elaborada con malta, lúpulo y agua potable, o con infusiones de cualquier semilla farinácea procedente de gramíneas o leguminosas, raíces o frutos feculentos o azúcares como adjuntos de la malta, con adición de lúpulos o sucedáneos en éstos, con una graduación alcohólica de 2°-6° Gay Lussac.”⁵

El proceso de elaboración de cerveza es complejo desde la recepción de la materia prima hasta el envasado del producto final. En la Figura 3.1 se muestra a grandes rasgos el proceso de elaboración de cerveza.



Figura 3.1. Diagrama del proceso de elaboración de cerveza

3.2.1 Clasificación

En la actualidad existe una gran variedad de cervezas sin embargo, hay una distinción básica en la familia de la cerveza que permite clasificarla. El proceso de fermentación, en el cual el tipo de levadura utilizada y las condiciones de fermentación son dos parámetros que modifican la composición de la cerveza y le confieren características únicas. Con respecto al mismo se puede clasificar a esta bebida alcohólica en tres tipos: Lager, Ale y Lambica, siendo esta última únicamente originaria de Bélgica.⁶

Las cervezas “Lager” son denominadas de fermentación baja, ya que las levaduras fermentan en el fondo de los tanques. Se caracteriza por el uso de *Saccharomyces pastorianus* y una temperatura inicial de fermentación de 7-11°C, la cual se incrementa a 10-15°C en un tiempo de 3 a 5 días, para finalmente decender a las temperaturas iniciales; la fermentación en total dura 8 y 10 días.⁷ Tienen un aspecto limpio, son bastante espumosas, tienen un marcado sabor a

lúpulo y son refrerscantes. En México son las de mayor consumo. Asimismo las cervezas Lager tienen una clasificación interna como se muestra en la Tabla 3.2.

Tabla. 3.2. Clasificación interna de Cervezas Lager y algunas marcas mas representativas producidas en México.⁴

LAGER	CARACTERÍSTICAS	MARCAS MEXICANAS
Pilsener	Clara (dorado ámbar), alto nivel de lúpulo (amarga), dulces o secas, buena carbonatación	-Corona Extra -Barrilito -Modelo Especial -Montejo -Bohemia -Superior -Pacífico Clara -Dos Equis Lager Especial
Dortmunder	Similar pero con menos lúpulo y más ligera, seca	-Tecate -Sol
Viena	Semiobscura, ligera (poco cuerpo), sabor a malta y ligeramente dulce	-Bohemia Oscura -Victoria -Dos Equis Ámbar -Indio -Minerva Viena
Múnich	Obscura, sabor a malta, dulce, aromática, amargo moderado, mucho cuerpo	-Negra Modelo -León
Bock	Clara, semiobscura u obscura, mucho cuerpo, contenido alcohólico alto, amarga, muy aromática, madurada 3 a 4 meses	No hay
Doppelbock	Con más cuerpo y más alcohol, muy aromática.	No hay
Eisbock	Destilada por congelamiento: muchísimo cuerpo y muy alto contenido alcohólico (hasta 18%)	No hay

Las cervezas “Ale” son denominadas de fermentación alta ya que las levaduras fermentan en la superficie del mosto. Se caracteriza por el uso de *Saccharomyces cerevisiae* y una temperatura de fermentación de 10-15°C, la cual se incrementa hasta 21-22°C a las 36 horas y finalmente desciende a los valores iniciales; la duración del proceso es de 72 horas.⁷ Debido a estas condiciones las cervezas del tipo Ale tienen una mayor concentración de congéneres comparado con las tipo Lager. A diferencia de las cervezas Lager, en México solo cervecerías

artesanales estan dedicadas a la producción de este tipo de cervezas. En la Tabla 3.3 se pueden observar las características generales y las marcas que se producen en el territorio mexicano.

Tabla 3.3. Clasificación interna de Cervezas Ale y algunas marcas representativas producidas en México.⁴

ALE	CARACTERÍSTICAS	MARCAS MEXICANAS
Pale ale	Cerveza clara (cobre), mucho cuerpo, fuertemente lupulada (muy amarga), poco dulce, afrutada	-Minerva Pale-ale. -Coyote,
Stout, Porter	Mucho muy obscura (negra), mucho cuerpo, muy lupulada (muy amarga), dulce o seca, sabores tostados, afrutada, mucha espuma consistente	-Minerva Stout Imperial -Luna Llena,
Altbier	Semiobscura, amarga, afrutada, cuerpo y contenido de alcohol moderados	-Tempus
Kölsch, Colonial	Clara a semiobscura, cuerpo y contenido de alcohol moderados, amargo moderado, afrutada.	-Minerva
Brown ale	Obscura, menos alcohol, poco lúpulo, dulce, afrutada	No hay
Mild ale	Semiobscura, dulce, ligera, moderadamente amarga, bajo contenido alcohólico (3.5%), afrutada	No hay
Strong Ale	Mayor contenido alcohólico y fuertemente lupulada	No hay
Trappist	Producida solo en 6 abadías en Bélgica operadas por monjes trappistes con certificación de autenticidad. Azúcar como adjunto, muy alcohólica (hasta 12.5%), mucho sabor, mucho cuerpo, maduras en botella, color cobrizo oscuro, ligeramente turbia, muy amarga, ácida, afrutada	No hay
Abadía	Similar a la trappist, producidas por cervecerías comerciales bajo la licencia de una abadía con receta tradicional	No hay

Por lo regular al final de la fermentación tradicional en cervezas Ale, las levaduras altas son separadas en forma mecánica o por succión, aunque en la actualidad se utilizan levaduras que flocculan formando conglomerados compactos en el fondo del tanque.⁷ Esto implica que la relación entre levaduras altas y bajas con los procesos Lager y Ale no tienen carácter absoluto es decir, hoy en día que una levadura fermenta en el fondo de un tanque, no significa forzosamente que se trata de una cerveza del tipo Lager y del mismo modo que una levadura fermenta en parte alta del tanque no se tratara necesariamente de una cerveza Ale.

Por último se tienen las cervezas Lámbicas, están hechas a partir de cebada y trigo malteados, no amarga (lúpulos añejados), tiene un amplio espectro de sabores con notas frutales (cereza, frambuesa, etc.), acéticas y ácidas ya que se lleva a cabo una fermentación “espontánea” o natural, de forma que fermenta sin necesidad de añadir levadura.⁶ Debido a que puede ser madurada adquiere notas a madera (añejamiento en barricas 1 o 2 años). Este tipo de cerveza no es producida comúnmente en el territorio mexicano.

3.2.2 Congéneres

Aparte del etanol como producto mayoritario, durante la fermentación se produce CO₂ y otros metabolitos llamados congenéricos, que en conjunto con los componentes del mosto, los aceites esenciales y resinas del lúpulo que confieren a la cerveza sus características sensoriales particulares.⁷ Los congenéricos se encuentran en menores proporciones, estos compuestos pueden ser alcoholes superiores, ésteres, terpenos, ácidos carboxílicos, compuestos carbonílicos, etc. Si bien hay bebidas alcohólicas que poseen algunos congenéricos particulares, en general son los mismos compuestos los que se encuentran presentes en todas las bebidas, siendo más bien las proporciones de cada uno de ellos la razón de que existan diferencias distintivas entre estos productos.

3.2.2.1 Alcoholes

Los alcoholes son compuestos orgánicos que contienen un grupo hidroxilo (-OH) como grupo funcional. La fórmula general de un alcohol es R-OH. Los alcoholes se encuentran entre los compuestos orgánicos más polares, ya que el grupo hidroxilo es muy polar.⁸

Según la NOM-142-SSA1-1995 el etanol o también llamado alcohol etílico, es el producto mayoritario obtenido por fermentación, principalmente alcohólica de los mostos de las materias primas de origen vegetal que contienen azúcares o de aquéllas que contienen almidones sacarificables. Su fórmula es $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$ y sus efectos intoxicantes e incapacitantes dependen de la concentración en sangre.⁹

El metanol es otro alcohol que puede encontrarse en las bebidas alcohólicas, al igual que el etanol produce una intoxicación, pero tiene la variante de que es un compuesto considerado altamente tóxico ya que el cuerpo humano lo transforma en ácido fórmico (HCO_2H) y formaldehído (CH_2O). Estos compuestos atacan las células de la retina produciendo ceguera permanente.¹⁰ Esta es la razón por la cual el metanol está regulado mediante la normatividad y en el caso de la cerveza solo se permiten 300 mg/100mL de alcohol anhidro.

Los alcoholes superiores también llamados aceite de fusel, presentes en las bebidas alcohólicas forman parte de los congenéricos, estos compuestos pueden ser: C_3 n-propanol, C_4 butanol, 2-butanol, sec- butanol, C_5 Alcohol amílico, alcohol isoamilico y algunos otros como el hexanol y fenil etanol.^{10, 11} Las estructuras químicas de los compuestos antes mencionados y las de los estándares internos que se utilizaron en este trabajo se muestran en la Figura 3.2.

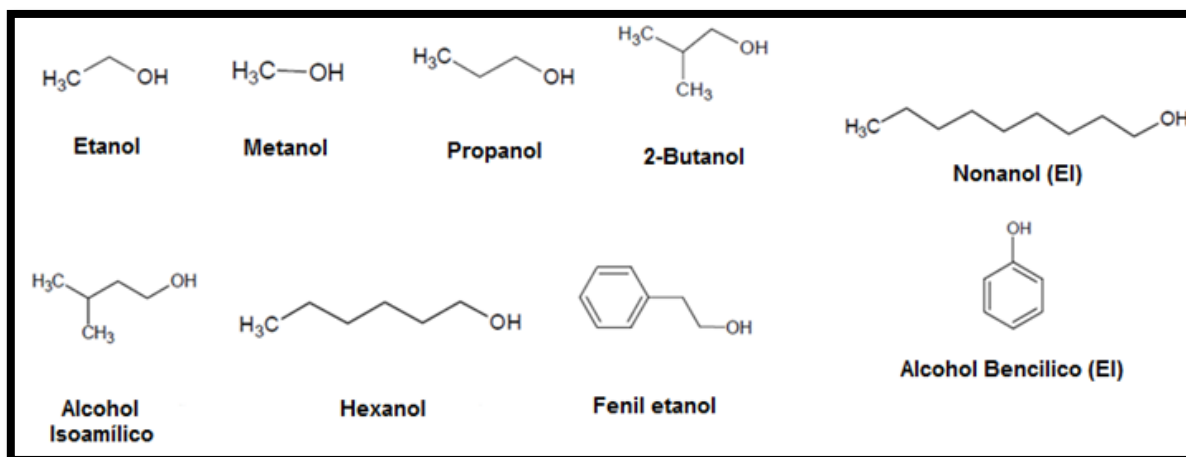


Figura 3.2. Estructura química del etanol, metanol, alcoholes superiores y sus respectivos estándares internos (EI).

Los precursores de los aceites de fusel son los aminoácidos; se sabe que la leucina, la isoleucina y la valina dan origen a los alcoholes isoamílico, amílico e isobutílico respectivamente. El n-propanol se forma a partir de un aminoácido polar no cargado; *la treonina*. El fenil etanol, es un congenérico ampliamente distribuido en las bebidas alcohólicas y está relacionado con aromas florales.¹¹ Por normatividad la Secretaría de Salud indica que estos compuestos deben de estar regulados ya que en concentraciones mayores a las permisibles (500 mg/100 mL de alcohol anhidro), pueden causar degeneración celular, deficiencias orgánicas especialmente a nivel ocular, sistema nervioso central y hepático.¹²

3.2.2.2 Terpenos

Los terpenos son una familia de diversos compuestos que tienen esqueletos formados por unidades de isopreno (2- metil-1,3-butadieno). Los terpenos suelen encontrarse en los aceites esenciales de las plantas. Con frecuencia tienen aromas o gustos agradables, y son muy utilizados como saborizantes, aromas y medicamentos. Estos se clasifican de acuerdo con el número de átomos de carbono, en unidades de diez. A un terpeno con 10 átomos de carbono (dos unidades isopreno) se le denomina monoterpeno, con 20 átomos de carbono (cuatro unidades de isopreno), diterpeno y así sucesivamente. A los

terpenos con 15 átomos de carbono (tres unidades de isopreno) se les denomina sesquiterpenos.⁸

3.2.2.3 Ésteres

El nombre éster generalmente se refiere a un éster de un ácido carboxílico, el cual se obtiene sustituyendo el grupo -OH de un ácido carboxílico por el grupo -OR de un alcohol. Los ésteres son algunos de los compuestos responsables del sabor más numerosos en las bebidas alcohólicas en general.

La siguiente reacción, conocida como esterificación de Fischer, muestra la relación que hay entre el alcohol y el ácido para formar un éster y agua.⁸



Los ésteres también son producidos intracelularmente como resultado de la condensación de ésteres de Coenzima A (CoA) de ácidos grasos con alcoholes. Una vez formados y siendo liposolubles, difunden de las células de levaduras al caldo de fermentación. Cuando el crecimiento de la levadura está restringido por una baja reserva de esteroides y ácidos grasos insaturados, la concentración de acetil-CoA aumenta y la velocidad de síntesis de esteroides aumenta.¹¹

El perfil de ésteres y sus concentraciones depende de la especie de levadura empleada. En las cervezas se encuentran en concentraciones variadas, teniendo una mayor proporción en las cervezas del tipo Ale.


De los ésteres reportados, el éster más abundante es el acetato de etilo, este compuesto ha sido relacionado con sabores frutales. Las diferentes temperaturas de fermentación generan diferentes perfiles, especialmente la formación de acetato de etilo y de 2-fenil acetato que están favorecidos por un aumento de la temperatura. Las presiones cercanas a la atmosférica promueven la formación de ésteres etílicos con ácidos grasos de 8, 10 y 12 carbonos. El aumento de alcoholes superiores contribuye a la formación de algunos ésteres.¹¹

En las bebidas alcohólicas, todos los compuestos antes mencionados y muchos otros (ácidos carboxílicos, aldehídos, etc.), están presentes como productos en las etapas de la elaboración de la bebida y en el producto final, si bien son deseables o no, en la mayoría de los casos su concentración es baja e influye en las propiedades organolépticas de las bebidas alcohólicas, por lo que se hace necesario caracterizarlos y cuantificarlos apoyándose de diversos métodos.

3.3 MÉTODOS GENERALES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CONGÉNERES

En la actualidad hay métodos disponibles para la detección y cuantificación de compuestos presentes en las bebidas alcohólicas. En general, al elegir un método adecuado para cuantificar y detectar estos compuestos se deben tomar en cuenta varios factores. Los tipos de analitos que se cuantificaran, la información que se obtiene del análisis, las características de la matriz y la precisión requerida son algunos de los aspectos a considerar.

Se han reportado diferentes métodos de detección de los compuestos presentes en bebidas alcohólicas. Además de caracterizar, en algunos casos estos métodos son capaces de cuantificar, estos pueden ser clasificados como:

- | | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  Métodos Físicos |  Biosensores, Electroodos
y otros detectores |
|  Métodos Químicos | |
|  Métodos Enzimáticos |  Métodos Instrumentales |

3.3.1 Métodos Físicos

Estos métodos son particularmente usados para cuantificar etanol. Muchos métodos de cuantificación utilizan una destilación de las muestras a evaluar, y explotan la densidad del destilado, teniendo en cuenta que en estas determinaciones la temperatura y el volumen son parámetros críticos durante el análisis. Poco a poco se ha obtenido un avance en los instrumentos utilizados como por ejemplo el uso de densímetros electrónicos.

3.3.2 Métodos Químicos

De la misma forma que los métodos físicos, un método químico se puede utilizar para cuantificar compuestos en las bebidas alcohólicas, por ejemplo, se puede utilizar la oxidación química para la determinación de alcohol, esta se lleva a cabo con un exceso de reactivo y una titulación del agente oxidante que no reaccionó. Este es un viejo método que todavía se utiliza sin embargo, la oxidación no es específica y muchas otras sustancias pueden reaccionar, debido a esto una destilación preventiva o una etapa de decoloración puede ser necesaria.

3.3.3 Métodos Enzimáticos

Se aplican ampliamente en el análisis de alimentos debido a su alta especificidad y su rentabilidad. Para la cuantificación de alcoholes (etanol, glicerol, sorbitol, xilitol, etc.), estos métodos generalmente se basan en la reducción del dinucleótido de adenin-nicotinamida (NAD) o el del dinucleótido de adenin-nicotinamida fosfato (NADP), por una reacción catalizada enzimáticamente que involucra el sustrato. La cantidad del nucleótido (NAD o NADP) reducido, es estequiométricamente proporcional al analito. El incremento en NAD o NADP es medido espectrofotométricamente con una absorbancia determinada.

3.3.4 Biosensores, Electroodos y otros detectores

El desarrollo de técnicas de inmovilización ha llevado a la producción de un gran número de biosensores. Incorporan una enzima específica y están equipados con un electrodo sensible a los productos químicos específicos. Comparado con otros métodos enzimáticos tradicionales, los biosensores, electrodos y otros detectores permiten un proceso de monitoreo continuo, que es particularmente interesante para la industria de la fermentación.

3.3.5 Métodos Instrumentales

Para detectar y cuantificar compuestos en bebidas alcohólicas, en gran medida se utilizan métodos instrumentales. Hay otros métodos que actualmente están abandonados y que aun son oficiales, por ejemplo la espectroscopia asociada a métodos enzimáticos es ampliamente utilizada para la cuantificación de alcohol, asimismo los métodos colorimétricos son utilizados para la cuantificación de aceite de fusel en las bebidas alcohólicas.

De las técnicas existentes para el análisis de compuestos en bebidas alcohólicas, las técnicas cromatográficas son las más importantes y, entre estas, la cromatografía de gases es la más versátil.¹³

3.4 CROMATOGRAFÍA DE GASES

3.4.1 Definición de Cromatografía

La definición oficial de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada por su siglas en inglés (IUPAC) *Cromatografía* es un método físico de separación, en el cual los componentes (analitos) de la muestra a ser separados están distribuidos entre dos fases una de las cuales es estacionaria (fase estacionaria) y la otra se mueve en una dirección definida (fase móvil).¹⁴

La mayoría de los procesos cromatográficos son nombrados de acuerdo al estado físico de su fase móvil. Así, en cromatografía de Gases (GC, por sus siglas en inglés), la fase móvil es un gas.

La cromatografía de gases es una de las técnicas más usadas en análisis cualitativos y cuantitativos. En GC, los componentes de una muestra vaporizada se separan como consecuencia de su distribución entre una fase móvil gaseosa y otra fase estacionaria líquida o sólida mantenida en una columna.

Al realizar una separación en cromatografía de gases, la muestra se inyecta en un cromatógrafo y se vaporiza. La elución en el interior de la columna se logra mediante el flujo de una fase móvil de gas inerte. A diferencia de muchos otros tipos de cromatografía, la fase móvil no interacciona con las moléculas del analito, si no que su única función es transportar el analito a lo largo de la columna. En la

cromatografía gas-líquido (GLC, por sus siglas en inglés) la fase móvil es un gas y la fase estacionaria es un líquido que recubre la pared interna de una columna.¹⁵

La cromatografía de Gases tiene importantes ventajas y desventajas que se resumen en la siguiente lista.¹⁴

VENTAJAS

- ☹ Análisis rápidos
- ☹ Eficiente, proporcionando alta resolución.
- ☹ Sensible, fácil de detectar ppm y a menudo ppb.
- ☹ No destructiva, lo que hace posible el acoplamiento en línea a un espectrómetro de masas.
- ☹ Alta precisión en análisis cuantitativos.
- ☹ Requiere muestras pequeñas, generalmente μLs .
- ☹ Barata y relativamente simple

DESVENTAJAS

- ☹ Limitado a muestras volátiles
- ☹ No es adecuado para muestras termolábiles
- ☹ Requiere etapas previas de preparación de muestra
- ☹ Requiere espectroscopia, usualmente espectrometría de masas para confirmar la identidad de un pico.

3.4.2 Instrumentación

En la Figura 3.3 se muestra un diagrama de los componentes básicos de un instrumento de cromatografía de gases (cromatógrafo de gases) y se describen brevemente en esta sección.

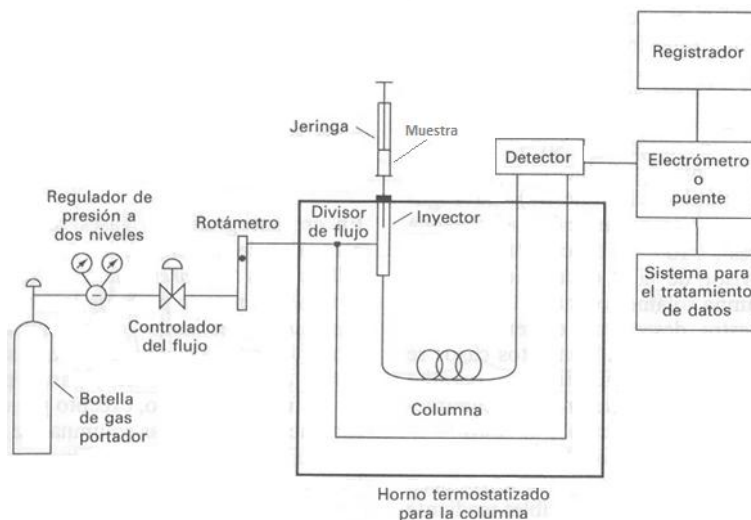


Figura 3.3. Diagrama de un cromatógrafo de gases típico.

En un equipo cromatográfico, los registradores gráficos ó integradores son los encargados de mostrar la respuesta de un detector en función del tiempo, normalmente esto es presentado en gráficas en forma de picos (cromatogramas).

Un cromatograma idealmente, se trata de picos gaussianos y cada pico corresponde a un componente de la muestra original. El integrador (o el software de control) calcula el área correspondiente a cada pico, la cual es proporcional a la cantidad de analito.¹⁶

3.4.3 Gas Acarreador

El gas de la fase móvil en cromatografía de gases se llama gas portador o gas acarreador. El helio y el hidrogeno son los gases más utilizados; pero también se usan gases como el argón y el nitrógeno. Se requieren reguladores de presión, calibradores y medidores de flujo para controlar la velocidad de flujo del gas.¹⁵ El gas acarreador arrastra la muestra vaporizada desde el inyector a la columna.

3.4.4 Sistema de Inyección de Muestras

Para que la columna sea eficiente se requiere que la muestra suministrada al equipo sea de un tamaño adecuado. En cromatografía de gases, los líquidos se inyectan mediante una microjeringa que generalmente es de 10 μL , los gases se

suelen inyectar con una jeringa hermética a gases.¹⁷ Las muestras solidas se manejan mejor mediante su disolución en un disolvente apropiado, y usando una microjeringa para su posterior inyección.¹⁴

En la Figura 3.4 se muestra un diagrama de los componentes básicos de una microjeringa y de una jeringa para gases, ambas utilizadas para inyectar los analitos de interés en un cromatógrafo de gases.

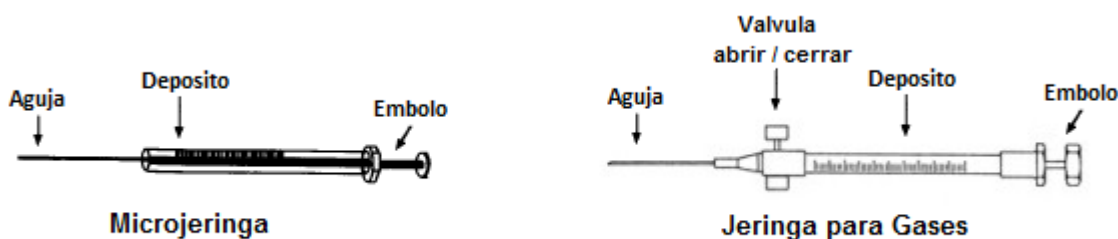


Figura 3.4. Diagrama de los componentes básicos de una microjeringa y una jeringa para gases utilizada para GC.

Para una columna capilar, se requiere una inyección con una pequeña cantidad de la muestra, por lo que suele ser necesario elegir entre distintos modos de inyección, a fin de introducir una fracción pequeña y conocida (1:100 a 1:500) de la muestra inyectada. Dentro de estos se puede mencionar el modo de inyección *Split* o *Splitless* e inyección *cold-on-column*.

Inyección con división (*Split Injection*) es la más antigua, simple y fácil técnica de inyección para introducir la muestra en la columna. Esto debido a que una pequeña fracción del vapor (1–2 %) entra en la columna cromatográfica, mientras que la mayor parte se desecha pasando a través de la válvula de purga.

Una inyección sin división (*Splitless Injection*) es la mejor forma para inyectar a niveles traza los analitos presentes en la muestra. Lo anterior se debe a que durante un tiempo determinado toda la fracción del vapor entra en la columna, posteriormente la válvula de purga se abre, desechando el resto de los compuestos volatilizados.

En ambos casos el inyector está provisto de un inserto de vidrio silanizado (liner) a cierta temperatura y una septa que está hecha de un material resistente a altas temperaturas. El inyector debe permanecer a una temperatura controlada,

por lo general caliente lo cual provoca que los productos de descomposición y los componentes no volátiles se acumulen en el liner.

Por otro lado en una inyección cold on-column, la muestra se inyecta líquida directamente a la columna sin pasar por un inyector caliente, este sistema no cuenta con un liner ni un septo como en el caso anterior. En este modo de inyección principalmente se usan muestras térmicamente lábiles, y es mejor que las inyecciones con o sin división de flujo en el análisis cuantitativo ¹⁷.

En la figura 3.5 se muestra un diagrama que muestra los tres modos de inyección antes mencionados. (Split, Splitless y cold on-column)

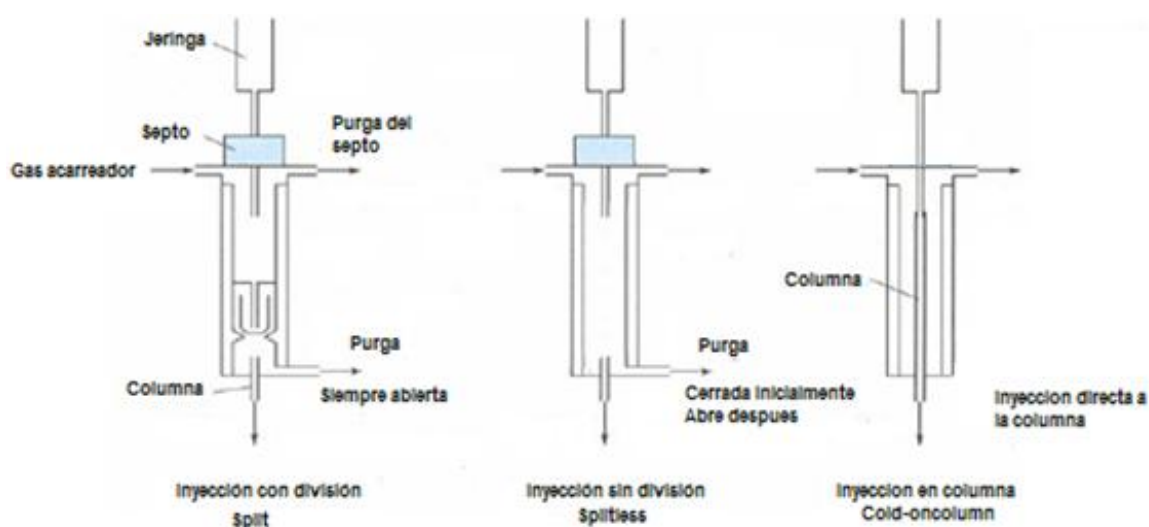
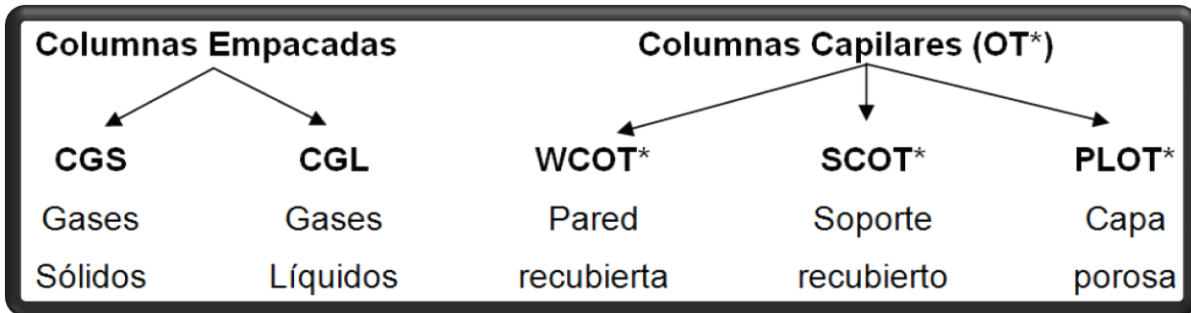


Figura 3.5. Diagrama de los tres modos de inyección más frecuentes; Split, Splitless y cold on-column.

3.4.5 Columna y Horno

Se dice que la columna es el corazón de un cromatógrafo, ya que es el lugar donde ocurre la separación. Las columnas utilizadas en cromatografía de gases se pueden clasificar en:



*OT: Tubo abierto por sus siglas en ingles.

Figura 3.6. Clasificación de columnas utilizadas en cromatografía de gases.

En un inicio, los trabajos en cromatografía de gases se realizaban solamente en columnas empacadas. Después, cuando las columnas capilares fueron inventadas su uso se fue haciendo cada vez más común. Las columnas capilares fueron introducidas en 1959, pero no se utilizaron ampliamente hasta cerca de 1980. Estas, son simplemente columnas con una fina película de fase líquida que recubre el interior de la pared de silica fundida. Estas columnas son propiamente llamadas columnas capilares tubulares abiertas.¹⁴

La Figura 3.7 es un diagrama del corte transversal de una columna capilar. La fase estacionaria, la longitud, el diámetro interno y grosor de la fase en las columnas capilares, se elige dependiendo de las características del analito de interés.

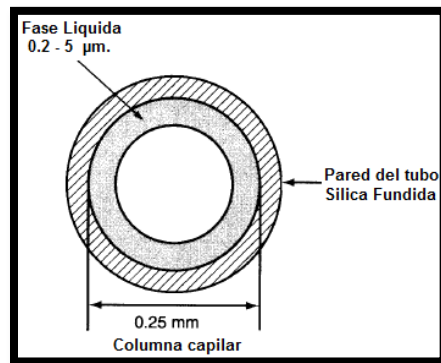


Figura 3.7. Diagrama del corte transversal de una columna capilar.¹⁴

El cromatógrafo de gases también está provisto de un horno el cual es una cavidad cuya función consiste en mantener la temperatura deseada, que dependiendo del programa, puede interesar que permanezca constante, o bien

varíe de una forma u otra con el tiempo. La columna capilar se encuentra dentro de esta cavidad.

3.4.6 Detectores

Con pocas excepciones, muchos de los detectores utilizados en GC fueron desarrollados específicamente para esta técnica, entre ellos:

Detector de Ionización de Llama (FID), Espectrómetro de Masas (MS), Detector de Conductividad Térmica (TCD), Detector de Captura de Electrones (ECD), Detector Ionización de Flama Alcalina (AFID), Detector Fotométrico de Flama. (FPD), son solo algunos de los detectores más comunes para CG. En total, hay probablemente más de 60 detectores que se han utilizado en esta técnica. Muchos de estos detectores se basan en la formación de iones por un medio u otro, el Detector de Ionización de Flama se ha convertido en el más popular. En un detector FID, los analitos transportados por el efluente de la columna se queman en una pequeña llama de oxi-hidrógeno produciendo algunos iones en el proceso. Estos iones son recogidos y forman una pequeña corriente eléctrica que se convierte en la señal.¹⁴

Como se ha señalado anteriormente, GC es la técnica principal de análisis para la separación de compuestos volátiles. Se combinan velocidad de análisis, resolución, facilidad de manejo, excelentes resultados cuantitativos, y costos moderados. Desafortunadamente, los sistemas de GC por si solos no pueden confirmar la identidad o la estructura de cualquier pico.

Para solucionar este inconveniente, se desarrolló una técnica acoplada a la Cromatografía de Gases que permite la identificación y permite predecir la masa molecular de los analitos separados, se trata de la Cromatografía de Gases acoplada a la Espectrometría de Masas (GC-MS, por sus siglas en inglés).

3.4.7 Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (GC-MS)

El sistema acoplado GC-MS es uno de los sistemas más sensibles, es universal y se requiere sólo microgramos de muestra para proporcionar datos

tanto para la identificación y cuantificación de compuestos desconocidos (estructura, composición elemental, y el peso molecular).¹⁴ En la Figura 3.8 se observa un esquema de un sistema acoplado GC-MS.

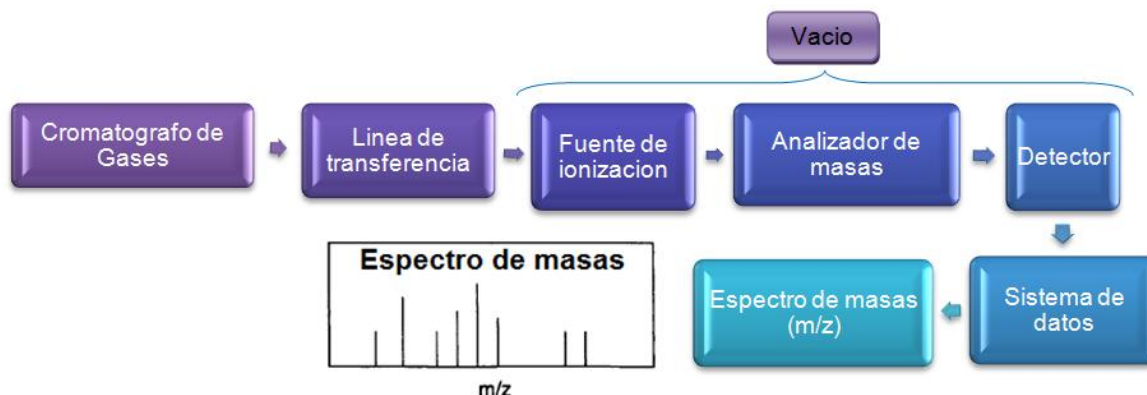


Figura 3.8. Esquema de sistema GC-MS.

En un sistema acoplado GC-MS, la muestra se introduce en forma de gas o líquido para ser inmediatamente vaporizada mediante el empleo de una técnica adecuada. Las moléculas gaseosas separadas mediante GC, pasan del final de la columna capilar contenida en el GC al espectrómetro de masas, a través de la línea de transferencia. Una vez introducidos a la cámara de vacío, los analitos primero pasan por una fuente de ionización. La fuente de ionización es calentada bajo vacío para que las muestras sean vaporizadas fácilmente y después ionizadas. La ionización se realiza normalmente mediante el impacto de un haz de electrones de alta energía (70 eV). Estos electrones de alta energía golpean las moléculas neutras del analito, causando ionización (pérdida de un electrón) y fragmentación. Después de la ionización, las partículas cargadas se repelen y se atraen por las lentes cargadas en el analizador de masas. Aquí las especies iónicas se separan por su relación de masa-carga (m/z) ya sea por campos magnéticos o eléctricos. Los analizadores de masas típicos para GC-MS son cuadrupolos o trampas de iones.

El analizador de masas cuadrupolar constará de cuatro barras hiperbólicas en ángulo recto el uno al otro. Una voltaje de corriente directa (CD) se aplica a todas las barras (varillas adyacentes tienen signos opuestos) y las señales de la voltaje se invierten rápidamente. Una radio frecuencia es aplicada también a las

cuatro barras. Dependiendo de la combinación de la radio frecuencia y los potenciales de corriente directa, iones de solo una relación m/z pasaran a través de las barras y llegaran al detector, iones con otra relación m/z golpearan las barras y serán destruidos. Después de la separación de los iones producidos, el detector amplifica la débil señal original alrededor de un millón de veces.

El espectro de masas es simplemente el gráfico de la abundancia de los iones en función de su relación m/z . Esta técnica puede ser utilizada para establecer el peso molecular y la estructura química de cada compuesto.^{14, 18}

3.5 MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN EN GC

En GC, la identificación de cada compuesto registrado como un pico en el cromatograma, se realiza mediante la inyección del estándar del o de los compuestos bajo las mismas condiciones que la muestra y se mide el tiempo de retención en esas condiciones. También se puede comprobar por adición del compuesto a la muestra e inyectándola nuevamente para apreciar al incremento de altura o área del pico correspondiente.

Un análisis cuantitativo puede realizarse mediante distintos métodos como: estándar interno, normalización de áreas, normalización de áreas con factores de respuesta, estándar externo, y adiciones patrón.¹²

3.5.1 Estándar Interno

En cromatografía cuantitativa la mayor precisión se consigue con el uso de patrones internos, debido a que se evitan incertidumbres que se introducen en la inyección de la muestra.

En este procedimiento se agrega a la solución estándar y a la muestra una cantidad exactamente medida de un estándar interno. Las características del estándar interno utilizado deberán ser:

- ☹ Debe eluir cerca de los picos de interés
- ☹ Debe estar bien resuelto con respecto a los picos de interés
- ☹ Debe ser químicamente similar a los analitos de interés y sin reaccionar con cualquiera de los componentes de muestra
- ☹ Como cualquier estándar, debe estar disponible en alta pureza

El estándar interno es agregado a la muestra aproximadamente a la misma concentración que los analitos de interés.¹⁴

3.5.2 Normalización de Áreas

Otro procedimiento que evita las incertidumbres asociadas con la inyección de la muestra es el método de normalización de área. Se requiere la elución completa de todos los componentes de la muestra. En el método de la normalización, se determinan las áreas de todos los picos eluidos; tras corregir esas áreas debido a las diferencias en la respuesta del detector a los distintos tipos de compuestos, la concentración del analito se calcula por la relación de su área con el área total de los picos.¹⁹

3.5.3 Normalización de Áreas con Factores de Respuesta

Se emplea para disminuir errores con respecto al método de normalización de área. Su metodología es muy similar a la normalización de área. Consiste en preparar disoluciones de la mezcla de analitos a distintas concentraciones, las cuales se inyectan para obtener los cromatogramas correspondientes, a partir de los cuales se obtienen las sumas de las áreas para cada uno de los analitos, los cuales se manejan como un total (100%). Se inyecta la muestra a cuantificar y el área del analito se relaciona con el total, el resultado será el por ciento del analito en la matriz. Una vez obtenidos estos resultados se obtienen los factores de respuesta realizando la relación

$$\frac{\text{Área del compuesto}}{\text{Peso del compuesto}} = \text{Factor de respuesta.}$$

Éste ha de tratarse como el área modificada a partir de la cual se obtiene el por ciento real del analito en la muestra.¹²

3.5.4 Estándar Externo

Este método consiste en la comparación de las señales de la muestra con un conjunto de señales que ofrecen individualmente "muestras de calibración", (disoluciones patrón). Los estándares de diferente concentración del analito han sido preparados artificialmente para que su matriz sea semejante a la de la muestra real. Se someten al proceso analítico las muestras de calibración y la muestra problema de forma independiente.

El conjunto de las señales de calibrado permite establecer una relación inequívoca entre la señal y la concentración de analito, que comúnmente se denomina "recta de calibrado" y que idealmente es una relación lineal señal-concentración en el intervalo dado de concentraciones. La concentración de analito en la muestra se consigue por interpolación en dicha recta.¹²

3.5.5 Adiciones Patrón

El método de adición patrón consiste en añadir cantidades conocidas de analito a la muestra problema, para que de esta manera aumente la concentración del analito en una cantidad conocida. A partir del aumento de la señal se deduce cuanto analito había en la muestra problema. Este método requiere una respuesta lineal frente al analito.

La adición patrón es especialmente apropiada cuando la composición de una muestra es desconocida o compleja y afecta a la señal analítica.¹⁷

3.6 MÉTODOS DE PREPARACIÓN DE MUESTRA

Las muestras son a menudo demasiado complejas o están demasiado diluidas para ser analizadas directamente por GC. Una extracción preliminar, limpieza de la muestra, concentración y/o derivatización, son métodos de preparación de muestra necesarios en un análisis de GC, ya que si no se realiza,

aunque se cuente con un método de separación y detección adecuado no se obtendrá un resultado válido.

El concepto básico de un método de preparación de la muestra es la de convertir una matriz real en una muestra con un formato que es adecuado para el análisis de una separación u otra técnica analítica. En la actualidad hay una creciente preocupación pública sobre la protección de nuestro medio ambiente, en general los químicos, incluidos los químicos analíticos, están obligados a cambiar sus actividades, de tal manera que se lleven a cabo de una manera ambientalmente segura.

Esto se puede lograr mediante el empleo de una amplia gama de técnicas: Microextracción en fase sólida (SPME, por sus siglas en inglés), análisis de vapor confinado (espacio de cabeza por sus siglas en inglés HS), extracción con barra magnética (SBSE, por sus siglas en inglés), extracción en fase sólida, derivatización, extracción con fluidos supercríticos, extracción con ultrasonido, etc.

Muchos de los métodos tradicionales de preparación de muestra están todavía en uso, con frecuencia involucran la generación de grandes cantidades de contaminantes, es el caso de Soxhlet, involucra extracción con grandes cantidades de disolventes orgánicos, a menudo seguido por limpieza y los respectivos pasos de preconcentración. Estos métodos toman mucho tiempo, tienen una mano de obra costosa, y requieren de una cantidad generosa de disolvente. Una preocupación sobre los disolventes es que normalmente son tóxicos y su impacto sobre el medio ambiente ha dado lugar al desarrollo de métodos de extracción más limpios.

La preparación de muestra ha avanzado y en la actualidad la tendencia es la miniaturización de las técnicas. Es el caso de la Microextracción en Fase Sólida (SPME), ya que es un método de preparación de muestras para análisis en GC, el cual es rápido, sensible, sin disolventes o con una cantidad mínima de ellos y es económico.

3.6.1 Microextracción en Fase Sólida (SPME)

Microextracción en Fase Sólida (SPME) es una alternativa a las técnicas convencionales de extracción de compuestos, ya que es rápida y no es necesario utilizar disolventes. Se basa en la extracción de los analitos de la matriz de la muestra mediante una fibra de sílice fundida que está recubierta de un sorbente (en la mayoría de los casos es polimérico), seguida de la desorción de los analitos mediante temperatura o un disolvente orgánico.

SPME es un método sencillo de extracción de compuestos orgánicos volátiles y semi-volátiles en muestras líquidas, aire, o incluso sólidos sin utilizar disolventes. El componente clave es esta fibra de sílice fundida recubierta de una fina película polimérica, 10 a 100 μm de espesor.¹⁷ En estas fibras se adsorben y/o se absorben los analitos.

Actualmente existen revestimientos de fibra diferentes, estos están disponibles comercialmente y ofrecen una gama de solubilidades de analito y polaridades, algunas de las fases que podemos mencionar:

- | | |
|-------------------------------------------------|--------------------------------|
| ☹ Polidimetilsiloxano (PDMS) | ☹ Carboxen/Polidimetilsiloxano |
| ☹ Poliacrilato (PA) | ☹ Polietilén Glicol (PEG) |
| ☹ Polidimetilsiloxano/Divinilbenceno (PDMS/DVB) | ☹ Carbowax/Divinilbenceno |
| | ☹ etc. |

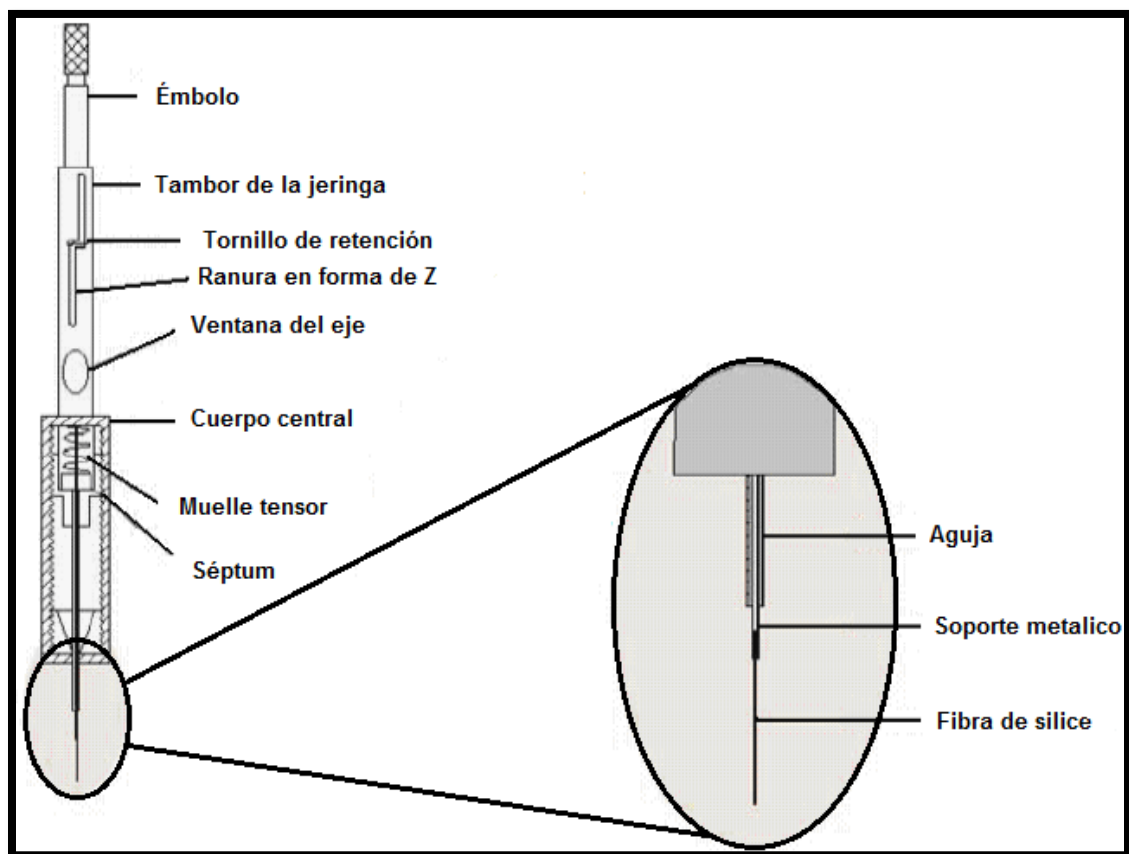


Figura 3.9. Diagrama de los componentes básicos de una fibra para SPME.

La Figura 3.9 muestra el esquema de un holder (embolo de la jeringa), del cual sobresale el soporte metálico de una fibra para SPME. La fibra emerge del soporte metálico y se mete dentro de él para protegerla cuando no está en uso.

Cuando se realiza SPME podemos utilizar distintas modalidades de extracción, de forma directa (Inmersión) y mediante un equilibrio entre la fase líquida y la fase gaseosa (Head Space).

3.6.2 Head Space (HS)

Con la denominada técnica llamada espacio de cabeza (en inglés Head-Space HS), se pueden determinar indirectamente compuestos volátiles y semi-volátiles en muestras líquidas y sólidas, mediante el análisis de la fase gaseosa que está en equilibrio con la muestra dentro de un sistema cerrado.

Generalmente los métodos de extracción son cada vez más selectivos y más fácilmente combinados con los métodos de separación. Se ha reportado que la combinación de SPME en modo Head Space (SPME-HS), junto con GC es un método efectivo para la clasificación de cervezas.²⁰

La técnica SPME-HS se caracteriza por extraer y/o concentrar los compuestos volátiles y semi-volátiles presentes en una matriz, lo cual convierte este método de preparación de muestra en una excelente alternativa comparado con algunas de las técnicas clásicas utilizadas, presentando algunas ventajas y desventajas tal y como se enlista a continuación²¹:

Ventajas

- ☹ Gran simplicidad
- ☹ Bajo costo
- ☹ Utiliza pequeños volúmenes de muestra
- ☹ No necesita disolventes orgánicos
- ☹ Útil para todo tipo de muestras (líquidas y sólidas)
- ☹ Permite la concentración de compuestos volátiles y semi-volátiles y su límite de detección puede ser muy bajo del orden de ppt, lo que demuestra la sensibilidad de esta técnica

Desventajas

- ☹ Limitada capacidad de las fibras: debido a que contienen una cantidad de recubrimiento muy pequeña
- ☹ La formación de burbujas de gas en la superficie de la fibra puede afectar a la tasa de transferencia de masa
- ☹ Los recubrimientos de las fibras suelen ser muy delicados y se dañan fácilmente

La combinación de estas técnicas no es de uso exclusivo para el área de análisis de bebidas alcohólicas, sino que es ampliamente utilizada en el campo de la cromatografía.

En la Figura 3.10 se muestra esquemáticamente la técnica general para la combinación de estas técnicas (SPME-HS-GC). Esta técnica consiste en colocar la muestra en un vial cerrado, posteriormente se perfora el septum del vial con la

cubierta metálica de la fibra, y de esta manera se puede exponer la fase polimérica de la fibra al Head Space. Transcurrido un determinado tiempo para la extracción de los analitos, se retira el material adsorbente introduciéndolo en su cubierta metálica, y se saca del vial. Finalmente se perfora con la cubierta metálica el septum del inyector del cromatógrafo de gases y la fibra se expone dentro del inyector, esto para desorber los analitos térmicamente.

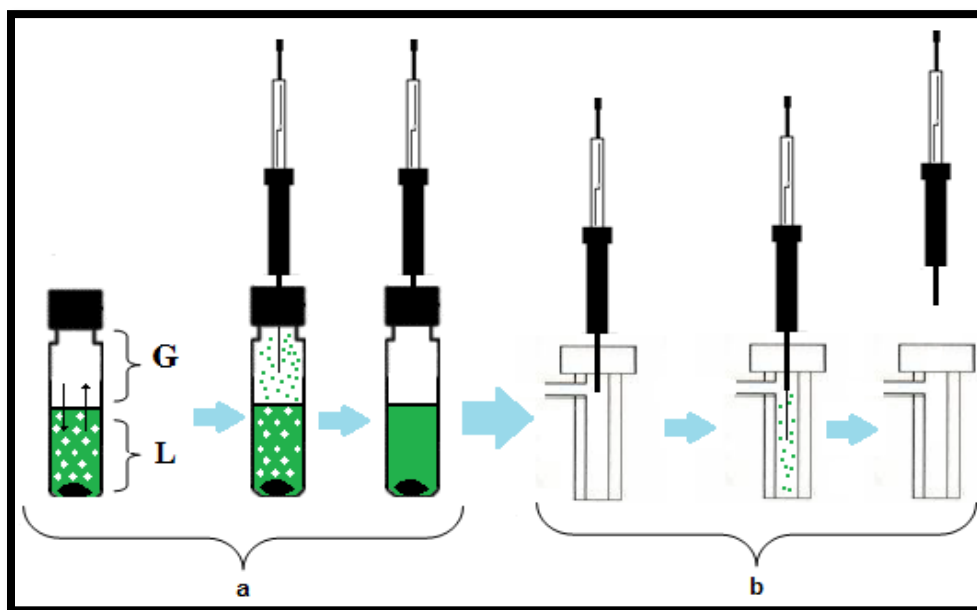


Figura 3.10. Esquema del proceso (a) SPME modo Head Space; (b) Desorción térmica en GC.

En general la aplicación de Head Space combinado con SPME al análisis de cualquier compuesto requiere conocer bien la técnica: los tipos de fibras, los distintos factores que afectan a la misma, así como su posible acoplamiento a los diferentes instrumentos de análisis existentes o automatización. Se ha utilizado en análisis clínico, forense, alimentario, medioambiental, biomédico, etc. con gran éxito, aunque su área de aplicación por excelencia sigue siendo el análisis medio ambiental.²²

3.7 EVALUACIÓN SENSORIAL

A través de nuestros sentidos somos capaces de detectar y diferenciar la riqueza de nuestro medio ambiente y todos sus detalles. Algunos estímulos

evocan sensaciones placenteras, mientras que otros son desagradables. Por lo tanto, nuestras sensaciones están marcadas por sentimientos de placer, indiferencia o desagrado.

La Evaluación Sensorial es la disciplina científica usada para medir, analizar e interpretar las reacciones humanas ante las características de los alimentos y materiales, así como el modo en que éstas son percibidas por los sentidos de la vista, olfato, gusto, tacto y oído.

Es posible analizar estadísticamente los resultados obtenidos de una evaluación sensorial, gracias al empleo de métodos de prueba científicos. El instrumento utilizado en la evaluación sensorial son jueces, para las pruebas analíticas en general los jueces son entrenados para hacer una evaluación a través de la percepción por medio de los sentidos, ^{23, 24} las únicas excepciones son el Perfil Flash y el Perfil de Libre Elección.

Cuando un estímulo alcanza los órganos sensoriales es convertido en una señal nerviosa que viaja hasta el cerebro. Debido a experiencias previas en la memoria, el cerebro puede interpretar, organizar e integrar la sensación recibida en una percepción obteniéndose una respuesta

En un análisis sensorial existen dos tipos de perfiles:

Perfiles Convencionales

- ☹ Perfil de Sabor
- ☹ Perfil de Textura
- ☹ Análisis Spectrum
- ☹ Análisis Descriptivo Cuantitativo (QDA, por sus siglas en inglés)

Perfiles Rápidos

- ☹ Perfil de Libre Elección (FCP, por sus siglas en inglés)
- ☹ Perfil Flash
- ☹ Perfil Ultra Flash

En general el análisis sensorial con perfiles convencionales resulta ser una herramienta que brinda información robusta y por lo regular se recurre al uso de panelistas capacitados previamente (entrenados). Estos jueces utilizan un vocabulario fijo de términos descriptivos para juzgar los productos. En la actualidad se han reportado estudios los cuales hacen comparaciones entre

jueces entrenados y consumidores o jueces no entrenados, se ha concluido que ambos grupos dan resultados similares.²⁵

En la Tabla 3.4 se muestran las diferencias entre un perfil convencional (QDA) y un perfil rápido (FCP).

Tabla 3.4. Características, ventajas y desventajas de un perfil convencional (QDA) frente a un perfil rápido (FCP).

	Características	Ventajas	Desventajas
PERFIL CONVENCIONAL (QDA)	<ul style="list-style-type: none"> -Vocabulario común -Entrenamiento jueces -Uso de referencias -ACP y/o Análisis de Varianza 	<ul style="list-style-type: none"> -Evaluación similar en jueces -Descripción profunda -Tienden a diferenciar en textura y sabor 	<ul style="list-style-type: none"> -Tiempo (24 sesiones) -Mayor consumo muestra -Mayor costo
PERFIL RAPIDO (Perfil de Libre Elección)	<ul style="list-style-type: none"> -Elaboración individual de términos -Jueces NO entrenados -Análisis Procrustes Generalizado (PGA) 	<ul style="list-style-type: none"> -No requiere entrenamiento ni uso de referencias -Menor tiempo (5-7 sesiones) -Menor costo -Descripción menor 	<ul style="list-style-type: none"> -Las diferencias tienden ser en aspecto, olor

El perfil de libre elección es un perfil rápido en el cual los panelistas no difieren en sus percepciones, sino simplemente en la forma en que los describen. En el FCP los jueces son libres de utilizar sus propios atributos, para juzgar los productos. Así pues, entre los jueces no hay acuerdo acerca de los atributos.

Como resultado, es imposible hacer un promedio de los datos individuales, ya que no tiene sentido para combinar diferentes atributos. Los datos experimentales de un FCP deben ser analizados por métodos de diferencias individuales, Análisis de Procrustes Generalizado (GPA, por sus siglas en inglés) es uno de ellos.²⁶

Uno de los campos en los que puede aplicarse GPA es el estudio de las relaciones instrumentales-sensoriales. La idea detrás de estas relaciones es que las percepciones sensoriales tienen contrapartes químicas/físicas de la sustancia objeto de la investigación.²⁶

En el GPA se hacen transformaciones matemáticas (traslación, rotación/reflexión y escalado) las cuales revelan interrelaciones entre las muestras, finalmente este método busca agrupar elementos (o variables) tratando de lograr la máxima homogeneidad y reducir las diferencias entre los grupos.

IV. DESARROLLO EXPERIMENTAL

4.1 APARATOS

- Cromatógrafo de Gases HP 5890, con detector FID e inyector Split/Splitless
- Cromatógrafo de Gases Shimadzu GC-2014 con detector FID e inyector Split/Splitless
- Cromatógrafo de Gases HP 5890 acoplado a un detector selectivo de Masas HP 5971 Series
- Baño de ultrasonido D-50 Branson Instruments
- Centrifugadora International Boston USA, Vortex (Thermolyne)
- Balanza Analítica (Satorius)

4.2 MATERIALES

- Columna capilar de Silica Fundida Carbowax / BTR (PEG) 60m x 0.25mm x 0.5 μ m (QUADREX, USA)
- Columna capilar ZB-5 5 % fenil 95% dimetilpolisiloxano 30m x 0.25mm x 0.25 μ m (ZEBRON Phenomex, USA)
- Fibras Poliacrilato 85 μ m y PDMS / DVB 65 μ m (SUPELCO, Bellefonte, PA) y soporte para fibras para MEFS (SUPELCO, USA)
- Jeringa Hamilton (USA) (10, 50 y 250 μ L)
- Barra magnética 1cm y 2.5cm
- Material de vidrio en general: pipetas Pasteur, matraz aforado (1, 2, 5, 10, 25 mL), matraz erlenmeyer (25 mL), pipeta graduada (1 y 2 mL), pipeta volumétrica (1 y 4 mL) probetas (10, 50 y 100 mL), vasos de precipitados (10, 30, 50, 100, 150 y 250 mL), viales (8, 11 y 15 mL)
- Material necesario para la evaluación sensorial de las muestras: copas de vidrio, material plástico: vasos del N°8, platos pasteleros, charolas plásticas, vasos de espectoración, servilletas
- Laboratorio de Evaluación Sensorial

4.3 REACTIVOS Y ESTÁNDARES.

Reactivos: Agua desionizada, Acido Silícico (BIO-RAD, USA), Ácido Clorhídrico 37.2% pureza (J.T. Baker, USA), Acetonitrilo 99.8% pureza (Prolab), Diclorometano 99.9% pureza (J.T. Baker, USA) y Acetona Pestanal para análisis de residuos (Fluka Riedel-Haën, Alemania).

Estándares: Metanol 99.95% pureza (J.T. Baker, USA), Alcohol iso-amilico 99.8% pureza (J.T. Baker, USA), Propanol 99% pureza (E. Merck, Alemania), Alcohol Bencílico 99% pureza (E. Merck, Alemania), 2-Butanol 99.5% pureza (Aldrich Chemical, Alemania), Nonanol (Eastman Organic Chemicals, USA), Alcohol Feniletílico (Amco Internacional, México), Hexanol (J.T. Baker, USA).

4.4 MUESTRAS

Tabla 4.1. Características de las muestras de cerveza empleadas para la cuantificación de Alcoholes Superiores, Compuestos Volátiles y Evaluación sensorial. (1) Cromatográfico, (2) Sensorial. * Generación de Descriptores en Evaluación Sensorial.

N° de Muestra	Tipo		Nombre de Muestra	% Etanol (v/v)	Análisis **
1	Lager	Pilsener	Corona Extra	4.5 %	1, 2, *
2	Lager	Pilsener	Bohemia	5.3 %	*
3	Lager	Viena	Victoria	4.0 %	1, 2, *
4	Lager	Viena	Dos Equis Ámbar	4.7 %	*
5	Lager	Dortmunder	Tecate	4.5 %	1, 2, *
6	Lager	Múnich	Negra Modelo	5.3 %	1, 2, *
7	Lager	Múnich	León	4.5 %	*
8	Ale	Pale Ale	Minerva Pale Ale	5.0 %	1, 2, *
9	Ale	Stout	Minerva Stout Imperial	6.0 %	1, 2, *

4.5 METODOLOGÍA ANALÍTICA

4.5.1 Caracterización y Cuantificación de Alcoholes por GC-FID

La cuantificación de alcoholes superiores y metanol se realizó por Cromatografía de Gases utilizando un Detector de Ionización de Llama (GC-FID), mediante la determinación de Factores de Respuesta relativos. Este procedimiento fue desarrollado previamente en un trabajo realizado en el laboratorio.²⁷

4.5.1.1 Determinación de Factores de Respuesta

El método utilizado fue modificado del reportado por Reyes D. (2006).²⁷ Se pesan por separado 100 mg de los estándares de los alcoholes: metanol, propanol, alcohol isoamílico, hexanol, nonanol, fenil etanol y alcohol bencílico, se disuelven y aforan a 10 mL con acetona cada uno obteniendo una solución de (10 000 ppm). A partir de esta solución se prepara una disolución para llegar a una concentración de 1 mg/mL (1000 ppm) de cada uno de los estándares, posteriormente se prepara una solución estándar a partir de estas disoluciones, tomando 1 mL de cada una de las disoluciones de metanol y alcoholes superiores y 0.5 mL de nonanol y alcohol bencílico como estándares internos, se afora a 10 mL con acetona, (la concentración final del metanol y los alcoholes superiores ha de ser de 100 µg/ mL, mientras que las del nonanol y alcohol bencílico será de 50 µg/mL). A 2 mL de esta mezcla se le adicionan 0.5 g de ácido silícico previamente lavado (para eliminar impurezas); se agita vigorosamente en vortex durante 2 min y se dejan separar las fases. La fase líquida es transferida a un matraz aforado de 5 mL mientras que la fase sólida se le adicionan 1.5 mL de acetona, se agita nuevamente durante 2 min y se vuelven a separar las fases. La fase líquida se junta con la anterior en el matraz aforado de 5 mL. Se repite una vez más la operación de lavado con acetona. La fase líquida se lleva al aforo con acetona (la concentración final del metanol y los alcoholes superiores es de 40 µg/ mL, mientras que las del nonanol y alcohol bencílico es de 20 µg/mL), se inyecta 1 µL en el GC-FID y el análisis se realiza por triplicado. Los Factores de Respuesta del

metanol, propanol, isobutanol, alcohol isoamílico y hexanol se calculan respecto al estándar interno nonanol, mientras que el Factor de Respuesta del fenil etanol se calcula con respecto al estándar interno alcohol bencílico.

4.5.1.2 Lavado de ácido silícico

En un vaso de precipitados de 500 mL se colocan 100 g de ácido silícico y 200 mL de solución de HCl al 1.0%; se agita vigorosamente durante 5 min y se deja separar las fases. La fase líquida se desecha y el sólido se lava 4 veces con 200 mL de agua destilada y una con 100 mL de acetona, desechando la fase líquida cada vez. El sólido húmedo se seca a 130 °C. Finalmente el ácido silícico se transfiere a un vial de vidrio para su posterior uso.²⁷

4.5.1.3 Determinación de alcoholes en Cerveza

En un matraz de 2 mL se transfiere 1 mL de muestra (desgasificada 20 min en un baño ultrasónico), nonanol y alcohol bencílico como estándares internos (EI) en tal cantidad que su concentración final sea de 50 µg/mL, se lleva al aforo con la muestra de cerveza y se vierte en un vial de 8 mL. A estos 2 mL se le adicionan 0.5 g de ácido silícico previamente lavado y se procede de la misma forma que en la determinación de Factores de Respuesta, con la diferencia de que antes de inyectar al cromatógrafo de gases se centrifugara durante 15 min a 3600 rpm para sedimentar los compuestos no solubles y eliminar la turbidez, se inyecta 1 µL en el GC-FID y el análisis se realiza por triplicado.

La cuantificación de alcoholes se realizó utilizando los Factores de Respuesta para cada uno de ellos, se reporta la concentración en mg por 100 mL de alcohol anhidro.

4.5.1.4 Condiciones Cromatográficas

Cromatógrafo de Gases HP 5890, con detector FID e inyector Split/Splitless y una columna capilar de silica fundida Carbowax / BTR (PEG) (60m x 0.25mm x 0.5µm) (QUADREX, USA). Con el siguiente programa de temperatura: temperatura del inyector 210 °C en modo Splitless (1 min), temperatura del

detector 220 °C. Programa de temperatura: Temperatura inicial 40 °C durante 10 min, incrementándose 10 °C/min hasta 220 °C, manteniéndose durante 5 min. Gas acarreador: Hidrógeno (1 mL/min).

4.5.1.5 Caracterización de alcoholes superiores y metanol por SPME-HS-GC-FID

Se pesan por separado 100 mg de los estándares de los alcoholes: metanol, propanol, alcohol isoamílico, hexanol, nonanol, fenil etanol y alcohol bencílico, y se disuelven y aforan a 10 mL con agua desionizada cada uno obteniendo una solución de (10 000 ppm). A partir de esta solución se prepara una dilución para llegar a una concentración de 1 mg/mL (1000 ppm) de cada uno de los estándares. Se preparó una solución de EtOH al 5% en agua que contenía una mezcla de alcoholes superiores 100 ppm y los respectivos estándares internos 50 ppm.

En un vial de 11 mL se agregan 4 mL de la solución de estándares y EtOH al 5% en agua (se sella con teflón y tapón horadado con septum), se coloca en una parrilla con agitación magnética a 1200 rpm y un baño maría a 60°C, posteriormente la aguja de la fibra perfora el septum del vial y se expone la fibra al head space de la solución durante 60 min. Una vez transcurrido este tiempo se retrae la fibra a la aguja y se retira del vial introduciéndose en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases, desorbiendo térmicamente los analitos por 10 min. Este procedimiento se realiza por triplicado para cada muestra de cerveza.

4.5.1.6 Confirmación de metanol en muestras por SPME-HS-GC-FID

En un vial de 11 mL se agregan 4 mL de la muestra de cerveza (se sella con teflón y tapón horadado con septum), se coloca en una parrilla con agitación magnética a 1200 rpm y un baño maría a 60°C, posteriormente la aguja de la fibra perfora el septum del vial y se expone la fibra al head space de la solución durante 60 min. Una vez transcurrido este tiempo se retrae la fibra a la aguja y se retira del vial introduciéndose en el puerto de inyección del GC-FID, desorbiendo térmicamente los analitos por 10 min y el análisis se realiza por triplicado.

4.5.1.7 Condiciones Cromatográficas

Cromatógrafo de Gases Shimadzu GC-2014 con detector FID e inyector Split/Splitless, y una columna capilar de silica fundida Carbowax / BTR (PEG) (60m x 0.25mm x 0.5 μ m) (QUADREX, USA). Con el siguiente programa de temperatura: temperatura del inyector 210 °C Splitless (1 min), temperatura del detector 220 °C. Programa de temperatura: temperatura inicial 40 °C durante 10 min, incrementándose 10 °C/min hasta 220 °C, manteniéndose durante 5 min. Gas acarreador: Hidrógeno (1 mL/min).

4.5.2 Caracterización de compuestos volátiles y semivolátiles por SPME-HS-GC-EM

En un vial de 11 mL se pesa la cantidad necesaria de NaCl para tener 5 mL de muestra de cerveza al 50% de sal. Se agregan 5 mL de cerveza (se sella con teflón y tapón horadado con septum), se coloca en una parrilla con agitación magnética a 1200 rpm y un baño maría a 50°C, posteriormente la aguja de la fibra perfora el septum del vial y se expone la fibra al head space de la solución durante 30 min. Una vez transcurrido este tiempo se retrae la fibra a la aguja y se retira del vial introduciéndose en el puerto de inyección del GC-EM, desorbiendo térmicamente los analitos por 15 min y se realiza el análisis por triplicado.

4.5.2.1 Condiciones Cromatográficas

Cromatógrafo de Gases HP 5890 con inyector Split/Splitless y acoplado a un detector selectivo de Masas HP 5971 Series, y una columna capilar ZB-5 (ZEBRON Phenomex, USA) 5 % fenil 95% dimetilpolisiloxano 30m x 0.25mm x 0.25 μ m. Con el siguiente programa de temperatura: temperatura del inyector 250°C Splitless (1 min). Temperatura de la línea de transferencia 280°, He como gas acarreador (1 mL/min), fuente de ionización 230°C, energía de ionización 70 eV, temperatura del cuadrupolo 150°C. Programa de temperatura: temperatura inicial fue 40°C durante 1 min, incrementándose 10°C/min hasta 140°C, con otro incremento de temperatura de 7°C/min hasta 300°C manteniéndose durante 5 min.

4.6 METODOLOGÍA SENSORIAL

Se realizó un Perfil de Libre Elección (FCP), en el cual un grupo de 12 sujetos no entrenados (8 mujeres y 4 hombres de edades comprendidas entre 21 a 25 años) participaron en este estudio. Ellos eran consumidores de cerveza, pero no tenía ningún entrenamiento formal o experiencia en la descripción de la cerveza. La Evaluación Sensorial se llevo a cabo en dos etapas: Generación de descriptores y Evaluación de las muestras, estas etapas fueron aplicadas en nueve sesiones consecutivas (Figura 4.1).



Figura 4.1. Jueces evaluando muestras de cerveza.

4.6.1 Generación de descriptores.

Un panel de 12 jueces no entrenados haciendo uso del software FIZZ versión 2.3, modulo Acquisition y judge, by BIOSYSTEMS, 2007, Courtenon, France y sus respectivas terminales, evaluaron nueve cervezas diferentes (7 Lager y 2 Ale). Las muestras utilizadas en esta etapa no fueron únicamente las cervezas evaluadas, es decir, se decidió agregar 3 muestras para que se generara el mayor número de descriptores posibles. A los jueces se les pidió describir detalladamente y con sus propias palabras el aspecto, olor sabor y las sensaciones producidas en cada una

de las muestras. Para tal fin, se tomaron 10 mL de muestra y se colocaron en una copa de cristal, posteriormente la copa fue cubierta con una tapa de vidrio con el fin de reducir la desgasificación al transcurrir el tiempo. Las muestras fueron codificadas previamente con números aleatorios. La evaluación se llevó a cabo en 3 sesiones consecutivas, se describieron tres cervezas en cada sesión. La evaluación de cada una de las muestras duro 15–20 minutos descansando 5 minutos entre una muestra y otra.

Se elaboraron cuestionarios personalizados para cada juez, a partir de los resultados generados en la descripción de las muestras. Estos establecieron que atributos de aspecto olor sabor y sensaciones serian evaluados por cada juez. Durante todas las sesiones, al momento de la evaluación, se procuró mantener las muestras una temperatura constante de 13-15 °C aproximadamente.

4.6.2 Evaluación de las muestras

Una vez generados los descriptores, se procedió a evaluar las muestras. Utilizando el software FIZZ y los cuestionarios elaborados en la etapa anterior, el panel de 12 jueces no entrenados, evaluó el aspecto, olor, sabor y las sensaciones de las 6 muestras utilizando una escala de 0-15, donde cero representa ausencia del atributo y 15 es el máximo a evaluar. Las muestras fueron presentadas del mismo modo que en la generación de los descriptores. La prueba se realizo por duplicado, evaluando 2 muestras por sesión, descansando 5 minutos entre una muestra y otra. Durante todas las sesiones, al momento de la evaluación, se procuro mantener las muestras una temperatura constante de 13-15 °C aproximadamente.

4.6.3 Análisis de Datos

Los datos derivados del Perfil de Libre Elección para cada uno de los evaluadores, fueron ingresados a la herramienta de análisis estadístico XLSTAT versión de prueba 2013.2 para realizar un Análisis Procrustes Generalizado (GPA).

El GPA se usó para correlacionar el conjunto de los descriptores sensoriales y de esta manera agrupar las muestras en Lager y Ale con respecto a un componente.

Esto se logró identificando para cada evaluador, que atributos se correlacionaron positiva o negativamente con el componentes 1 (F1). Para considerar estos resultados estadísticamente significativos, se selecciono un valor crítico para el coeficiente de correlación de Pearson (r), usando α de 0.05 y una muestra de tamaño $N-2$ de donde N es el número de casos evaluados. El valor r se tomo como referencia para seleccionar del GPA los atributos que tuvieron peso en la clasificación de las muestras.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.1 CARACTERIZACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE METANOL Y ALCOHOLES SUPERIORES

5.1.1 Modo de Inyección y cálculo de Factores de Respuesta relativos

Modo de Inyección. Para la cuantificación de metanol y alcoholes superiores en cerveza se evaluaron 6 muestras, mediante dos metodologías distintas. Antes de iniciar el análisis en la muestras se probaron distintos modos de inyección Split/Splitless.

En la Figura 5.1 se muestra la comparación de dos cromatogramas del análisis de los alcoholes superiores y metanol en una solución estándar inyectada en modo Split (negro) y Splitless (azul).

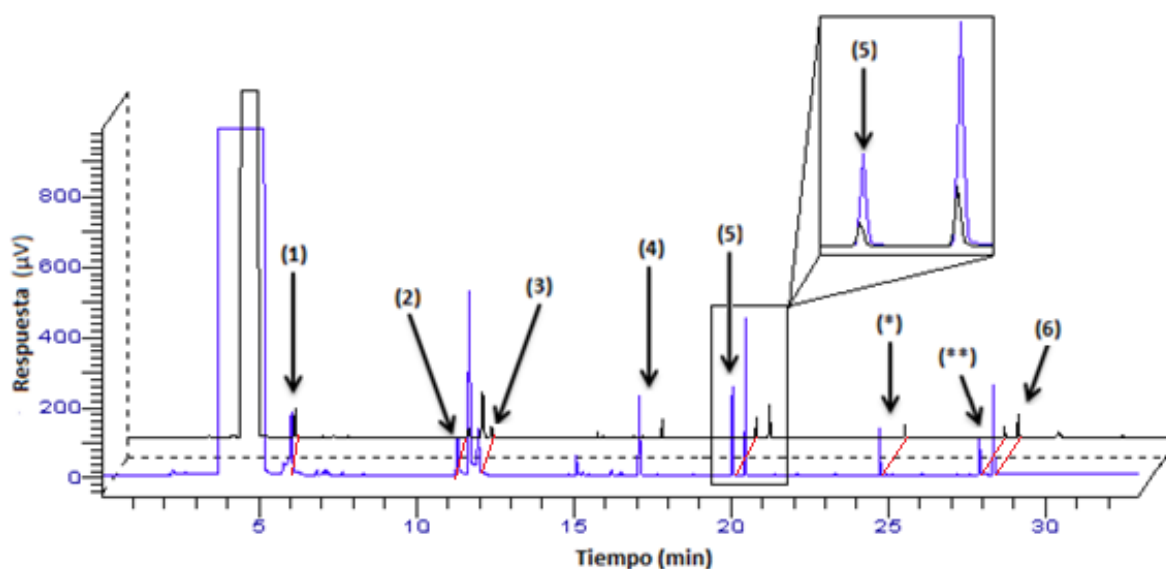


Figura 5.1. Cromatogramas de una mezcla de estándares de alcoholes superiores y metanol con estándares internos, inyectados en modo Split (*negro*) y modo Splitless (1 min) (*azul*). (1) Metanol, (2) Isobutanol, (3) Propanol (4) Alcohol Isoamilico, (5) Hexanol, (*) Nonanol como EI, (**) Alcohol Bencílico como EI y (6) Fenil Etanol.

Con las dos modalidades de inyección es posible identificar los analitos de la solución estándar, como se esperaba el modo Splitless (*azul*) muestra una mayor respuesta de los compuestos frente al detector, sacrifica un poco de

resolución entre los picos, aunque esto no afecta el análisis, además al estar cerrada la válvula de la purga durante 1 min permite la entrada de una porción mayor de la fracción volátil, lo cual hace más sensible la identificación con este modo de inyección. Debido a esto se decidió trabajar con el modo de inyección Splitless.

En la Figura 5.2 se muestra un cromatograma del análisis de los alcoholes superiores y metanol en una solución estándar. Esta solución contenía una mezcla de los alcoholes superiores (100 ppm), metanol (100 ppm) y los respectivos estándares internos (50 ppm).

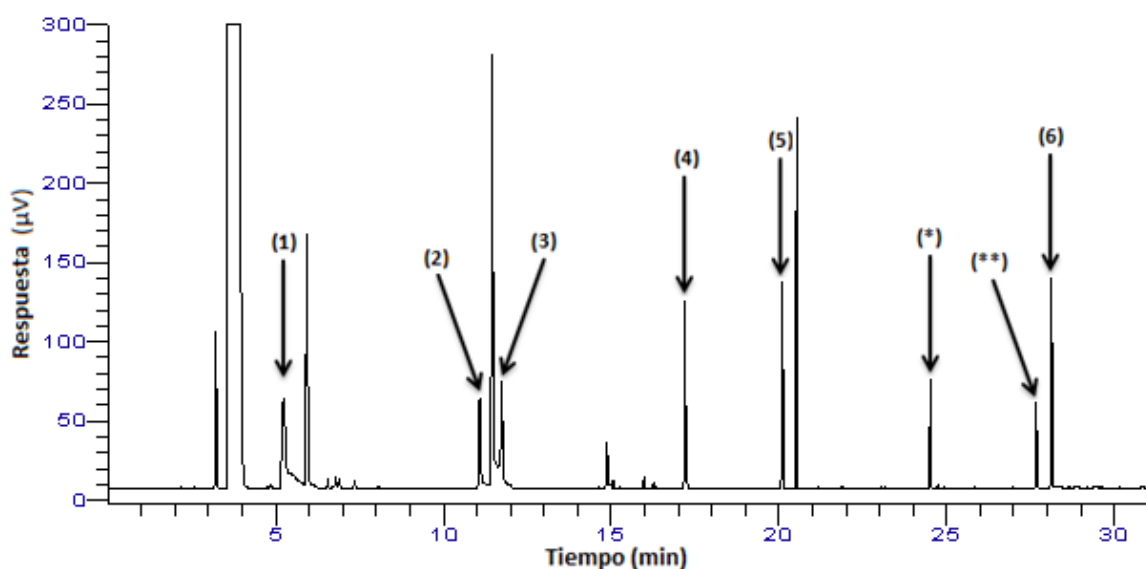


Figura 5.2. Cromatograma de una mezcla de estándares alcoholes superiores y metanol con sus correspondientes estándares internos. Identificación como en figura 5.1.

La mezcla de alcoholes superiores, metanol y los estándares internos, se utilizó como referencia para identificar y cuantificar estos analitos en las muestras de Cerveza. En esta Figura se aprecia una buena resolución entre los picos, esto es importante para que la identificación y la cuantificación sean correctas. A simple vista, en el cromatograma también se puede observar la presencia de impurezas, en un principio se creyó que estas impurezas interferirían en la identificación y cuantificación de los compuestos de interés. Dichas impurezas fueron atribuidas principalmente al disolvente utilizado (Acetona Pestanal para análisis de residuos). Antes de iniciar el análisis en las muestras, se procedió a realizar distintas pruebas

para verificar que estas impurezas no fueran de importancia durante el análisis. Se evaluaron distintas calidades de acetona (disolvente) para seleccionar la más adecuada, entre las acetonas que se analizaron se puede mencionar acetona grado reactivo, acetona grado HPLC, acetona Q.P. y acetona Pestanal para análisis de residuos, siendo esta última la más adecuada para efectuar el análisis ya que era la que contenía menor número de impurezas y en cantidad muy baja con respecto a las otras analizadas.

Las impurezas contenidas en el disolvente utilizado, presentaron un problema persistente durante el desarrollo de esta metodología, pero se puede aseverar que no interferían con la identificación y cuantificación de los analitos de interés.

La caracterización y cuantificación tanto de metanol como de alcoholes superiores se realizó mediante GC-FID utilizando un método desarrollado previamente en el laboratorio como ya se mencionó, obteniéndose así los resultados que se muestran a continuación.

Factores de Respuesta relativos. La Tabla 5.1 muestra los Factores de Respuesta relativos (FRr) obtenidos a partir de una solución de estándares de metanol y los alcoholes superiores, esta solución estándar fue tratada tal como se describe en el punto 4.5.1.1

Tabla 5.1. Factores de Respuesta relativos.

Alcohol	Factor Respuesta relativo (FRr)	Concentración (µg/mL)
Metanol	4.05	39.9
2-Butanol	1.06	40.4
Propanol	1.39	40.4
Alcohol Isoamilico	1.22	40.7
Hexanol	1.10	40.2
Alcohol Fenil Etilico	1.21	41.1

Estos FRr se utilizaron para calcular la concentración relativa y posteriormente la concentración final (mg/mL de alcohol anhidro) de cada uno de los analitos de interés.

Posteriormente se analizaron 6 muestras de cerveza (4 lager y 2 ale) mediante GC-FID tal como se describió en el punto 4.5.1.3. En la figura 5.3 se muestra un cromatograma típico en la determinación de alcoholes superiores y metanol de la muestra “Corona Extra”, que al igual que en la figura anterior; muestra una buena resolución entre los picos de interés. En este caso la muestra presenta cuatro de los analitos de interés, de los cuales tres están en concentraciones muy bajas, por lo cual en el cromatograma los picos cromatográficos son casi imperceptibles a simple vista, pero al analizar los resultados a detalle, estos analitos presentan una respuesta en el detector, lo que permitió su posterior identificación y cuantificación.

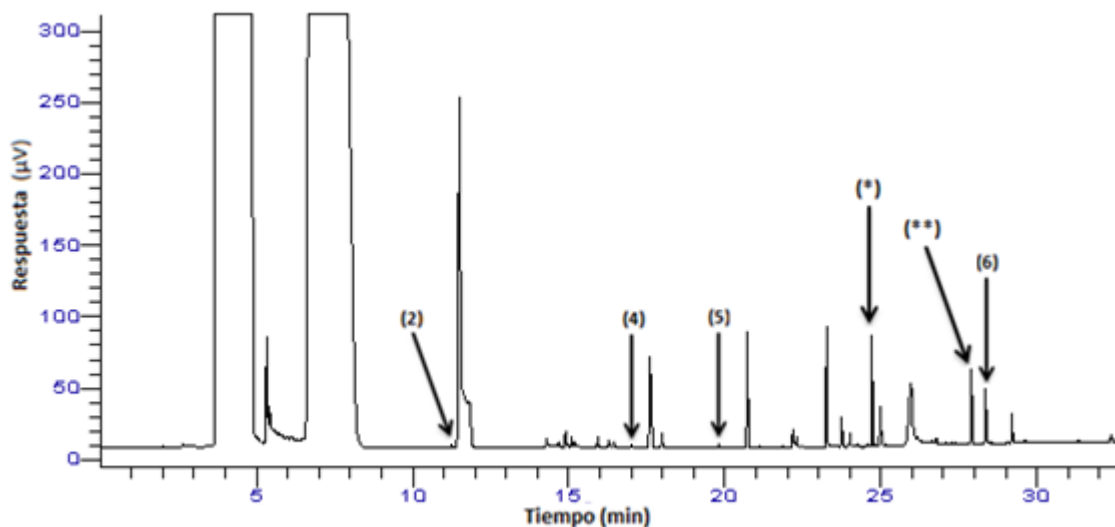


Figura 5.3. Cromatograma de una muestra de Cerveza “Corona extra” para la cuantificación de alcoholes superiores y metanol. Identificación como en Figura 5.1.

5.1.2 Caracterización y cuantificación de metanol

En ninguna de las muestras analizadas se detectó metanol o al menos no estaba dentro del límite de detección de esta metodología, por lo tanto no se cuantificó. De acuerdo a la NOM-142-SSA1-1995³ las bebidas alcohólicas tienen como límite máximo 300 mg de metanol/100 mL de alcohol anhidro.

En la solución de estándares que se usó como referencia para la identificación de los compuestos de interés, hay un tiempo de retención de 5.15

min que corresponde al metanol, ahora bien las muestras analizadas no presentan un pico que corresponda al valor del tiempo de retención del metanol.

Como se mencionó con anterioridad, la presencia de impurezas en el disolvente seleccionado, parecía ser un problema en la identificación de los alcoholes superiores y metanol. Una de estas impurezas presentaba una respuesta frente al detector muy grande, además eluía en un tiempo de retención de 5.98 min, por lo que debido a su tamaño y a su tiempo de retención se decidió confirmar que en las muestras efectivamente no se detectaba la presencia de metanol mediante un análisis de Microextracción en Fase Sólida modo Head-Space seguido de Cromatografía de Gases con un detector FID (SPME-HS-GC-FID).

En la Figura 5.4 se muestra un cromatograma obtenido mediante SPME-HS-GC-FID, del análisis de los alcoholes superiores y metanol en una solución estándar.

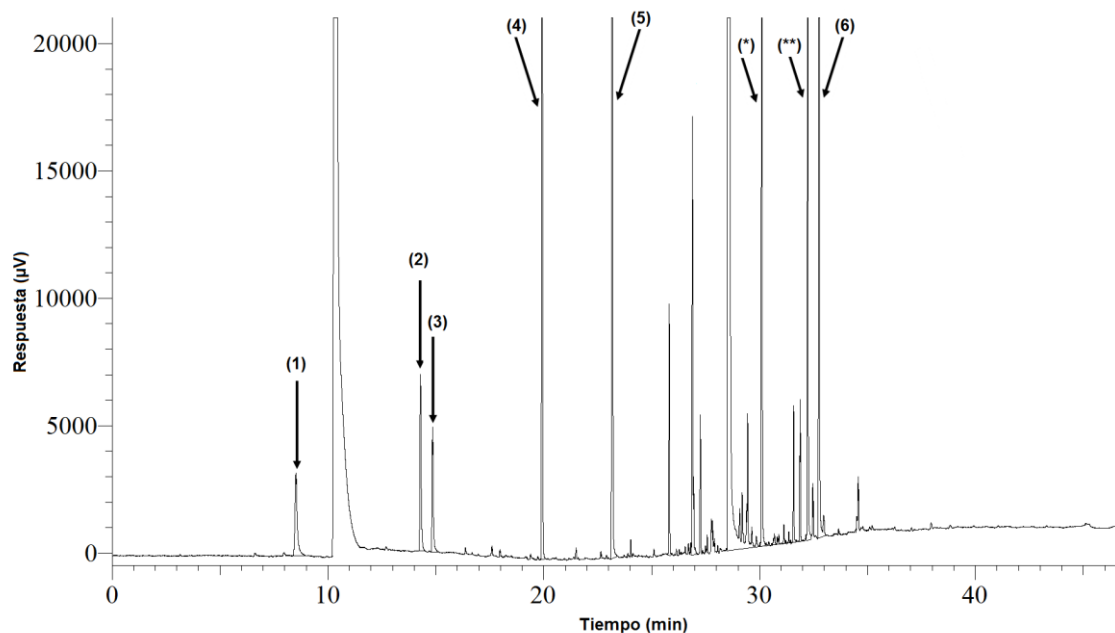


Figura 5.4. Cromatograma obtenido mediante SPME-HS seguido de GC-FID de una mezcla de estándares de alcoholes superiores, estándar de metanol y estándares internos (EI). Identificación como en figura 5.1.

La solución estándar fue preparada como se describió en el punto **4.5.1.5**, esta contenía una mezcla de los alcoholes superiores (100 ppm), metanol (100

ppm) y los respectivos estándares internos (50 ppm). Para eliminar las posibles interferencias generadas por el disolvente (acetona) se decidió utilizar agua desionizada y de este modo evitar cualquier problema al identificar los compuestos de interés. Como se puede observar en esta figura, la MEFSS-HS-CG-FID, permite evidenciar que los analitos de interés (alcoholes superiores, metanol y los estándares internos) son extraídos satisfactoriamente de la solución.

Del mismo modo que la solución estándar, se analizaron las muestras de cerveza (4 lager y 2 ale), tal como se describió en el punto 4.5.1.6. En la Figura 5.5 se muestra un cromatograma típico en la determinación de alcoholes superiores y metanol de la muestra “Corona Extra”.

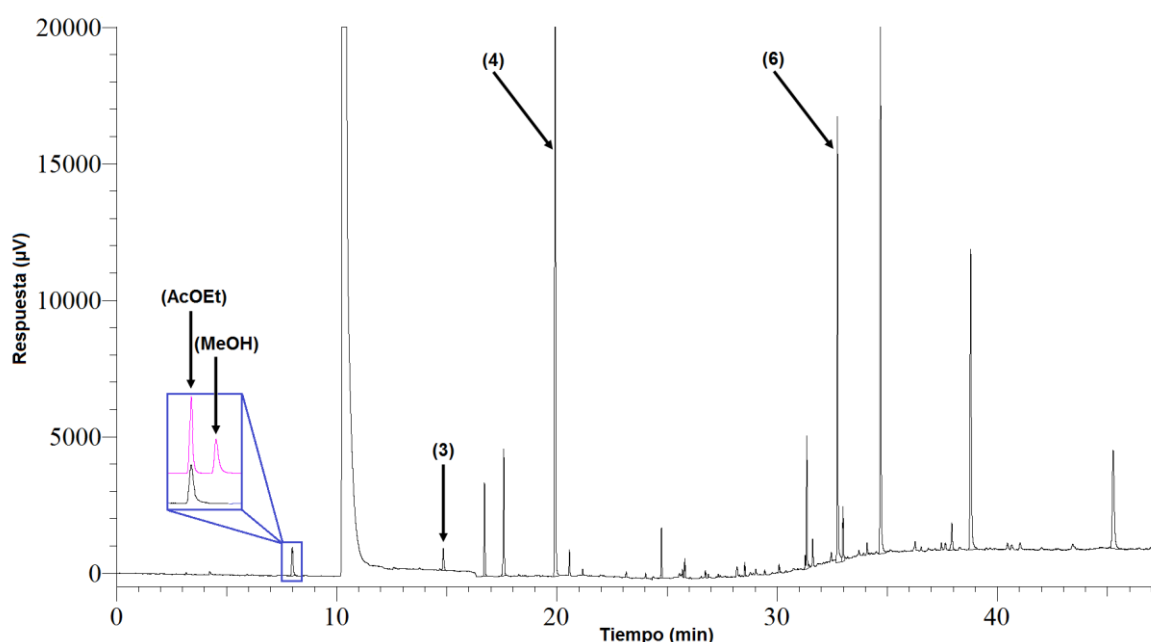


Figura 5.5. Cromatograma obtenido mediante MEFSS-HS seguido de CG (FID) de una muestra de Cerveza “Corona extra”. **(3)** Propanol **(4)** Alcohol Isoamilico y **(6)** Fenil Etanol (*negro*). Fragmento del cromatograma de una solución de estándares de Metanol y Acetato de Etilo (*rosa*)

Al igual que las figuras anteriores este cromatograma, muestra una buena resolución entre los picos de interés. En este caso, a la muestra no se le adicionaron los estándares internos utilizados para cuantificar, debido a que la

finalidad de esta metodología era confirmar la presencia de metanol en las muestras.

Utilizando los tiempos de retención de la solución estándar inyectada, se puede identificar que hay tres compuestos de interés presentes en la muestra (Propanol, Alcohol Isoamilico y Fenil Etanol). Con esta metodología se corroboró que no hay presencia de metanol en ninguna de las muestras analizadas.

En todos los cromatogramas de las muestras analizadas, se observó un pico muy cercano al tiempo de retención del metanol, pero no correspondía a este compuesto, en la literatura se reportó ²⁸ que en algunas muestras de bebidas alcohólicas existe la presencia de Acetato de Etilo (AcOEt), este analito eluye en primer lugar, incluso antes del metanol, con respecto a los tiempos de retención. Debido a lo anterior, se decidió inyectar una solución de metanol (100 ppm) y AcOEt (100 ppm) en el Cromatógrafo de Gases (FID), para posteriormente comparar con el compuesto encontrado en las muestras de cerveza. En la Figura 5.5 dentro del recuadro azul se puede observar lo antes mencionado. En rosa se encuentra un fragmento del cromatograma de la solución de los estándares (AcOEt-MeOH), el primer pico corresponde al AcOEt y el segundo al metanol. Al estar sobre puestos los cromatogramas podemos observar claramente que el pico encontrado en las muestras de cerveza corresponde al AcOEt. Se ha reportado que este compuesto le confiere a la cerveza olores frutales o muy similares a disolventes orgánicos.²⁸

Mediante la SPME-HS-GC-FID se comprobó que no había metanol en las muestras de cerveza analizadas.

5.1.3 Caracterización y cuantificación de alcoholes superiores

Se realizó el cálculo para determinar la concentración de cada uno de los alcoholes superiores identificados en las muestras en la Tabla 5.2 se muestra el contenido individual del los alcoholes superiores y metanol presentes en las muestras.

Tabla 5.2. Contenido individual de alcoholes superiores y metanol en muestras de cerveza.

NOMBRE	Metanol*	2-Butanol*	Propanol*	Alcohol Isoamilico*	Hexanol*	Alcohol Fenil Etilico*	TOTAL*
Corona	---	1.3	---	6.0	1.1	137.7	146.2
Victoria	---	1.4	---	0.7	0.3	133.7	136.1
Tecate	---	1.2	---	1.0	---	103.7	106.0
NM	---	1.3	---	0.5	0.7	95.3	97.8
MPA	---	1.2	---	0.7	0.3	109.6	111.8
MSI	---	1.1	---	0.9	14.6	20.7	37.2

*(mg Alc. Sup/100mL de Alc. Anhidro)

Con estos datos se realizó una gráfica del contenido de alcoholes superiores presentes en cada una de las bebidas analizada tal como se muestra en la Figura 5.6.

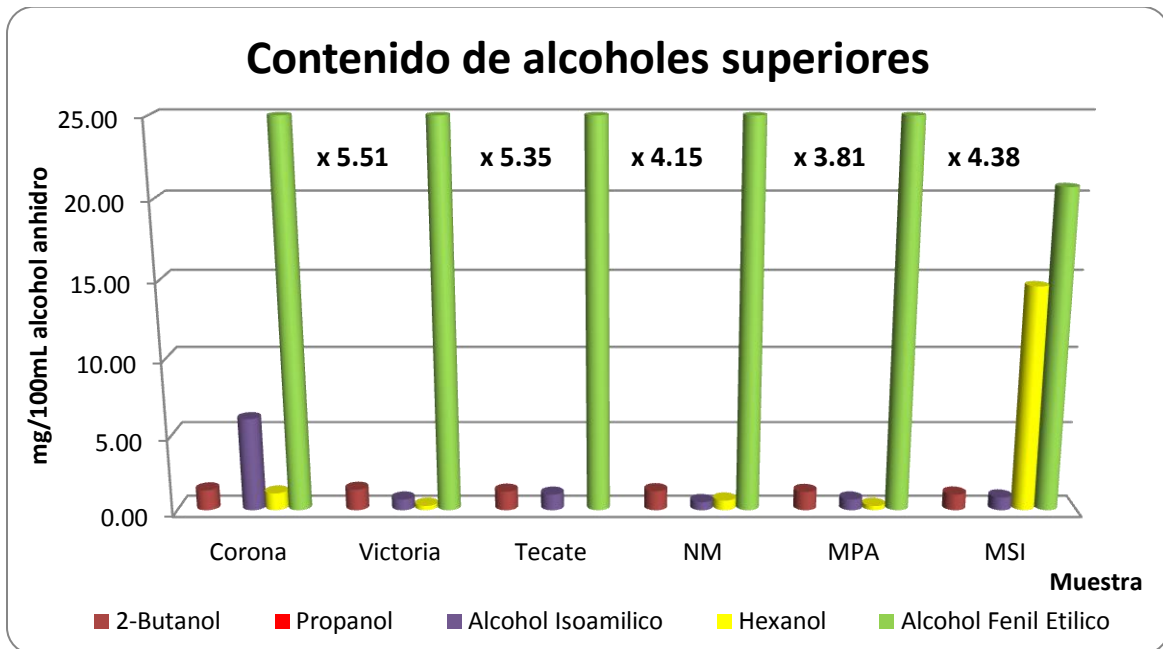


Figura 5.6. Gráfico del contenido de alcoholes superiores en muestras de cerveza.

En esta gráfica no se aprecia un perfil único de alcoholes superiores, es importante mencionar que la concentración de los compuestos en la mayoría de estas bebidas es muy pequeña y en la mayoría de las muestras solo se identificó y cuantificó cuatro de los cinco alcoholes en las muestras analizadas.

En cada una de ellas, la presencia de Fenil etanol es muy clara, es el alcohol superior más abundante en las cervezas analizadas, en general es un congenérico que se encuentra ampliamente distribuido en las bebidas alcohólicas, se ha reportado que particularmente este compuesto está presente en grandes proporciones en cervezas las cuales estuvieron sometidas a concentraciones de oxígeno demasiado altas o muy bajas. Se sabe que el precursor del alcohol isoamilico es un aminoácido, la valina. Con respecto a las fuentes de carbono necesarias para el microorganismo fermentador, se sabe que la glucosa favorece la formación de 2-butanol y disminuye la de propanol, mientras que la fructosa aumenta la formación de alcohol isoamilico y de fenil etanol.¹¹ Dicho lo anterior se puede explicar la ausencia de propanol y la presencia de 2-butanol, al mismo tiempo se puede predecir que en estos casos la fructosa y la glucosa son fuentes de carbono muy utilizadas para la fabricación de estas cervezas ya que el 2-butanol, fenil etanol y el alcohol isoamilico están presentes en proporciones considerables con respecto a los demás compuestos.

En base a los resultados mostrados en la gráfica de la figura 5.6 se observa que las cervezas mexicanas tienen la misma variedad de alcoholes superiores, pero estos están presentes en distintas proporciones. En general las cervezas Ale tienen una mayor proporción de alcoholes superiores que las Lager, pero la concentración total de estos analitos se ve ampliamente condicionada debido a la concentración tan grande de fenil etanol.

En la mayoría de las muestras en estudio se identificaron 4 alcoholes superiores que se cuantificaron posteriormente, el 2-Butanol, Alcohol Isoamilico, Hexanol y Fenil etanol, en la Figura 5.7 se muestra el cromatograma de la determinación de alcoholes superiores y metanol de la cerveza Minerva Stout Imperial, en este caso se identificaron 4 compuestos de interés, encontrándose en proporciones diferentes comparado con las otras 5 muestras.

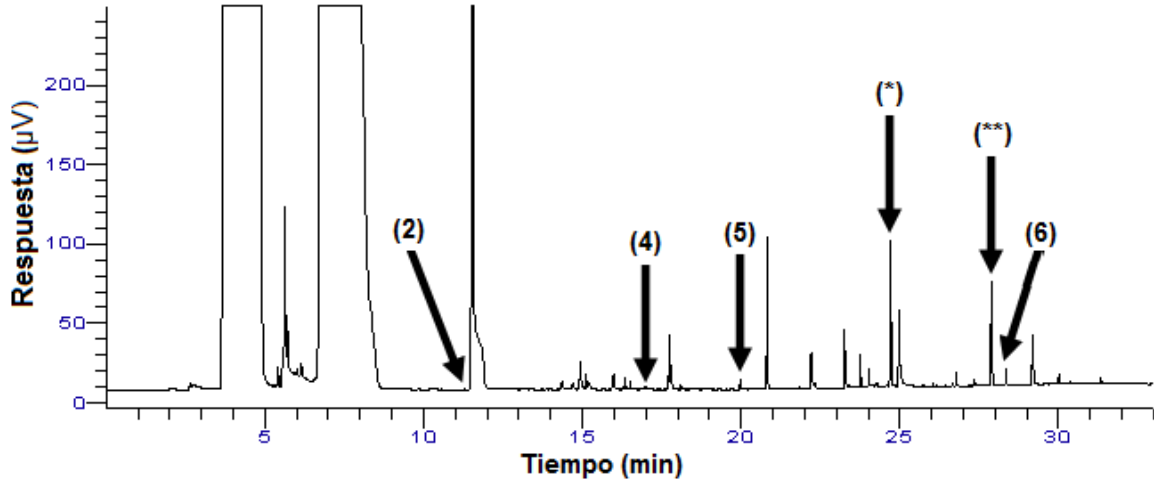


Figura 5.7. Cromatograma de una muestra de la cerveza Minerva Stout Imperial para la identificación y cuantificación de alcoholes superiores y metanol. Identificación como en Figura 5.1.

Es evidente que todas las muestras presentaron distintos tipos y proporción de alcoholes superiores, este comportamiento podría atribuirse a que en la elaboración de las bebidas se utiliza materia prima diferente, los procesos de fermentación no están sometidos a las mismas condiciones, esto sumado a que en algunos casos se utilizan diferentes agentes de fermentación como algunos tipos de microorganismos o harinas, lo que provee diferentes características sensoriales a cada bebida.

En la Tabla 5.3 se muestra el contenido total de alcoholes superiores cuantificados durante el análisis, se expresan en mg/ 100mL alcohol anhidro como lo establece la NOM-142-SSA1-1995.

Tabla 5.3. Contenido total de alcoholes superiores en muestras de cerveza (n=3)

Muestra	Concentración (mg/ 100mL alcohol anhidro)	Coefficiente de variación %CV
Corona	146.20 ± 5.75	3.9
Victoria	136.09 ± 2.26	1.7
Tecate	106.03 ± 1.21	1.1
NM	97.77 ± 11.82	12.1
MPA	111.84 ± 4.49	4.0
MSI	37.15 ± 4.55	12.0

Para alcoholes superiores el límite máximo establecido en la Norma es de 500 mg/ 100mL alcohol anhidro, claramente se observa que las muestras están

muy por debajo de este límite, por lo que se puede afirmar que las muestras están dentro de normatividad.

Con respecto a los coeficientes de variación, todas las muestras están por debajo de un 12.1% lo cual indica que es un procedimiento experimental reproducible.

Los resultados se aprecian con mayor claridad en la Figura 5.8 la cual muestra un grafico del contenido total de alcoholes superiores por medio de una gráfica de barras con los coeficientes de variación expresados en las barras de error correspondientes, en ella se visualiza claramente el comportamiento de las muestras de cerveza mostrando una concentración de aceite de fusel dentro de los límites establecidos por la Norma.

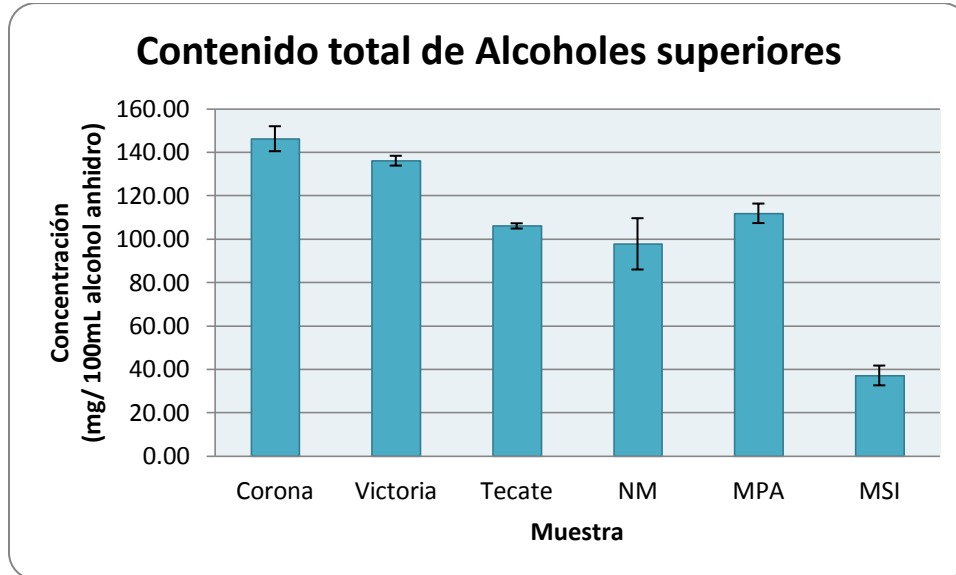


Figura 5.8. Gráfico del contenido total de alcoholes superiores en muestras de cerveza

En este gráfico se observa que no existe gran variación en la concentración de los alcoholes superiores en las cervezas Lager. Por otro lado las cervezas Ale muestran una concentración de alcoholes superiores distinta. En este caso la cerveza Stout Imperial (Ale) tiene el perfil diferente a todas las cervezas, ya que la concentración de cada uno de sus alcoholes es variada y distinta a las demás muestras analizadas. En el caso del Fenil etanol la concentración presente en la muestra es menor (20.7 mg / 100 mL de alcohol anhidro) mientras que las otras

muestras es mayor (100-130 mg en 100 mg/100 mL de alcohol anhidro) o bien, en el caso del hexanol la concentración es mayor en esta muestra (20.6 mg en 100 mg/100 mL de alcohol anhidro) con respecto a las demás muestras que tienen una menor proporción de este alcohol (0.2-1.2 mg en 100 mg/100 mL de alcohol anhidro) tal y como se muestra en la Tabla 5.2.

Las distintas concentraciones de los aceites de fusel están atribuidas directamente a las condiciones de fermentación, ya que cada tipo de cerveza estará provisto de un perfil en particular de estos compuestos, ya que las materias primas involucradas, los procesos, etc. determinaran la formación y la permanencia de los mismos.

5.2 CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES Y SEMIVOLATILES POR SPME-HS-GC-MS

Para caracterizar los compuestos volátiles y semivolátiles presentes en las muestras, se realizó el análisis de cerveza por SPME-HS-GC-MS tal y como se describió en el punto 4.5.2. Antes de iniciar el análisis en las muestras, se probaron diferentes condiciones con dos fibras de distintas polaridades, una fibra polar de Poliacrilato (PA) y una no polar de Polidimetilsiloxano (PDMS), esto con el objetivo de obtener los mejores resultados. Agitación de 1200rpm, 30 min de extracción de los analitos y 10 min de desorción térmica en el inyector del cromatógrafo fueron condiciones que no cambiaron en todas las pruebas realizadas. Los dos parámetros que variaron fueron la temperatura de extracción y la adición de sal. El número de compuestos identificados y las condiciones evaluadas con ambas fibras se muestran en la Tabla 5.4.

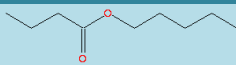
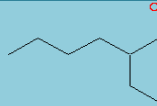


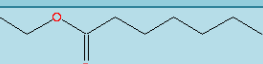
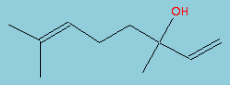
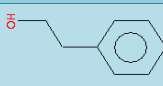
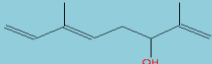
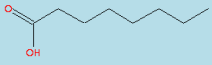
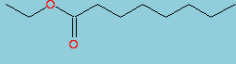
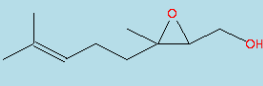
Tabla 5.4. Condiciones cromatográficas evaluadas para SPME con ambas fibras PA y PDMS y número de compuestos identificados.

Condiciones	1		2		3		4	
	PA	PDMS	PA	PDMS	PA	PDMS	PA	PDMS
°T ambiente	✓	✓	✓	✓	-	-	-	-
Baño María 50°C	-	-	-	-	✓	✓	✓	✓
Adición de Sal 50%	-	-	✓	✓	-	-	✓	✓
Numero de Compuestos Identificados	2	3	23	29	4	7	36	36

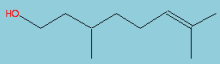
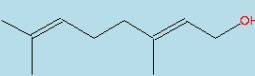
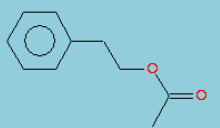
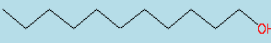
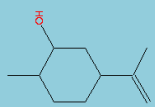
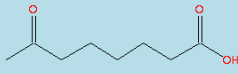
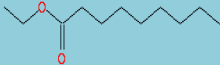
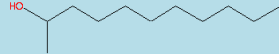
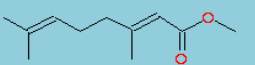
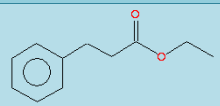
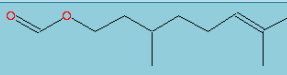
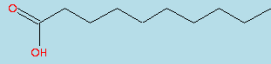
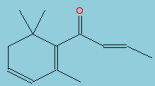

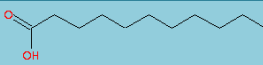
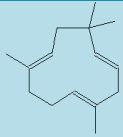
Resaltadas en gris se encuentran las condiciones cromatográficas seleccionadas para el análisis. El criterio seguido para la selección de estas, fue de acuerdo al mayor número de compuestos que fueron posibles identificar.

Una vez seleccionadas las condiciones del análisis (Baño María 50°C, 50% NaCl, extracción de 30 min a 1200 rpm y una desorción térmica de los analitos en el inyector del cromatógrafo a 250°C durante 10 min) se procedió a realizar la SPME-HS-GC-EM en la muestras de cerveza. En las Tablas 5.5 y 5.6 se muestran los compuestos identificados utilizando la fibra de PA y PDMS respectivamente.

Tabla 5.5. Compuestos volátiles y semivolátiles identificados en cerveza por SPME-HS-GC-MS con la fibra PA.

# Comp	tr	Nombre	Imagen	Cor	Vic	Tec	NM	MPA	MSI
1	8.123	butanoato de pentilo		---	X	---	---	X	---
2	8.414	2-etil-1-hexanol		X	X	X	X	---	X
3	8.731	fenil acetaldéhid		---	---	---	X	X	---
4	9.131	1-octanol		---	X	X	X	X	X
5	9.583	heptanoato de etilo		---	---	---	---	X	X
6	9.640	3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol (α -Linalol)		X	X	X	X	X	X
7	9.95	2-fenil etanol		X	X	X	X	X	X
8	10.582	2,6-dimetil-1,5,7-octatrien-3-ol		---	---	---	---	X	---
9	10.840	ácido octanoico		X	X	X	X	X	X
10	11.182	octanoato de etilo		X	X	X	X	X	X
11	11.588	3-metil-3-(4-metil-3-pentenil)-oxiranemetanol		---	---	---	---	X	---

RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

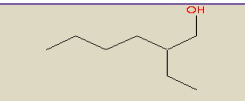
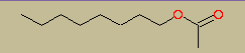
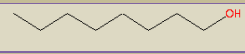

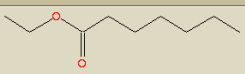
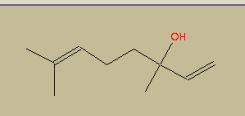
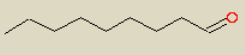
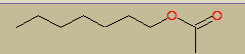
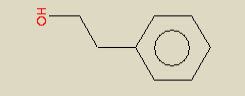
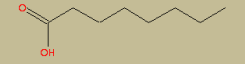
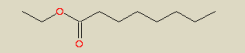
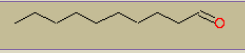
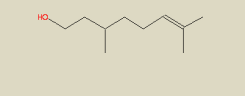
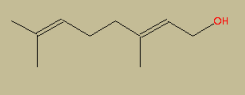
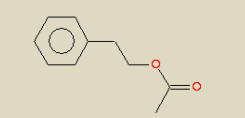


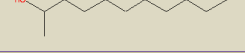
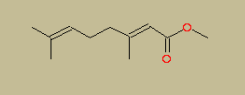
12	11.701	3,7-dimetil-6-octen-1-ol (β-Citronelo)		---	---	X	---	X	X
13	12.126	3,7-dimetil-2,6-octadien-1-ol (Geraniol)		---	---	---	---	X	X
14	12.227	2-fenilacetato de etilo		X	X	X	X	X	X
15	12.374	1-Undecanol		---	---	X	---	---	---
16	12.483	2-metil-5-(1-metiletenil)-ciclohexanol,		---	---	---	---	X	---
17	12.746	ácido 7-oxo-ctanoico		---	---	---	---	X	---
18	12.785	nonanoato de etilo		---	---	---	---	---	X
19	12.879	2-undecanol		---	---	---	---	X	X
20	13.277	3,7-dimetil-2,6-octadienoato de metilo		---	---	---	---	---	X
21	13.717	3-fenilpropanoato de etilo		---	---	---	X	X	X
22	13.733	formiato de 3,7-dimetil-6-octen-1-ilo		---	---	X	---	---	---
23	14.062	ácido n-decanoico		---	---	X	---	X	X
24	14.377	1-(2,6,6-trimetil-1,3-ciclohexadien)-1-(2-Buten-1-ona)-		X	X	---	X	---	---
25	14.418	decanoato de etilo		---	---	X	---	X	X
26	14.952	ácido undecanoico		X	---	---	X	X	X
27	15.677	2,6,6,9-tetrametil-cicoundecatrieno (Humuleno)		---	---	---	---	X	X

28	17.239	3,7,11-trimetil-1,6,10-dodecatrien-3-ol (Nerolidol)		---	---	---	X	X	X
29	17.662	dodecanoato de etilo		---	---	X	---	X	X
30	18.103	1,5,5,8-tetrametil-3,7-cicoundecadien-1-ol		---	---	---	---	X	X
31	18.262	1,5,5,8-tetrametil-12-oxabicyclo dodeca-3,7-dieno		---	---	---	---	X	---
32	18.517	1S,4R,4aS,8aR), 1,3,4,5,6,8a-hexahidro-4,7-dimetil-1-(1-metiletil)-,4a(2H)-naphthalenol		---	---	---	---	---	X
33	18.700	(1S,4S,4aR,8aR)-, 1,2,3,4,4a,7,8,8a-octahidro-1,6-dimetil-4-(1-metiletil)-1-naftalenol		---	---	---	---	X	X
34	20.828	tetradecanoato de etilo		---	---	---	---	---	X
35	23.537	9-hexadecenoato de etilo		---	---	---	---	---	X
36	23.812	hexadecanoato de etilo		---	---	---	---	---	X

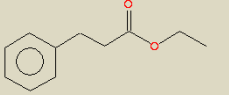
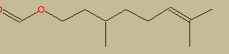
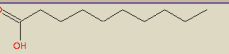

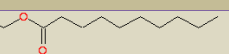
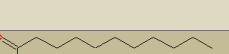
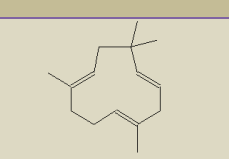
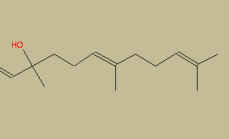
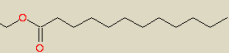
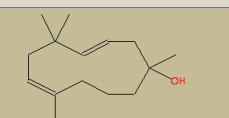
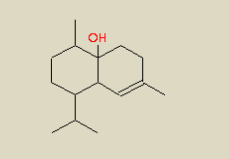
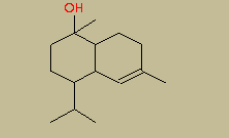
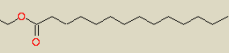
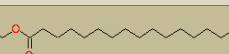
Tabla 5.6. Compuestos volátiles y semivolátiles identificados en cerveza por SPME-HS-GC-EM con la fibra PDMS.

# Comp	tr	Nombre	Imagen	Cor	Vic	Tec	NM	MPA	MSI
1	8.123	butanoato de pentilo		---	---	---	X	---	---
2	8.134	acetato de hexilo		---	---	X	X	---	X
3	8.398	4-metilen-4-pentenoato de etilo		---	---	---	X	---	---

RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

4	8.414	2- etil-1-hexanol		X	---	X	---	---	---
5	9.126	acetato de octilo		---	---	X	---	---	X
6	9.131	1-octanol		---	---	X	X	X	---
7	9.161	1-decanol		---	---	---	X	---	---
8	9.583	heptanoato de etilo		---	---	X	X	X	X
9	9.640	3,7-dimetil-1,6-Octadien-3-ol (α -Linalol)		---	---	X	X	X	X
10	9.688	nonanal		---	X	X	---	---	---
11	9.813	acetato de heptilo		---	---	X	X	---	---
12	9.95	2-fenil etanol		X	X	X	X	X	X
13	10.840	ácido octanoico		X	X	X	X	X	X
14	11.182	octanoato de etilo		X	X	X	X	X	X
15	11.354	decanal		---	---	X	X	X	---
16	11.701	3,7-dimetil-6-octen-1-ol (β -Citronelol)		---	---	X	X	X	X
17	12.126	3,7-dimetil-2,6-octadien-1-ol (Geraniol)		---	---	---	---	X	X
18	12.227	2-fenilacetato de etilo		X	X	X	X	X	X
19	12.374	1-undecanol		---	---	X	---	---	---
20	12.785	nonanoato de etilo		---	---	X	---	---	X
21	12.879	2-undecanol		---	---	---	---	X	---
22	13.277	3,7-dimetil-2,6-octadienoato de metilo		---	---	---	---	---	X

RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

23	13.717	3-fenilpropanoato de etilo		---	---	---	---	---	X
24	13.733	formiato de 3,7-dimetil-6-octen-1-ilo		---	---	X	---	X	---
25	14.062	ácido n-decanoico		---	---	X	X	X	X
26	14.225	geranil vinyl ether		---	---	---	---	X	---
27	14.418	decanoato de etilo		X	X	X	X	X	X
28	14.952	ácido undecanoico		---	---	---	---	---	X
29	15.677	2,6,6,9-tetrametil-cicoundecatrieno (Humuleno)		---	---	---	---	X	X
30	17.239	3,7,11-Trimetil-1,6,10-dodecatrien-3-ol (Nerolidol)		---	---	X	X	X	X
31	17.662	Dodecanoato de etilo		---	X	X	---	X	X
32	18.103	1,5,5,8-tetrametil-3,7-Cicoundecadien-1-ol		---	---	---	---	X	---
33	18.517	1S,4R,4aS,8aR), 1,3,4,5,6,8a-hexahidro-4,7-dimetil-1-(1-metiletil)-,4a(2H)-naphthalenol		---	---	---	X	X	---
34	18.700	(1S,4S,4aR,8aR)-, 1,2,3,4,4a,7,8,8a-octahidro-1,6-dimetil-4-(1-metiletil)-1-naftalenol		---	---	---	---	X	X
35	20.828	tetradecanoato de etilo		---	X	---	---	---	---
36	23.812	hexadecanoato de etilo		---	---	X	---	---	X

Algunos de los compuestos identificados utilizando la fibra de PA también fueron identificados usando la fibra de PDMS, en total con ambas fibras se identificaron 51 compuestos volátiles y semivolátiles diferentes.

Ninguna de las muestras tuvo un perfil único de compuestos, y aunque contenían compuestos en común, se encontraban presentes en distintas proporciones. Este comportamiento fue el esperado ya que se sabe que los congénicos están presentes en distintas proporciones dependiendo del tipo de cerveza.

La Figura 5.9 muestra un cromatograma típico de la cerveza tipo Ale (Minerva Pale-ale). En este cromatograma se señala únicamente la presencia de algunos compuestos identificados en esta muestra, la totalidad de los compuestos están reportados en las Tablas 5.5.y 5.6

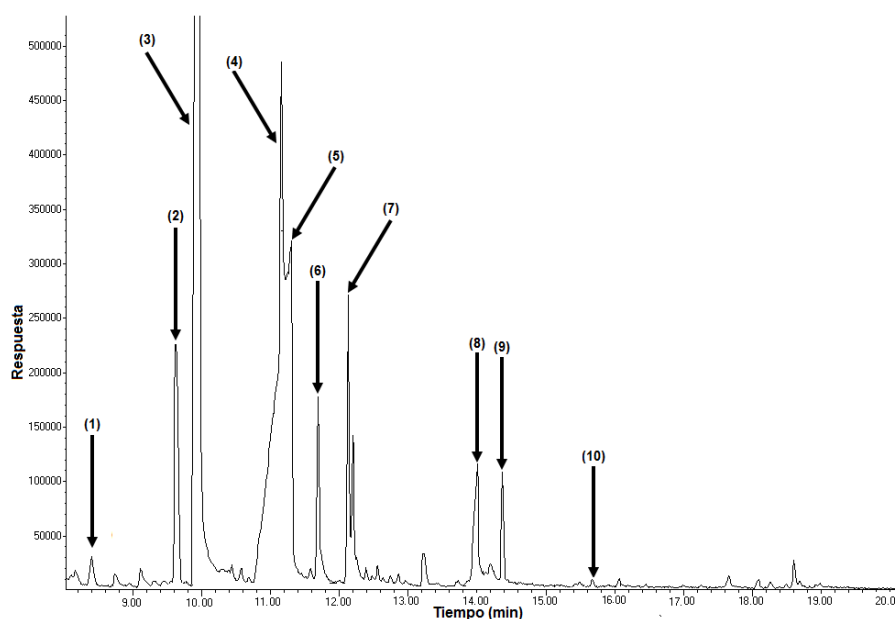


Figura 5.9. Cromatograma iónico total de una muestra de cerveza tipo Ale (Minerva Pale-Ale) obtenido a partir de SPME-HS-GC-MS con una fibra polar PA. (1) 2-Etil-1-hexanol, (2) Linalol, (3) Fenil etanol, (4) Ácido octanóico, (5) Octanoato de etilo, (6) Citronellol, (7) Geraniol, (8) 2- fenil acetato de etilo, (9) Decanoato de etilo, (10) Humuleno.

En general la cerveza es una matriz muy compleja. La cantidad de componentes conocidos excede en más de 800 compuestos distintos, muchos de

ellos contribuyen con las características organolépticas de la cerveza.²⁹ Estas sustancias provienen de las materias primas y pueden, o no modificarse durante el proceso de elaboración.³⁰ Las principales familias de compuestos identificados con ambas fibras (PA y PDMS) mediante esta metodología fueron esteroides, terpenos, alcoholes y compuestos carbonílicos. Está reportado en la literatura que estas familias de compuestos proporcionan características organolépticas a la matriz en la cual están involucradas, influyendo en la percepción sensorial.

En general los alcoholes superiores y ésteres, constituyen la mayor parte del olor y del sabor en las bebidas alcohólicas. Las bajas concentraciones de estos compuestos contribuyen positivamente a las características organolépticas de la cerveza, mientras que sus concentraciones por encima de los umbrales de percepción pueden ser una causa de distintivos malos olores o contribuyen al sabor inaceptable de cerveza. En la literatura se reportan las concentraciones y los valores umbral del aroma y sabor de algunos esteroides presentes en cerveza. No todos los esteroides se encuentran por encima de los valores de concentración umbral, pero se enfatiza que la presencia de diferentes ésteres puede tener un efecto sinérgico sobre los sabores individuales, lo que significa que los ésteres también pueden afectar el sabor de la cerveza muy por debajo de sus concentraciones umbral.^{28, 31}

Algunos de los ésteres identificados en las muestras se distinguen por conferir olores y/o sabores característicos, "olor y sabor a manzana" (Octanoato de etilo), "flores, rosas y/o miel" (2-fenilacetato de etilo) "aromas frutales y florales" (Heptanoato de etilo, Decanoato de etilo, etc.).^{28, 31, 32}

Los terpenos también se identificaron y aunque en diferentes proporciones, estos se encuentran en todas las muestras analizadas. Entre ellos, el linalol, citronelol, geraniol y nerolidol representan los terpenos principales dentro de cervezas analizadas. Como ya se mencionó con anterioridad, los terpenos con frecuencia tienen aromas o sabores agradables (frutales, herbales ó florales).

Recientemente usando GC-olfatometría, el linalol se ha caracterizado como uno de los compuestos más importantes responsables del aroma de lúpulo y

contribuye al aroma de la cerveza. Se ha demostrado que es también una de las sustancias odorantes clave en lúpulo ya que indica la presencia de compuestos de aroma de lúpulo y es transferido a la cerveza durante su proceso de elaboración.^{33, 34} Por otro lado el β -citronelol y el geraniol contribuyen con el sabor y olor de la cerveza (floral, frutal, dulce) aunque esté presente en bajas concentraciones (5mg/L).^{35, 36} El nerolidol se ha descrito como un compuesto con propiedades organolépticas características (aroma y sabor, floral, amaderado, frutal, cítrico).³⁶ Muchos otros compuestos derivados del lúpulo, tales como humuleno, farnesol, terpineol, etc., están presentes en el producto final y se ha propuesto que contribuyen con el aroma de la cerveza.³⁷ La mayor parte de estos compuestos están presentes en las muestras de cerveza analizadas, en la Figura 5.10 se puede observar este comportamiento, se tomaron los principales terpenos identificados y se graficaron con respecto a su respuesta en el detector (área).

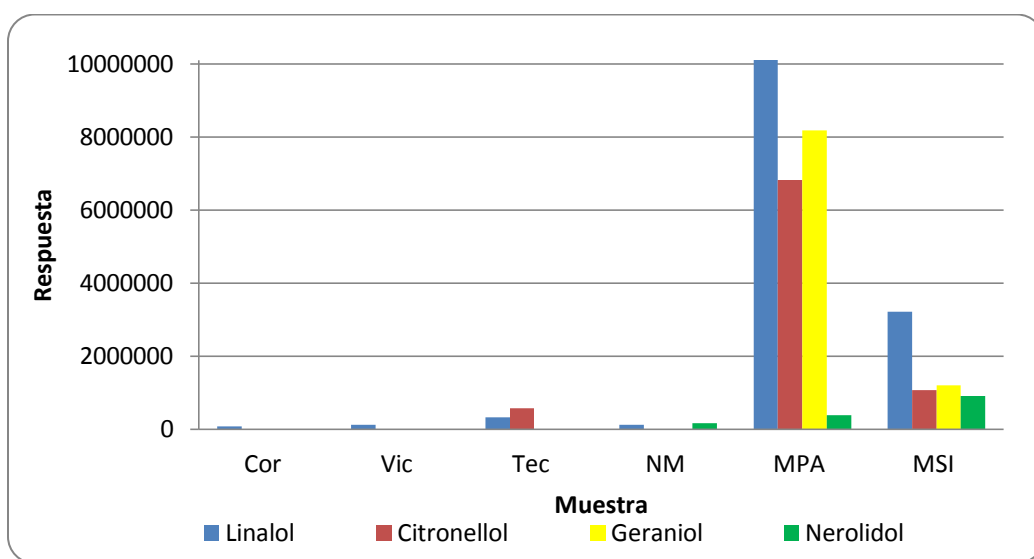


Figura 5.10. Grafico del área de los principales terpenos identificados mediante SPME-HS-GC-MS utilizando una fibra de PA.

En el caso del linalol, se puede observar que se encuentra presente en todas las cervezas analizadas, este compuesto se encuentra en distintas proporciones por lo cual es factible pensar que las muestras presentaran una serie de características organolépticas debidas a este compuesto. Comparado con las cervezas Lager, hay una mayor presencia de los 4 terpenos en las cervezas del

tipo Ale, se ha reportado que esto se debe a sus condiciones de elaboración (materia prima, condiciones de malteado, condiciones de fermentación, etc.) las cuales proveen de un mayor número de congéneres asociados a este tipo de cervezas.¹¹

5.3 ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES (PCA) PARA LAS FAMILIAS DE COMPUESTOS IDENTIFICADOS.

Debido a que los compuestos volátiles y semivolátiles estaban presentes en distintas proporciones en las muestras se decidió recurrir a un método estadístico de análisis de los datos, para ilustrar que cervezas presentaron la mayor cantidad de compuestos volátiles. El Análisis de Componentes Principales (ACP ó PCA por sus siglas en ingles), es una técnica utilizada para hallar las causas de la variabilidad de un conjunto de datos y ordenarlas por importancia.^{38, 39} La relación que tiene la respuesta de los analitos frente al detector es proporcional a la concentración de los mismos, por lo que para fines prácticos se decidió no cuantificarlos, en este caso los datos analizados fueron las áreas de 12 compuestos de mayor abundancia en las muestras. En la Figura 5.11 se muestra un PCA de las áreas de los 12 compuestos elegidos, extraídos mediante SPME-HS-GC-MS con una fibra no polar (PDMS).

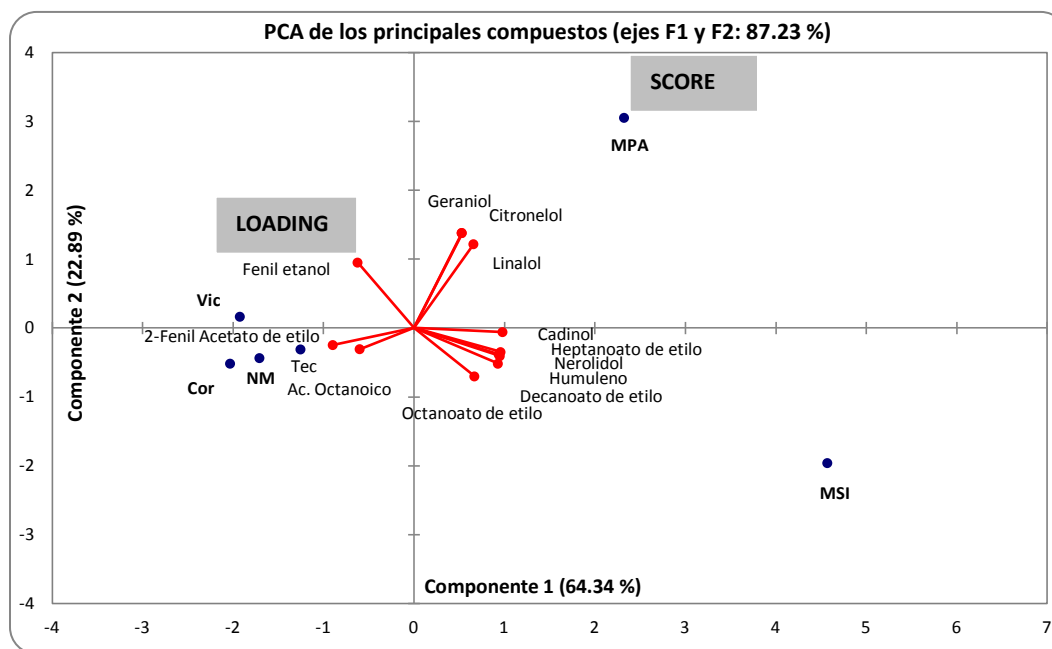


Figura 5.11. Gráfica de PCA de los compuestos y las muestras con respecto a la respuesta obtenida (área) en la SPME-HS-CG-MS con una fibra polar PA.

En este caso utilizando los dos primeros componentes se logra explicar un 87.23% de la variabilidad de las muestras, siendo el componente 1 el que explica la mayor variabilidad con un 64.34%. Como se mencionó anteriormente, la relación que tiene la respuesta de los analitos frente al detector es proporcional a la concentración de los mismos, por lo que siguiendo este criterio y utilizando los datos de las áreas de los cromatogramas, podemos decir que el PCA con respecto al componente 1 fue capaz de agrupar las cervezas dependiendo de su tipo (Lager Ale). Se formaron dos grupos para poder lograr esta agrupación, en el lado negativo del componente 1 se encuentran las cervezas Lager (Cor, Vic, Tec, NM), las cuales tal y como se observa en el grafico se caracterizan por tener una mayor proporción de Fenil etanol, ácido octanoico y 2-Fenil Acetato de etilo. Del mismo modo, en el lado positivo del componente 1 se encuentran las otras dos cervezas que son del tipo Ale (MPA, MSI) a las cuales se les asocia una mayor proporción de compuestos distintos, terpenos, ésteres y carbonilos. La cerveza MPA tiene mayor proporción de terpenos lo cual le confiere características organolépticas únicas. Del mismo modo la cerveza MSI tiene una serie de compuestos presentes

en mayor proporción lo cual se piensa le confiere una gran parte de sus características sensoriales distintivas.

A partir del gráfico se puede generar una idea de cómo están distribuidos y la proporción de los compuestos seleccionados en cada una de las muestras. En el caso del citronelol, la muestra que representaría la concentración más alta de este compuesto sería MPA ya que su "score" (valor de la muestra en el plano cartesiano), con respecto al componente 1, se encuentra ubicada en lado positivo y muy cercano al "loading" (vector) en el que fue situado el citronelol. Hay que mencionar que entre más largo y cercano al componente este el "loading", este tendrá más peso e importancia en dicho componente. En el caso contrario se encuentran las muestras Cor, Vic, Tec y NM, se encuentran en sentido contrario al "loading" seleccionado para el citronelol, lo cual indica que las muestras tienen una cantidad mínima o ausencia de este compuesto. Este criterio se aplica para cada uno de los 12 compuestos analizados con PCA, esto permite ordenar por importancia la concentración de los compuestos y de esta manera agrupar por tipo de cerveza hallando cuales fueron los compuestos que influyeron en la variabilidad de cada tipo de muestra.

En la literatura se encuentran reportados algunos estudios de los compuestos presentes en cervezas que no son de producción mexicana.

En cervezas brasileñas se identificaron 42 compuestos diferentes.⁴⁰ Una gran parte de los compuestos presentes en cervezas brasileñas, fueron identificados en cervezas mexicanas a través del presente estudio; 1-octanol, linalol, 2-fenil etanol, ácido octanoico, octanoato de etilo, geraniol, decanoato de etilo, nerolidol, etc.

En 2005 Liu M., Zeng Z. y Xiong B,⁴¹ identificaron mediante SPME-HS-GC distintos compuestos volátiles (alcoholes, ácidos grasos y ésteres) en cuatro cervezas Chinas, la mayor parte de los compuestos reportados en este estudio fueron identificados en cervezas Mexicanas. En ambos estudios se proponen una descripción de las características organolépticas brindadas por los analitos identificados. Por otro lado en 2011 seis investigadores de origen Chino, identificaron 18 compuestos volátiles, incluidos alcoholes, ésteres, ácidos

orgánicos, por SPME-GC-MS. Mediante un análisis estadístico estos compuestos fueron utilizados para clasificar los 28 tipos de cerveza de 4 marcas diferentes.²⁰ De manera similar las cervezas Mexicanas fueron clasificadas con respecto a una de las familias de compuestos identificados (terpenos).

En general las cervezas producidas en el territorio Mexicano y las cervezas de otros países tienen un perfil de compuestos volátiles y semivolátiles parecido, esto bajo condiciones de estudio similares a las propuestas en este trabajo. Las diferencias entre las cervezas Mexicanas y las extranjeras podrían ser atribuidas a varios factores; la materia prima, el proceso de elaboración, las condiciones de análisis, el tipo de cerveza, etc., Aunque las cervezas de producción Mexicana no contendrán los mismos congéneres, mantendrán un perfil de compuestos muy estrecho con respecto a las cervezas extranjeras del mismo tipo.

5.4 EVALUACIÓN SENSORIAL

Como se menciona en el punto 4.6, la evaluación sensorial fue realizada en dos etapas. En la primera, de manera conjunta el panel de jueces generó 190 atributos para aspecto, 186 para olor, 202 para sabor y 171 para las sensaciones, en total para las cuatro categorías se generaron 749 atributos. En la segunda etapa utilizando los atributos que los jueces generaron de manera individual, se elaboraron cuestionarios personalizados, en los que cada uno de los jueces evaluó un número distinto de atributos.

En la Tabla 5.7 se muestra a detalle el número de atributos evaluados en cada categoría para cada uno de los jueces.

Tabla 5.7. Numero de atributos evaluados por cada uno de los 12 jueces.

JUEZ	ASPECTO	OLOR	SABOR	SENSACIONES	TOTAL
1	25	14	20	26	85
2	13	12	10	5	40
3	11	12	14	9	46
4	11	13	13	11	48
5	13	10	14	13	50
6	18	19	22	18	77
7	12	24	24	34	94
8	14	25	26	22	87
9	16	15	15	8	54
10	14	12	17	10	53
11	23	17	15	9	64
12	20	13	12	6	51
TOTAL	190	186	202	171	749

En este caso se puede observar que el juez 2 es el que de manera conjunta en las cuatro categorías, evaluó el menor número de atributos (40), mientras que el juez 7 evaluó de manera conjunta el mayor número de atributos (94). Las diferencias tan marcadas entre los jueces que evaluaron más y menos atributos, en este caso 54 atributos de diferencia, se atribuyen a que los jueces eran consumidores habituales (los resultados dependerán de la frecuencia en la que el producto es consumido), y no tenían una capacitación previa en la descripción de la cerveza, estas características de los participantes cumplen con el perfil de libre elección. Se observó que el 75% de jueces de sexo masculino, evaluaron por encima del número de atributos promedio, mientras que el 75% de jueces del sexo femenino, evaluaron por debajo del número de atributos promedio.

Los resultados obtenidos por categoría de atributos fueron analizados mediante Análisis de Procruster generalizado (GPA, por sus siglas en inglés) haciendo uso de una herramienta de análisis estadístico (XLSTAT versión de prueba 2013.2).

En la Figura 5.12 se muestra el grafico de un GPA de aspecto, donde utilizando los dos primeros componentes se logra explicar un 76.53 % de la variabilidad de las muestras, siendo el componente 1 el que explica la mayor variabilidad con un 65.87%. En esta Figura se ve claramente que este GPA no es

capaz de agrupar las muestras en Lager y Ale con respecto ninguno de los dos componentes, por otro lado se observa que los “score” (valor de la muestra en el plano cartesiano) de cada una de muestras y su respectiva réplica están situados en puntos muy cercanos dentro del plano cartesiano, por lo que se podría pensar, mas no asegurar que los resultados son reproducibles.

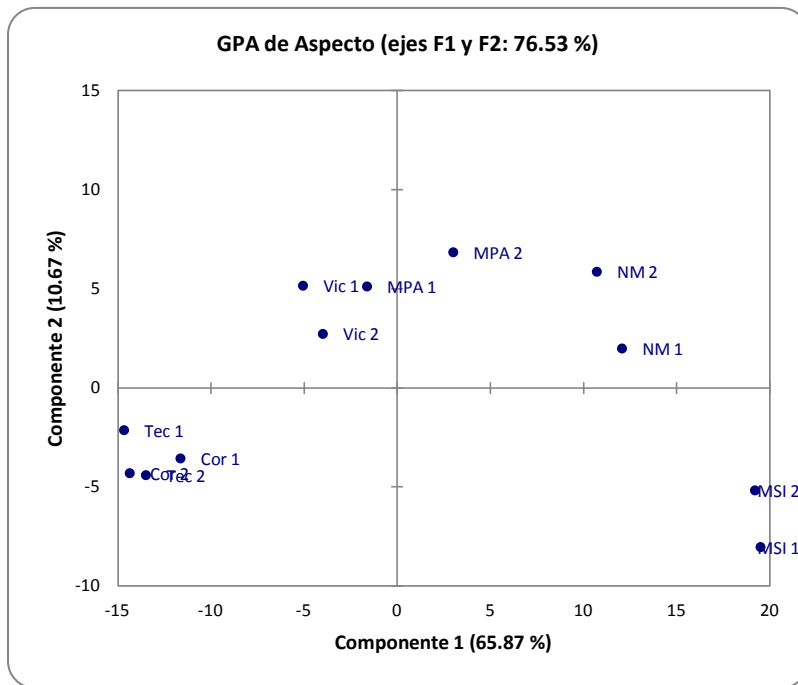


Figura 5.12. Gráfico de un GPA de aspecto. “Score” correspondiente a cada una de las muestras de cerveza y su respectiva replica. El # 1 y 2 indican el numero de replica evaluada para cada muestra.

Del mismo modo se procedió a analizar por separado cada una de las categorías restantes (olor, sabor y sensaciones) sin poder observar una agrupación clara. El comportamiento de los “scores” en cada una de las muestras y sus repeticiones fue similar al caso anterior en casi todos los casos, a diferencia de la manera en que se agrupan las muestras con respecto a los componentes utilizados. Es el caso del GPA de sensaciones, la mayoría de las muestras y sus respectivas repeticiones se encuentran dispersas en el plano cartesiano sin mostrar un perfil definido. En el anexo I se muestran los gráficos correspondientes al GPA de las categorías restantes.

Debido a lo antes mencionado se decidió realizar un GPA en las cuales se incluirían las cuatro categorías. En la Figura 5.12 se muestra el gráfico de un GPA para el aspecto, olor, sabor y sensaciones, donde utilizando los dos primeros componentes se logra explicar un 52.62 % de la variabilidad de las muestras, siendo el componente 1 el que explica la mayor variabilidad con un 39.61%. Nuevamente se observa que este GPA no es capaz de agrupar las muestras en Lager y Ale con respecto ninguno de los dos componentes.

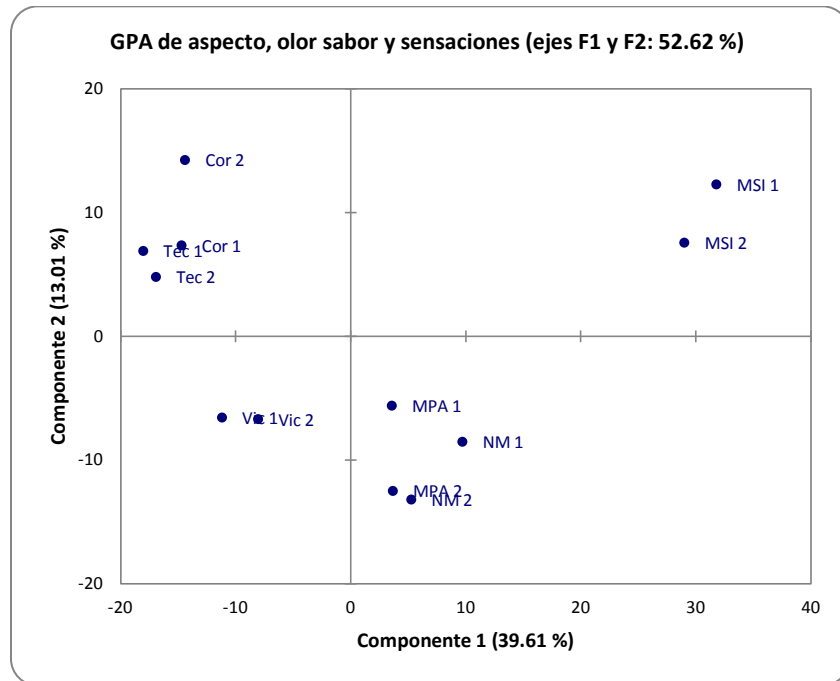


Figura 5.13. Gráfico de un GPA de aspecto, olor, sabor y sensaciones. “Score” correspondiente a cada una de las muestras de cerveza y su respectiva replica. El # 1 y 2 indican el numero de replica evaluada para cada muestra.

Debido a que la categoría de “sensaciones” fue la que mostró mayor dispersión entre las muestras se decidió realizar el análisis de GPA sin incluirla. En la Figura 5.14 se muestra el grafico del GPA para el aspecto, olor y sabor, donde utilizando los dos primeros componentes se logra explicar un 56.84 % de la variabilidad de las muestras, siendo el componente 1 el que explica la mayor variabilidad con un 44.70%. Al realizar este último análisis se puede observar que el GPA realizado una vez mas no es capaz de agrupar las muestras en Lager y

Ale sin embargo, se observo que existía una tendencia en el GPA de aspecto y los GPA que incluyeron varias categorías.

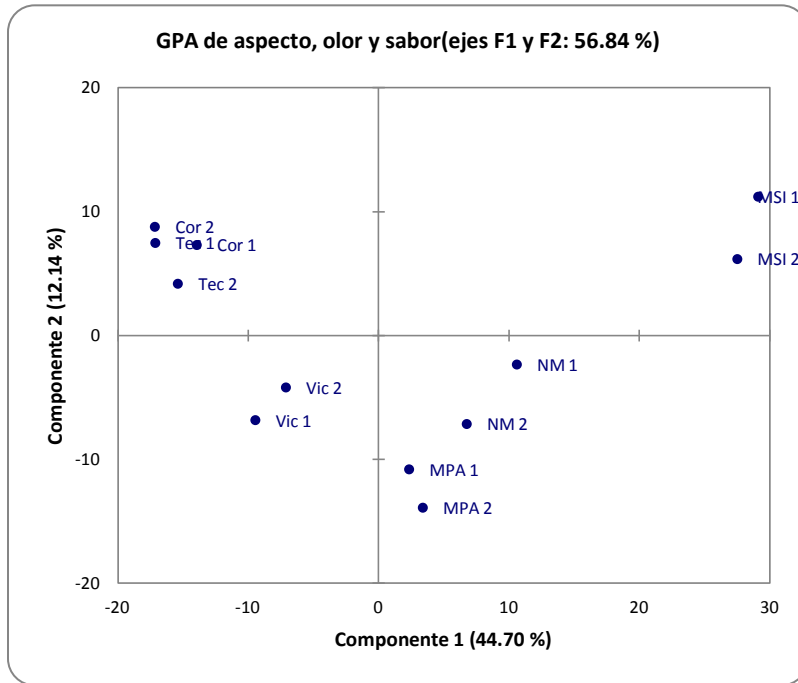


Figura 5.14. Gráfico de un GPA de aspecto, olor y sabor. “Score” correspondiente a cada una de las muestras de cerveza y su respectiva replica. El # 1 y 2 indican el numero de replica evaluada para cada muestra.

Haciendo hincapié en que las muestras NM y Vic corresponden al tipo Lager mientras que MSI y MPA corresponde a las del tipo Ale, se puede observar en el GPA de aspecto y los GPA que incluyeron varias categorías (Figura 5.12, Figura 5.13 y Figura 5.14) las muestras NM y Vic siempre se encuentran en puntos cercanos a las muestras Ale. Esto fue atribuido a que a nivel de percepción visual los jueces no fueron capaces de diferenciar de forma clara las muestras NM, Vic, MSI y MPA y de este modo lograr una agrupación (Lager y Ale), debido a que el aspecto de las cervezas fue muy similar (Figura 5.15).

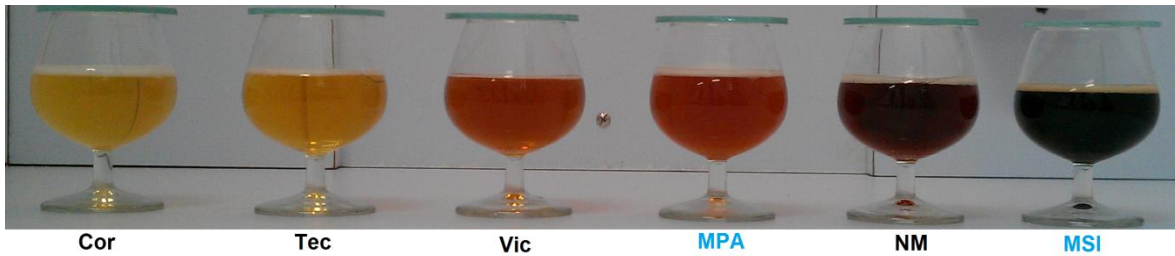


Figura 5.15. Aspecto de las muestras evaluadas. En negro se muestra el nombre de las cervezas tipo Lager y en azul las tipo Ale.

Estas similitudes, provocaron que los GPA fueran direccionados por el aspecto de las muestras, y no se lograra una agrupación clara entre los tipos de cerveza.

Finalmente al observar este comportamiento se optó por realizar un GPA descartando el aspecto de las muestras considerando solo el olor, sabor y sensaciones para con ello evitar que el análisis se direccionara.

En la Figura 5.16 se muestra el grafico de un GPA de olor, sabor y sensaciones. Se utilizaron los dos primeros componentes logrando explicar un 47.82 % de la variabilidad de las muestras, siendo el componente 1 el que explica la mayor variabilidad con un 36.21 %. A diferencia de los otros análisis en esta figura se observa que este GPA con respecto al componente 1, es capaz de agrupar las muestras en Lager y Ale. Se formaron dos grupos para poder lograr esta agrupación, en el lado negativo del componente 1 se encuentran las cervezas Lager (Cor, Vic, Tec, NM), mientras que del lado positivo del componente 1 se encuentran las otras dos cervezas que son del tipo Ale (MPA, MSI). Además los "score" de cada una de muestras y su respectiva réplica están situados en puntos muy cercanos dentro del plano cartesiano, por lo que se podría pensar, mas no asegurar que los resultados son reproducibles.

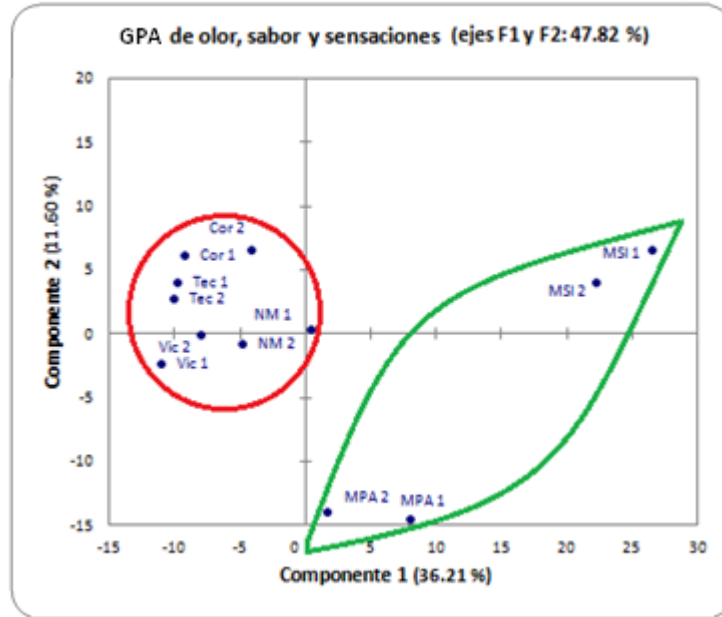


Figura 5.16. Gráfico de un GPA de olor, sabor y sensaciones. Agrupación de los “Score” correspondiente a cada una de las muestras de cerveza y su respectiva replica. El #1 y 2 indican el numero de replica evaluada para cada muestra.

Utilizando las tablas de Valores críticos para el coeficiente de correlación de Pearson “r”, ⁴² podemos determinar que atributos tuvieron peso en la agrupación de los tipos de cerveza.

Tomando un valor de “r” de 0.5760, los atributos que se consideraron de peso en la agrupación de las muestras, fueron los que presentaron un valor del componente 1 (F1) igual o mayor al de “r” ($F1 \geq \pm 0.5760$). En el Anexo II se muestra la tabla de correlaciones entre los atributos y los componentes para los 12 jueces. Los atributos enlistados son los que tuvieron valores de F1 mayores o iguales a ± 0.5760 .

Para poder observar más claramente los atributos y su importancia, se procedió a realizar un análisis en el cual se determinaron las frecuencias de aparición de estos. La Tabla 5.8 muestra un condensado de los atributos que tuvieron peso con respecto al componente 1 para la clasificación de las muestras.

En la parte inferior de la tabla se muestra que criterio se utilizo para generar un atributo y de esta manera determinar su frecuencia, ya que todos los jueces evaluaron con sus propios términos. Es el caso del atributo de sabor: “amargo”, 2

jueces lo evaluaron como amargo, un juez como amarga y un juez como notas amargas; estos tres atributos redactados de distinta manera, se tomaron como uno solo “amargo”, en conjunto generaron una frecuencia de 4. Este fue el criterio que se siguió para establecer cada uno de los atributos de peso que tenían palabras o frases homologas.

Para las muestras Ale los atributos que están correlacionados positivamente con respecto al componente 1 se encuentran marcados en rojo, algunos de ellos son el olor y sabor a café, el olor y sabor a chocolate, las sensaciones astringentes, resabio amargo, etc. En cambio para las muestras Lager con correlación negativa al componente 1 se encuentran marcados en azul, algunos de estos atributos que pesaron en la clasificación de las muestras son olor y sabor a cebada, olor a hierba, resabio amargo, sensación refrescante, espumosa, etc.

Tabla 5.8. Atributos de peso para la cerveza en el GPA de olor, sabor y sensaciones.

	OLOR			SABOR			SENSACIONES		
	Atributos	Frecuencia	%**	Atributos	Frecuencia	%**	Atributos	Frecuencia	%**
(+)	café	10	83.33	café	10	83.33	café	10	83.33
	chocolate	2	16.67	amargo	4	33.33	amargo	4	33.33
	madera	2	16.67	cereal tostado	2	16.67	resabio amargo	3	25.00
				chocolate	2	16.67	espesa	2	16.67
(-)				quemado	2	16.67			
	cebada	3	25.00	cebada	3	25.00	frescura	4	33.33
	hierba	3	25.00	cereal	3	25.00	ligera	3	25.00
	fresco	2	16.67	espumosa	3	25.00	refrescante	3	25.00
	amargo	2	16.67	ligero	3	25.00	diluido	2	16.67
	cerveza	2	16.67	agua	2	16.67	fluido	2	16.67
fermentado	2	16.67	fermentado	2	16.67	resabio amargo	2	16.67	
						relajante	2	16.67	
café =café tostado chocolate =chocolate tostado hierba = pasto, herbáceo cerveza =característico de la cerveza fermentado = fermentación			café = café sin azúcar, café permaneciendo en la boca, granos de café, nota larga a café amargo =amarga, notas amargas chocolate = chocolate amargo, notas achocolatadas espumosa =espumoso, toque espumoso			amargo = ardor, ligera quemazón por el alcohol resabio amargo =sabor amargo tiempo prolongado, deja un sabor amargo espesa = pesada frescura = fresca, fresco, frescor diluido =sensación diluida fluido = fluida			

**12 jueces = 100%

Como ya se mencionó, generalmente las cervezas Lager se caracterizan por ser bastante espumosas, y refrescantes, esto se confirma observando la tabla anterior, ya que los jueces determinaron que estos atributos estaban presentes en las muestras y eran parte del grupo de atributos de peso que estaban correlacionados negativamente con respecto al componente 1. El olor herbal en este tipo de cervezas podría ser asociado a los terpenos identificados mediante SPME-HS-GC-MS, que en su mayoría se encontró reportado que provienen del lupulo y confieren aromas frutales y florales. Por otro lado las cervezas Ale se sabe que poseen una mayor cantidad de congeneres, los cuales son responsables de las características sensoriales en las cervezas, en el caso del resabio amargo, podría ser atribuido a uno de los compuestos identificados mediante SPME-HS-GC-MS humuleno el cual se ha reportado que es parte del aceite esencial de lupulo el cual es utilizado para conferir amargor a las muestras.

En otros estudios también se ha encontrado que el olor y sabor amargo, las sensaciones astringentes, resabio amargo, sabor a cebada, etc., son atributos correlacionados con alguno de los componentes de un GPA elaborado a partir de de un Perfil de Libre Elección en cerveza.⁴³

Los compuestos identificados analíticamente y los resultados obtenidos del GPA se relacionan directamente, ya que, sensorialmente existieron diferencias que permitieron agrupar las muestras en Lager y Ale, estas diferencias son atribuidas a algunos de los congéneres identificados, ya que durante la fermentación de la cerveza, los azúcares fermentables del mosto se convierten en distintos compuestos que contribuyen al sabor de la cerveza. Los compuestos volátiles se excretan por la levadura como subproductos de su metabolismo y su crecimiento a concentraciones próximas al umbral de detección humana. Por lo tanto, los pequeños cambios en sus cantidades podría afectar el sabor del producto final.³²

VI. CONCLUSIONES

1. Se implementó una técnica para el análisis de metanol y alcoholes superiores usada para el análisis de bebidas alcohólicas fermentadas-destiladas (Mezcal y Tequila) a un análisis de bebidas alcohólicas fermentadas (Cerveza) obteniendo buenos resultados.
2. El contenido de alcoholes superiores y metanol en las muestras analizadas no excedió los límites establecidos en la NOM-142-SSA1-1995.
3. Se aplicó SPME-HS acoplada a GC-MS a seis muestras de cerveza Mexicana permitiendo caracterizar 51 compuestos orgánicos volátiles y semivolátiles, las principales familias de compuestos identificados mediante esta metodología fueron ésteres, terpenos, alcoholes y compuestos carbonílicos.
4. Comparando lo reportado en este estudio con trabajos similares de otros países, las cervezas Mexicanas y las cervezas extranjeras del mismo tipo poseen un perfil de compuestos volátiles y semivolátiles semejante, el contenido de congéneres en cervezas mexicanas y extranjeras dependerá de varios factores; la materia prima, el proceso de elaboración, las condiciones de análisis, etc.,
5. De acuerdo con la literatura revisada, este es el 1^{er} reporte de este tipo en Cervezas Mexicanas.
6. El perfil de libre elección, mediante un GPA para olor, sabor y sensaciones, permitió encontrar diferencias sensoriales claras entre las muestras y de esta manera agruparlas en Lager y Ale.
7. Se determinó que para las muestras Ale, 3 atributos de olor, 5 de sabor y 3 de sensaciones están correlacionados positivamente con respecto al componente 1. En las muestras Lager 6 atributos de olor, 6 de sabor y 7 de

sensaciones están correlacionados negativamente con respecto al componente 1. Estadísticamente estos son atributos de peso que permitieron agrupar las cervezas en Lager y Ale.

8. Los compuestos identificados analíticamente y los resultados obtenidos del GPA se relacionan directamente, ya que, sensorialmente hay diferencias que permiten agrupar las muestras en Lager y Ale, estas diferencias son atribuidas a los congéneres identificados, los cuales dependiendo de su proporción conferirán características sensoriales particulares a las bebidas.

VII. PERSPECTIVAS

La información contenida en este proyecto será útil para desarrollar trabajos posteriores que aporten información que complemente la caracterización química, la clasificación, el control de calidad, etc., de las cervezas producidas en el territorio mexicano mediante un análisis cromatográfico. Dado que no se encontró reportada información para este fin sería importante sugerir las perspectivas de este trabajo:

1. Optimizar y validar los métodos utilizados para la identificación y cuantificación de los congéneres.
2. Identificar y cuantificar los congéneres que en este trabajo no se estudiaron (aldehídos, ácidos grasos libres, compuestos sulfurados, etc.)
3. Implementar las técnicas utilizadas en este estudio a mostos, lúpulo, etc. para su caracterización química.
4. Entrenar un panel de jueces para la evaluación de las cervezas y aplicar un perfil convencional (QDA, perfil de sabor, perfil de olor, etc.) para obtener información más amplia que la obtenida.
5. Hacer una correlación de los resultados obtenidos en la cuantificación de los compuestos identificados mediante SPME-HS-GC-MS y un perfil sensorial.

VIII. ANEXO

ANEXO I

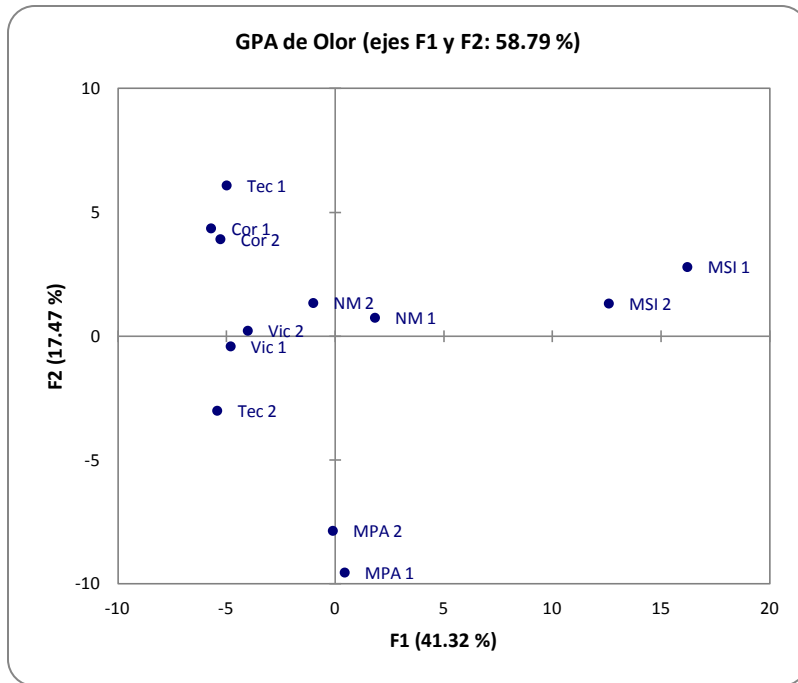


Figura I. Gráfico de un GPA olor “Score” correspondiente a cada una de las muestras de cerveza y su respectiva replica. El #1 y 2 indican el numero de replica evaluada para cada muestra.

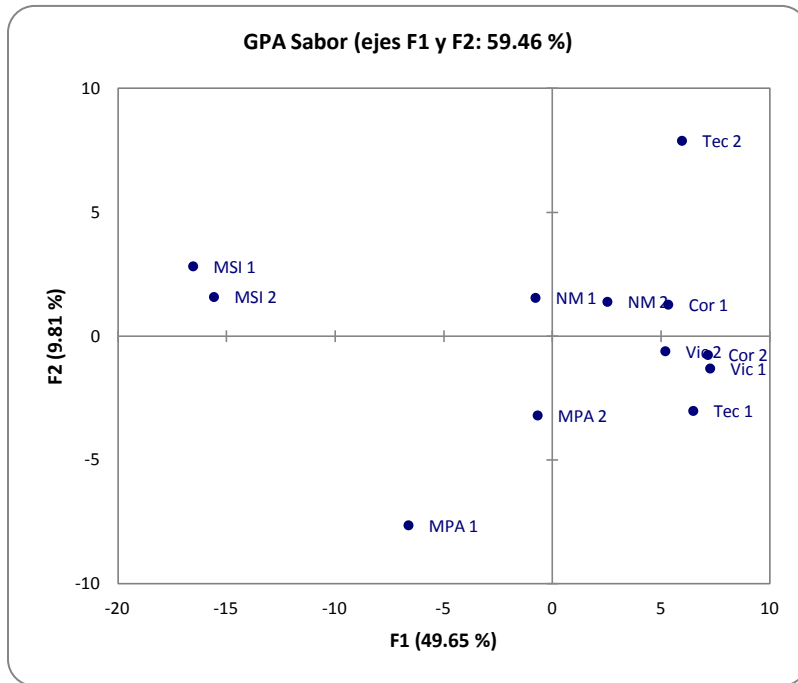


Figura II. Gráfico de un GPA de sabor “Score” correspondiente a cada una de las muestras de cerveza y su respectiva replica. El #1 y 2 indican el numero de replica evaluada para cada muestra.

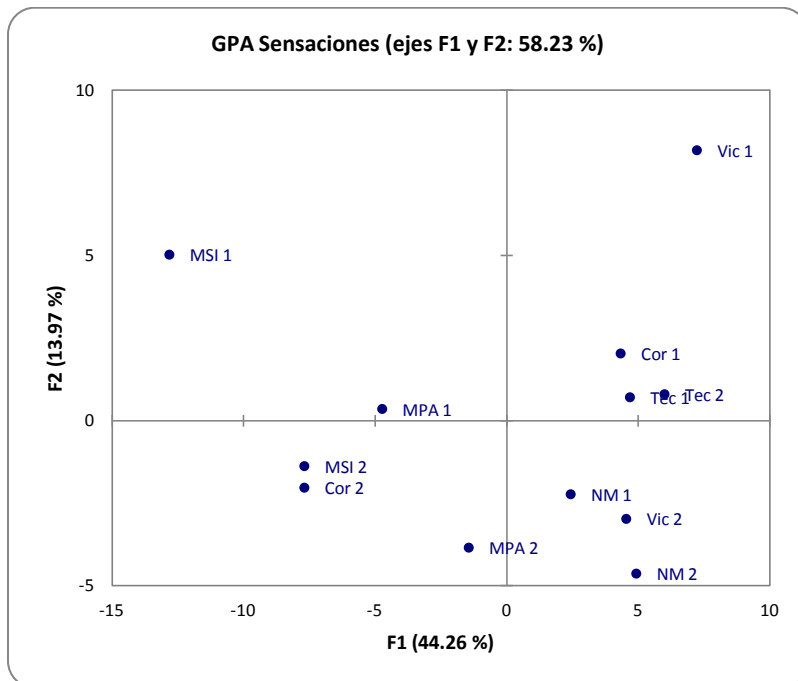


Figura III. Gráfico de un GPA de sensaciones “Score” correspondiente a cada una de las muestras de cerveza y su respectiva replica. El #1 y 2 indican el numero de replica evaluada para cada muestra.

ANEXO II

Tabla I. Componentes procrustes para cerveza, correlaciones entre los atributos y los componentes (F1) de los 12 jueces. Valores de $F1 \geq \pm 0.5760$.

CATEGORIA, JUEZY ATRIBUTO	F1	F2	CATEGORIA, JUEZY ATRIBUTO	F1	F2
Sa 12 cafe	0.9820	0.0500	Sa 2 amarga	0.8293	-0.2917
Sa 4 licor de cafe	0.9597	-0.0007	Sa 11 granos de cafe	0.8264	-0.2382
Sa 3 quemado	0.9578	0.0904	Sa 12 ahumado	0.8129	-0.1481
O 9 cafe	0.9538	-0.1035	Se 4 penetrante en la lengua	0.8123	0.2221
O 3 cafe	0.9434	0.2054	Se 4 desagrado por el resabio amargo	0.8112	-0.0953
Sa 2 cafe sin azucar	0.9388	0.0444	O 9 cebada tostada	0.8047	-0.2615
Sa 9 quemado	0.9345	-0.2526	O 10 cafe	0.7919	0.3336
Sa 9 cafe	0.9144	-0.2702	O 12 madera	0.7905	-0.1141
O 3 canela	0.9084	0.0778	O 9 grano tostado	0.7885	-0.4201
O 8 cafe	0.8936	0.3522	O 9 cereal tostado	0.7727	-0.4090
Sa 5 nota larga a cafe	0.8929	0.3531	Se 2 seca	0.7706	-0.2973
O 5 nota a cafe tostado	0.8908	0.3465	O 7 cafe	0.7579	0.2943
O 12 cafe	0.8874	0.3227	O 11 chocolate tostado	0.7489	-0.5284
O 2 cafe	0.8837	0.1879	Se 2 deja un sabor amargo	0.7400	-0.1730
Sa 10 cafe permaneciendo en la boca	0.8833	0.3603	O 9 tostado	0.7393	-0.4404
Sa 8 cafe	0.8820	0.3391	O 6 chocolate	0.7366	0.2569
O 4 licor de cafe	0.8694	0.3610	Sa 6 notas achocolatadas	0.7365	0.3953
O 1 cafe	0.8689	0.2978	Sa 2 amargo	0.7361	-0.5107
Sa 4 resabio amargo penetrante	0.8614	-0.4116	Se 2 deja sabor amargo	0.7349	-0.1742
Sa 4 resabio penetrante	0.8600	-0.4330	Sa 12 madera	0.7283	-0.2556
Sa 9 cereal tostado	0.8569	-0.2193	Se 9 espesa	0.7264	-0.4219
Sa 9 cebada tostada	0.8499	-0.2747	Sa 11 quemado	0.7154	-0.4438

Sa 1 cafe	0.8485	0.2770	O 11 madera	0.7070	-0.1256
Sa 4 resabio amargo	0.8357	-0.5292	Se 4 ligera quemazon por el alcohol	0.7050	-0.4353
Sa 9 tostado	0.8346	-0.2545	Se 1 resabio a cafe	0.7048	0.2780
Sa 4 amargo	0.8310	-0.4261	O 12 ahumado	0.7037	0.1454
Sa 11 chocolate amargo	0.6927	-0.0727	Sa 2 cerveza	-0.5881	-0.0020
Se 11 astringente	0.6842	-0.0888	Se 8 relajacion de lengua	-0.5892	-0.2772
Sa 8 notas amargas	0.6744	0.0635	Sa 2 agua simple	-0.5917	0.3794
Se 5 pesada	0.6527	-0.2088	Se 1 diluido	-0.5944	0.3544
Sa 7 resabio a cafe	0.6450	-0.1404	Sa 5 burbujas demasiado finas	-0.5977	-0.4716
Se 11 resabio muy amargo	0.6440	-0.1772	Sa 6 cereal	-0.5990	0.0638
O 6 cafe	0.6388	-0.1237	Sa 1 grano	-0.6006	-0.2794
Se 1 calida	0.6344	-0.1346	Sa 7 fermentado	-0.6275	-0.3739
O 2 resabio amargo en la boca	0.6326	-0.0891	O 3 hierba	-0.6299	0.2007
Sa 4 punzante en la lengua	0.6309	-0.5995	Se 7 refresacnte poco	-0.6301	-0.3132
Sa 11 cereal tostado	0.6301	-0.1311	Sa 1 amargo a dulce	-0.6326	-0.2088
O 11 cajeta	0.6208	-0.5691	Sa 7 toque esopumoso	-0.6374	-0.2219
Sa 3 cereal	0.6070	0.3156	O 2 fresco	-0.6395	-0.0477
Se 3 acidez	0.6056	0.3117	Sa 8 alcohol	-0.6418	0.4269
Sa 11 te negro	0.6014	-0.5761	Sa 7 el caracteristico sabor a fermentado	-0.6512	-0.3863
Sa 6 cafe	0.6008	0.1667	O 3 pasto	-0.6572	0.1761
Se 10 sabor amargo tiempo prolongado	0.5975	0.5157	Sa 1 poco espumoso	-0.6574	-0.2246
Se 11 resabio amargo	0.5949	-0.1259	Sa 1 poco espumosa	-0.6628	-0.2272
Sa 11 amargo	0.5943	-0.1987	Se 5 ligera	-0.6629	0.1767
Se 3 ardor	0.5934	0.1123	Sa 1 suave	-0.6673	0.2103
Se 1 toques amargos	0.5847	0.2440	O 2 cerveza	-0.6693	-0.0218
Se 2 astringente	0.5807	-0.0689	O 1 agridulce	-0.6729	-0.4499

Se 9 fresco	-0.5769	0.1524	O 8 cebada	-0.6734	-0.1752
Se 10 resabio amargo prolongado	-0.5788	-0.3980	Se 4 frescor	-0.6764	0.3139
Se 8 relajante	-0.5809	-0.2546	O 7 refrescante	-0.6804	-0.5627
Se 1 poco resabio amargo	-0.5818	-0.2606	O 4 cebada	-0.6848	0.3125
Se 9 fresca	-0.5827	0.0120	Sa 6 jugo de manzana	-0.7946	-0.2958
Sa 3 agua gasificada	-0.5835	-0.4583	Se 9 fluida	-0.7961	0.2112
Sa 1 dulce	-0.6850	0.1281	Se 4 refrescante	-0.7979	0.2523
O 5 amargo	-0.6957	0.4218	Se 2 refrescante	-0.8004	0.2115
Se 8 fresca	-0.7036	-0.0068	Se 1 sensacion diluida	-0.8135	0.2383
O 1 dulce	-0.7045	-0.1630	Sa 2 refrescante	-0.8382	0.4286
Se 1 agua	-0.7055	-0.3818	Sa 4 resabio a cebada	-0.8491	0.3270
Sa 4 ligero	-0.7268	0.4847	Sa 4 resabio a cereales	-0.8535	0.2758
O 5 amargo demasiado	-0.7467	0.4421	Sa 4 cebada	-0.8604	0.3799
O 7 fermentacion	-0.7516	0.2363	Sa 4 cereales	-0.8616	0.3594
O 4 herbaceo ligeramente	-0.7528	-0.3058	Sa 9 ligero	-0.8676	0.3389
Se 1 alcohol poco	-0.7541	0.1220	O 1 poco penetrante	-0.8697	0.1883
Sa 6 cebada	-0.7542	-0.0576	O 10 caracteristico de la cerveza	-0.8789	0.0415
O 1 poco alcohol	-0.7617	0.1808	O 3 trigo	-0.8836	-0.0534
Se 1 ligera	-0.7653	-0.0031	Sa 1 ligera	-0.8839	0.3502
Sa 1 diluido	-0.7666	0.3149	Sa 1 ligero	-0.8912	0.1936
O 7 fermentado	-0.7730	0.4107	O 3 cebada	-0.8945	-0.3791
O 11 fresco	-0.7758	-0.1336	Sa 3 cebada	-0.9133	-0.1653
Sa 3 trigo	-0.7793	-0.0658			
Se 9 fluido	-0.7901	0.2206			
Se 1 sensacion ligera	-0.7942	-0.0691			

IX. BIBLIOGRAFIA

1. México con nuevo récord en producción de cerveza
Consultado en:
http://www.elsemanario.com.mx/news/print.php?story_id=10796;
Consultado el 17 de marzo de 2013.
2. Modelo apuesta por cerveza tradicional
Consultado en:
<http://www.cnnexpansion.com/negocios/2012/12/16/modelo-apuesta-por-cerveza-tradicional>;
Consultado el 17 de marzo de 2013.
3. Secretaria de Salud, Norma Oficial Mexicana NOM-142-SSA1-1995. Bienes y servicios. Bebidas alcohólicas. Especificaciones sanitarias. Etiquetado sanitario y comercial.
Consultado en:
www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/142ssa15.html;
Consultado el 17 de marzo de 2013.
4. García, M. (2011) Malta y cerveza Introducción. Presentación Power Point Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa y Unidad Lerma. México D.F.
5. Secretaria de Salud, Artículo 1036 del Reglamento de la ley general de salud en materia de control sanitario de actividades, establecimientos, productos y servicios.
Consultado en:
<http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/compi/rlgsmcsaeps.html>;
Consultado el 17 de marzo de 2013].

6. La Cerveteca de JAB.
Consultado en:
http://cerveteca-jab.blogspot.mx/2011_06_01_archive.html;
Consultado el 18 de marzo de 2013.
7. García, M. (1994) Fermentación para la producción de Cerveza. Bebidas Mexicanas: Vol. 1, pp.11-18.
8. Wade, L. (2004) Química Orgánica. 5ª ed. Pearson Prentice Hall, España. pp. 474.
9. Tortora, G., Grabowski, S. (2002). Principios de anatomía y fisiología. 9ª ed. Oxford University Press, México, pp.906.
10. Spencer, J., Bodner, G., Richard, L. (2007). Química estructura y dinámica. 1ª ed. Patria, México D.F, pp.440.
11. Santillán, M., García, M. (2000). Producción de congénicos en la Fermentación de la cerveza. Bebidas mexicanas: Vol. 1, pp. 1-4.
12. Medina, G., (2008). Cuantificación de alcoholes y aldehídos en mezcal por cromatografía de gases y microextracción en fase sólida seguido de cromatografía de gases. Tesis Licenciatura, Facultad de Química, UNAM. México D.F.
13. Toldrá, F., Flores, M. (2004). Handbook of Food Analysis: Methods and instruments in applied food analysis. 2ª ed. Marcel Dekker Incorporated, New York, USA, pp. 409–429.
14. McNair, H., Miller, J. (1998). Basic Gas Chromatography. 2ª ed. John Wiley & sons. New York, USA, pp. 153-156.
15. Skoog, D., Holler, J., Crouch, S., West, D. (2005). Fundamentos de Química Analítica. 8ª ed. Thomson, Madrid, España.

16. Skoog, D., Holler, J., Hieman, T. (2001) Principios de Análisis Instrumental. 5ª ed. McGraw Hill, Madrid, España.
17. Harris, D., (2001). Análisis Químico Cuantitativo. 2ª ed. Reverte S.A., California, USA.
18. Villegas, R. (2007). Determinación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP's) en Mezcal por Cromatografía de Gases y Espectrometría de Masas (CG-EM). Tesis Licenciatura, Facultad de Química, UNAM. México, D.F.
19. Skoog, D., Leary, J. (1994). Análisis Instrumental. 4ª. ed. McGraw Hill, Madrid, España.
20. Jiao, J., Ding, N., Shi, T., Chai, X., Cong, P., Zhu, Z., (2011). Study of chromatographic fingerprint of the flavor in beer by HS-SPME-GC. Analytical Letters: 44 (4) , pp. 648-655.
21. Riu, A. (2005). Caracterización de compuestos volátiles en bebidas derivadas de frutas Tesis de Doctorado, Universidad de Barcelona, España.
22. Pawliszyn, J. (1997). Solid Phase Microextraction, theory and practice. 1ª ed. Wiley-VCH, New York, USA.
23. Severiano, P., Gómez, D., Méndez, C., Pedrero, D., Utrera, M., Barrios, E. (2012). Manual de Evaluación Sensorial. 1ª ed. Facultad de Química, UNAM, México. D. F.
24. Carmona, R. (2008). Perfil Sensorial y círculo aromático del Tequila. Tesis Licenciatura, Facultad de Química, UNAM. México. D. F.

25. Cabrera, R., Ramírez, E., Ramón, L., Juárez, J., Hernández, J., Hernández, M., López, J., Gómez, T. (2011). Comparación del desempeño de paneles no entrenados pertenecientes a diferentes zonas productoras del queso fresco "cuajada" en Oaxaca, México. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*: 2 (1) pp. 127-141.
26. Dijksterhuis, G. (1996). Procrustes Analysis in Sensory Research. *Data Handling in science and technology*: 16, pp. 185-219.
27. Reyes, D. (2006). Determinación de los principales compuestos orgánicos del mezcal por cromatografía de gases capilar espectrometría de masas. Tesis Licenciatura, Facultad de Química, UNAM. México. D. F.
28. Cordente, A., Curtin, C., Varela, C., Pretorius, I., (2012). Flavour-active wine yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*: 96 (3), pp. 601-618.
29. Horak, T., Culik, J., Kellner, V., Jurkova, M., Cejka, P., Haskova, D., Dvorak, J. (2010). Analysis of selected esters in beer: Comparison of solid-phase microextraction and stir bar sorptive extraction. *Journal of the Institute of Brewing*: 116 (1), pp. 81-85.
30. Hough, H. (2001). *Biotecnología de la cerveza y de la malta*. 1ª ed. Acribia, Zaragoza, España.
31. Henryk, J., Wlazły, K., Waü sowicz, E., Kamin, E. (1998). Solid-Phase Microextraction for the Analysis of Some Alcohols and Esters in Beer: Comparison with Static Headspace Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*: 46 (4), pp. 1469-1473.
32. Verstrepen, K., Derdelinckx, G., Dufour, J., Winderickx, J., Pretorius, I., Delvaux, F. (2003). Flavor-active esters: adding fruitiness to beer. *Journal of Bioscience and Bioengineering*: 96 (2), pp. 110-118.

33. Steinhaus, M., Fritsch, H., Schieberle, P. (2003). Quantitation of (R)-and (S)-Linalool in Beer Using Solid Phase Microextraction (SPME) in Combination with a Stable Isotope Dilution Assay (SIDA). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*: 51(24), pp. 7100-7105.
34. Rodriguez, J., Muñoz, C., Martín, P., Lázaro, E., Mancebo, R., Castañé, J., Pozo, M. (2012). Optimization of a HS-SPME-GC-MS Procedure for Beer Volatile Profiling Using Response Surface Methodology: Application to Follow Aroma Stability of Beers Under Different Storage Conditions. *Food Anal. Methods*: 5, pp.1386–1397
35. Takoi, K., Koie, K., Itoga, Y., Katayama, Y., Shimase, M., Nakayama, Y., Watari, J. (2010). Biotransformation of hop-derived monoterpene alcohols by lager yeast and their contribution to the flavor of hopped beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*: 58(8), pp. 5050-5058.
36. The Good Scents Company is introducing Perflavory
Consultado en:
<http://www.thegoodscentscompany.com/>;
Consultado el 4 de mayo de 2013.
37. Praet, T., Opstaele, F., Jaskula, B., Aerts, G., De Cooman, L. (2012). Biotransformations of hop-derived aroma compounds by *Saccharomyces cerevisiae* upon fermentation. *Cerevisia*: 36 (4), pp. 125-132.
38. Una aplicación del análisis de componentes principales en el área educativa
Consultado en:
http://iies.faces.ula.ve/Revista/Articulos/Revista_09/Pdf/Rev09Gonzalez_Diaz.pdf
Consultado el 17 de marzo de 2013.
39. A Tutorial on Principal Component Analysis
Consultado en:
<http://www.sn1.salk.edu/~shlens/pca.pdf>
Consultado el 17 de marzo de 2013.

40. da Silva, G., Mareto, D., Bolini, H., Teófilo, R., Augusto, F., Poppi, R. (2012). Correlation of quantitative sensorial descriptors and chromatographic signals of beer using multivariate calibration strategies. *Food Chemistry*: 134, pp. 1673–1681.
41. Liu, M., Zeng, Z., Xiong, B. (2005). Preparation of novel solid-phase microextraction fibers by sol–gel technology for headspace solid-phase microextraction-gas chromatographic analysis of aroma compounds in beer. *Journal of Chromatography*: 1065, pp. 287–299.
42. O'Mahony, M. (1986). *Sensory evaluation of food: Statistical methods and procedures*. 1^a ed. M. Dekker, New York, USA,. Tabla G-16
43. Gains, N., Thomson, D. (1990). Sensory Profiling of Canned Lager Beers using Consumers in their own Homes. *Food quality and preference*: 2, pp. 39-47.