



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

Cuantificación de compuestos que contribuyen  
en el aroma de la cerveza por microextracción  
en fase sólida seguida por cromatografía de  
gases-espectrometría de masas.

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**QUÍMICA**

PRESENTA:

**Ana Cristina Heredia Roldán**



México, D.F.

2015



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Araceli Patricia Peña Álvarez

**VOCAL:** Nuria Esturau Escofet

**SECRETARIO:** Gloria García Ramírez

**1er. SUPLENTE:** Silvia Citlalli Gama Gonzalez

**2do. SUPLENTE:** Patricia Díaz Arista

## **SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:**

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

**ASESORA:**

\_\_\_\_\_

Dra. Araceli Patricia Peña Álvarez

**SUPERVISORA:**

\_\_\_\_\_

Mtra. Rocío del Carmen Juárez Cipres

**SUSTENTANTE:**

\_\_\_\_\_

Ana Cristina Heredia Roldán

# Índice

RESUMEN.....	5
JUSTIFICACIÓN .....	6
OBJETIVOS	
Objetivo general .....	7
Objetivos particulares.....	7
1. INTRODUCCIÓN .....	8
2. ANTECEDENTES	
2.1 Bebidas alcohólicas.....	10
2.1.1 Bebidas alcohólicas destiladas.....	10
2.1.2 Bebidas alcohólicas fermentadas no destiladas .....	10
2.2 Cerveza .....	11
2.2.1 Clasificación .....	12
2.2.1.1 Cervezas tipo Lager .....	12
2.2.1.2 Cervezas tipo Ale .....	13
2.2.2 Composición de la cerveza .....	15
2.2.2.1 Congenéricos .....	15
2.3 Cromatografía.....	17
2.3.1 Cromatografía de gases .....	17
2.4.1.1 Instrumentación .....	18
2.5 Análisis cualitativo .....	27
2.6 Análisis cuantitativo.....	27
2.6.1 Curvas de calibración .....	27
2.7 Preparación de muestra .....	28
2.7.1 Microextracción en fase sólida .....	29
3. DESARROLLO EXPERIMENTAL	
3.1 Materiales, reactivos y estándares .....	33
3.2 Muestras.....	33
3.3 Condiciones cromatográficas .....	34

3.3.1 Cromatógrafo de gases.....	34
3.3.2 Cromatógrafo de gases- espectrometro de masas.....	34
3.4 Optimización.....	35
3.4.1 Terpenos .....	35
3.4.2 Ésteres etílicos .....	35
3.5 Metodología .....	36
3.5.1 Caracterización de terpenos y ésteres etílicos .....	38
3.5.2 Cuantificación de terpenos y ésteres etílicos .....	38
3.5.2.1 Terpenos.....	38
3.5.2.2 Ésteres etílicos.....	39
4. RESULTADOS	
4.1 Optimización de la metodología.....	40
4.1.1 Terpenos .....	40
4.1.2 Ésteres etílicos .....	41
4.2 Compuestos volátiles y semivolátiles en cervezas .....	41
4.3 Análisis cualitativo de terpenos y ésteres etílicos .....	44
4.3.1 Identificación de terpenos.....	44
4.3.2 Identificación de ésteres etílicos .....	45
4.4 Cuantificación de terpenos.....	47
4.5 Cuantificación de ésteres etílicos .....	49
CONCLUSIONES.....	54
ANEXO I	
Curvas de calibración terpenos .....	56
Curvas de calibración ésteres etílicos.....	58
REFERENCIAS.....	59

# Resumen

---

El sabor de la cerveza es consecuencia de una gran cantidad de compuestos, entre los más importantes en cuanto al aroma y sabor se encuentran los: alcoholes, ésteres, terpenos y carbonilos. Por esta razón el objetivo de éste trabajo fue la identificación de compuestos orgánicos volátiles y semivolátiles así como la cuantificación de terpenos y ésteres etílicos mayoritarios presentes en cervezas mexicanas tipo Lager y Ale por microextracción en fase sólida (SPME, por sus siglas en inglés) seguido de cromatografía de gases–espectrometría de (CG-MS, por sus siglas en inglés). Con la metodología desarrollada y optimizada se identificaron 25 compuestos orgánicos volátiles y semivolátiles. Las cervezas estudiadas fueron seleccionadas debido a su alto consumo y fueron: Minerva Pale Ale, Minerva Stout Imperial, Tecate, Corona, Negra Modelo y Victoria. Los ésteres etílicos cuantificados fueron: heptanoato de etilo (EE7), Octanoato de etilo (EE8), nonanoato de etilo (EE9), decanoato de etilo (EE10), dodecanoato de etilo (EE12) y 2-fenil acetato de etilo. El éster etílico de mayor concentración en las cervezas tipo Lager y en las tipo Ale fue el EE8, la mayor concentración se determinó en la cerveza Tecate ( $615 \mu\text{g/L}$ ) que le confiere una nota sensorial a pera y piña siendo el umbral de percepción olfativo de  $5 \mu\text{g L}^{-1}$ . Por otro lado, el EE9 identificado en la cerveza Tecate, Minerva Pale Ale y Minerva Stout Imperial con una concentración de  $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$ , fue el éster etílico de menor concentración su umbral de percepción es de  $13 \mu\text{g L}^{-1}$ . Se observó que la concentración de los ésteres etílicos es muy variable independientemente del tipo de cerveza. El linalol, citronelol y geraniol fueron los terpenos mayoritarios cuantificados. La concentración de estos en las cervezas tipo Ale fue mayor que en las tipo Lager, sin embargo el linalol fue el terpeno de mayor concentración en ambos tipos de cerveza. La mayor concentración de linalol cuantificado fue en la cerveza Minerva Pale Ale ( $38 \mu\text{g L}^{-1}$ ) el cual confiere notas florales y herbales su umbral de percepción es de  $100 \text{ng L}^{-1}$ . El geraniol únicamente se determinó en las cervezas tipo Ale, la mayor concentración fue en la cerveza Minerva Pale con  $28 \mu\text{g L}^{-1}$  que otorga un aroma a rosas sabiendo que el umbral de percepción es de  $130 \text{ng L}^{-1}$ .

# Justificación

---

Las características organolépticas de la cerveza son debidas a la diversidad de compuestos orgánicos volátiles presentes. Por lo que es importante su identificación y cuantificación. Entre los compuestos mayoritarios se encuentran los terpenos y ésteres etílicos los cuales dependiendo de su concentración dan diversas notas sensoriales que permiten una diferenciación entre las cervezas tipo Lager y Ale.

# Objetivos

---

## **Objetivo general**

Identificar compuestos orgánicos volátiles y semivolátiles y cuantificar los terpenos y ésteres etílicos mayoritarios presentes en cervezas mexicanas tipo Lager y Ale por microextracción en fase sólida seguida de cromatografía de gases-espectrometría de masas.

## **Objetivos particulares**

- Identificar los compuestos volátiles y semivolátiles presentes en algunas cervezas mexicanas.
- Realizar la cuantificación de los principales terpenos y ésteres etílicos en las muestras de cerveza tipo Lager y Ale.
- Determinar las diferencias en el perfil aromático entre las cervezas tipo Lager y Ale.



# 1. Introducción

---

La industria cervecera es una de las actividades económicas más importantes a nivel mundial. En México ha llegado a representar el 33% de la producción total anual de la rama industrial de alimentos y bebidas y poco más del 50% del ingreso por ventas que se generan en dicha rama<sup>3-5</sup>. De aquí el interés de diversos países por estudiar su composición química.

Desde el punto de vista de la composición, la cerveza es una matriz muy compleja. La cantidad de componentes conocidos excede los 800 compuestos, muchos de los cuales contribuyen al sabor. Los primeros estudios sobre la composición química y su relación con el sabor fueron realizados por Meilgaard en 1982<sup>6</sup>.

La presencia de diversos compuestos en cervezas internacionales se ha determinado por diferentes técnicas de preconcentración, técnicas de destilación, extracción líquido-líquido, extracción en fase sólida<sup>3,7-9</sup>. Con la miniaturización de las técnicas analíticas el desarrollo de la microextracción en fase sólida y la extracción por sorción con barra magnética<sup>8</sup> (SBSE, por sus siglas en inglés), permitieron el desarrollo y trajeron diversas ventajas ante las técnicas tradicionales<sup>9</sup>.

En un trabajo previamente reportado<sup>12</sup> se identificaron los compuestos volátiles de la cerveza siendo los principales: alcoholes superiores, ésteres etílicos y terpenos. Con respecto a la cuantificación de terpenos y ésteres etílicos en cervezas mexicanas no se conocen trabajos reportados.

Los ésteres etílicos y terpenos desempeñan un importante papel dentro de las características organolépticas de la cerveza, confiriéndole en general características florales y frutales. Su producción está ligada a diversos factores como: las condiciones de fermentación, la composición del mosto, la composición del lúpulo y los microorganismos empleados para su elaboración<sup>13</sup>.

Casi todos los olores de la cerveza nos remiten al lúpulo, al cereal y a los procesos fermentativos. Los aromas especiados, herbales, florales, resinoso, frutales, etc. son debidos (la mayoría de las veces) a las diferentes variedades de lúpulo y sus diferentes aceites esenciales generalmente terpénicos. Los olores a pan, caramelo, café, chocolate, tostado, frutas, pasas, entre otros, son debidos al cereal y los diferentes grados de malteado. De los procesos fermentativos la variedad de aromas que surgen es amplísima, pero podemos destacar los alcoholes y los ésteres etílicos. Los cuales confieren los aromas frutales (cereza, manzana, fresa, plátano, etc.) a la cerveza<sup>14</sup>.

En el presente trabajo se desarrolló una metodología para la identificación de compuestos orgánicos volátiles y semivolátiles así como la cuantificación de terpenos y ésteres etílicos mayoritarios presentes en cervezas mexicanas tipo Lager y Ale por microextracción en fase sólida seguida de cromatografía de gases-espectrometría de masas.

## 2. Antecedentes

---

### 2.1 Bebidas alcohólicas

Una bebida alcohólica es aquella obtenida por fermentación, principalmente alcohólica de la materia prima vegetal que sirve como base utilizando levaduras del género *Saccharomyces*, sometida o no a destilación, rectificación, redestilación, infusión, maceración o cocción en presencia de productos naturales, susceptibles de ser añejadas, que pueden presentarse en mezclas de bebidas alcohólicas y pueden estar adicionadas de ingredientes y aditivos, con una graduación alcohólica de 2% a 55% en volumen a 20°C (293K)<sup>15</sup>. En general se clasifican en destiladas y no destiladas.

#### 2.1.1 Bebidas alcohólicas destiladas

Son un producto obtenido por destilación de líquidos fermentados que se hayan elaborados 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, siempre y cuando el destilado no haya sido rectificado totalmente, por lo que el producto deberá contener las sustancias secundarias formadas durante la fermentación y que son características de cada bebida, con excepción del vodka, susceptibles de ser abocadas y en su caso añejadas o maduradas, pueden estar adicionadas de ingredientes y aditivos permitidos<sup>16</sup>.

#### 2.1.2 Bebidas alcohólicas fermentadas no destiladas

Son el producto resultante de la fermentación principalmente alcohólica de materias primas de origen vegetal, pueden adicionarse de ingredientes y aditivos<sup>15</sup>. Dentro de esta clasificación encontramos a la cerveza.

## 2.2 Cerveza

Bebida fermentada elaborada con malta, lúpulo y agua potable, o con infusiones de cualquier semilla farinácea procedente de gramíneas o leguminosas, raíces o frutos. Los porcentajes de las materias primas empleadas para la elaboración de éste producto, obedecerán a lo que señale la norma en cuanto a feculentos o azúcares como adjuntos de la malta, con adición de lúpulos o sucedáneos en éstos<sup>17</sup>. El proceso general de elaboración de la cerveza se ilustra en la Fig.1.

La cerveza puede ser clara, semiobscura y negra, con especificaciones físicas y químicas como:

✚	Peso específico a 20°C:	min. 0.998	max. 1.018
✚	Extracto real %:	min. 0.95	max. 6.5
✚	Alcohol por volumen °GL:	min. 2.00	max. 6.00
✚	pH:	min. 5.00	max. 6.0

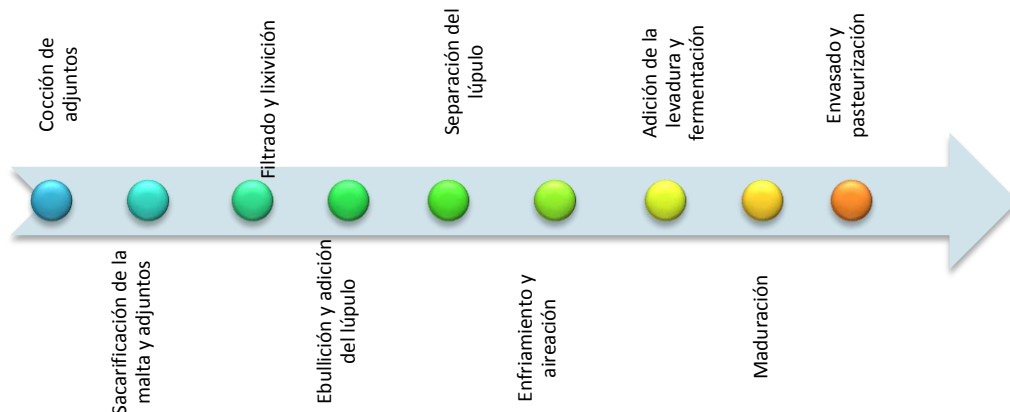


Fig.1. Proceso de elaboración de la cerveza.

### 2.2.1 Clasificación

La fermentación alcohólica para la producción de cerveza se efectúa en el mosto lupulado utilizando un cultivo puro de levadura cervecera. De acuerdo con la levadura utilizada existen dos tipos de cervezas: Lager y Ale, con características diferentes en el aroma y sabor del producto final.<sup>18</sup> (Tabla 1)

**Tabla 1.** Principales características y diferencias entre las cervezas tipo Lager y tipo Ale.

Características	Lager	Ale
Levadura	Hongo <i>Saccharomyces pastorianus</i>	Hongo <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
T. inicial de fermentación	7-11°C	10-15°C
Características del mosto	Menor gravedad	Mayor gravedad
Duración del proceso	8 - 10 días	72 horas

#### 2.2.1.1 Cervezas tipo Lager

Son el tipo de cerveza más consumida en el mundo; se estima que 9 de cada 10 cervezas consumidas son de éste tipo. La mayoría de las cervezas industriales son Lager y se distinguen por tener un color amarillo claro, con sabores ligeros en donde se pueden percibir sabores a lúpulo, aromas de flores y que tiene una tendencia a saber un poco seco al final<sup>19</sup>. El problema de estas cervezas creadas en masa, es que sus sabores son muy claros. No todas las cervezas Lager cumplen con éstas características, existen muchas Lager que no son claras, pueden ser oscuras, con sabores fuertes y sabores ahumados. En la Tabla 2 se muestra su clasificación.

**Tabla 2.** Clasificación de cervezas tipo Lager

Subtipo	Características	Marcas en México
<b>Pilsener, Hell, Pale</b>	Clara (dorado ámbar), alto nivel de lúpulo (amarga), dulces o secas, buena carbonatación.	Bohemia, Superior, Modelo especial, Coronel
<b>Dortmunder</b>	Similar pero con menos lúpulo y más ligera, seca.	Tecate, Corona, Sol, XX Lager especial
<b>Munich, Dunkel, Dark</b>	Oscura, sabor a malta, dulce, aromática, amargo moderado, mucho cuerpo	Negra modelo, León
<b>Bock, Marzen, Marzenbier</b>	Clara, semiobscura u obscura, muchísimo cuerpo, contenido alcohólico alto, alto nivel de lúpulo (amarga), madurada 3 a 4 meses (muy aromática).	Noche buena
<b>Doppelbock</b>	Con más cuerpo y más alcohol, muy aromática.	No hay
<b>Eisbock</b>	Destilada por congelamiento: muchísimo cuerpo y muy alto contenido alcohólico (hasta 18%)	No hay
<b>Viena</b>	Semiobscura, ligera (poco cuerpo), sabor a malta y ligeramente dulce.	Indio, Victoria, Santa Fe, Minerva

La levadura utilizada en las cervezas Lager es *Saccharomyces pastorianus* considerada una levadura baja o de fermentación baja debido a que al final de la fermentación flocculan y los flóculos se hunden en el mosto, éstos se separan por decantación. Para las Lager la fermentación inicia entre 7-11°C, se incrementa entre 10-15°C a los 3-5 días y desciende a los valores iniciales. Su fermentación dura 8-10 días<sup>19</sup>.

### 2.2.1.2 Cervezas tipo Ale

Son el grupo de cervezas que utilizan levaduras de fermentación alta. El término Ale se refiere al tipo de fermentación y nada tiene que ver con el color, estilo o cuerpo de la cerveza. Las cervezas Ale pueden ser claras u oscuras, tener mucho o poco cuerpo, alta o

baja graduación alcohólica y ser más o menos amargas. Todo depende, entre otras cosas, de la cantidad y tipo de malta que se utilice, del lúpulo y la maduración que experimente<sup>20</sup>.

La levadura de las cervezas tipo Ale es *Saccharomyces cerevisiae* levadura de fermentación alta, debido a que al final de la fermentación flocula y los flóculos suben a la superficie, estos se separan como nata o por succión, su clasificación se observa en la Tabla 3 . La fermentación de las cervezas Ale inicia entre 15-16°C, posteriormente se incrementa entre 21-22°C a las 36 horas y desciende a los valores iniciales. Su fermentación dura aproximadamente 72 h<sup>19</sup>.

**Tabla 3.** Clasificación de cervezas tipo Ale

Subtipo	Características	Marcas en México
<b>Pale Ale</b>	Cerveza clara (cobre), mucho cuerpo, fuertemente lupulada (muy amarga), poco dulce, afrutada.	Coyote, Minerva
<b>Bitter</b>	De barril, más amarga, color cobrizo, fuertemente lupulada (muy amarga), seca, afrutada.	No hay
<b>Brown Ale</b>	Obscura, menos alcohol, poco lúpulo, dulce, afrutada.	No hay
<b>Mild Ale</b>	Semiobscura, dulce, ligera, moderadamente amarga, bajo contenido alcohólico, afrutada.	No hay
<b>Indian Pale Ale</b>	Mayor contenido alcohólico y fuertemente lupulada,	No hay
<b>Stout, Porter</b>	Muy obscura (negra), mucho cuerpo y lúpulo, sabores tostados, afrutada, espuma consistente.	Luna Llena, Minerva
<b>Abadía</b>	Producidas por cervecerías comerciales bajo la licencia de una abadía con receta tradicional.	No hay
<b>Trappist</b>	Muy alcohólica (hasta 12.5%), mucho sabor y cuerpo, color cobrizo oscuro, ligeramente turbia, muy amarga, ácida, afrutada	No hay
<b>Kölsch, Colonial</b>	Clara a semiobscura, cuerpo y contenido de alcohol moderados, amargo moderado, afrutada.	Minerva

## **2.2.2 Composición de la cerveza**

El sabor de la cerveza es consecuencia de una mezcla muy compleja de gran cantidad de compuestos. Los compuestos más importantes se encuentran en diferentes proporciones agrupados en: alcoholes, ésteres etílicos, terpenos y carbonilos<sup>21</sup>. En general a éstos compuestos se les llama congéneres o congénéricos.

### **2.2.2.1 Congénéricos**

Los congénéricos son sustancias producidas por la levadura en pequeñas concentraciones que contribuyen al sabor de las bebidas alcohólicas<sup>20</sup>. El origen de los congénéricos se encuentra principalmente en la cepa de levadura y otros microorganismos presentes durante la fermentación. También la materia prima contribuye en la aportación de congénéricos algunos de los cuales permanecen inalterados durante la fermentación<sup>22</sup>. En general los factores que afectan la formación de congénéricos son: la cepa de levadura, la temperatura de fermentación, el tipo y concentración de azúcares fermentables, etc<sup>18</sup>.

Los compuestos congénéricos son esenciales en el aroma y sabor de la cerveza dependiendo de su concentración pueden otorgarle características organolépticas desde muy agradables hasta desagradables.

#### **2.2.2.1.1 Terpenos**

Son una familia de compuestos diversos que tienen esqueletos formados por unidades de isopentilo (isopreno). Los terpenos en la cerveza se suelen aislar de los aceites esenciales pertenecientes al lúpulo, conos maduros de la flor femenina de la planta *Humulus lupulus*, la cual además confiere el sabor amargo a la cerveza. Las notas de lúpulo de la espuma son descritas como cítricas, florales, frutales, aromáticas o amargas. Los terpenos también



se pueden obtener durante el proceso de fermentación que se lleva a cabo en la cerveza<sup>16,23</sup>, sus principales notas sensoriales se observan en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Principales notas sensoriales de los terpenos<sup>2</sup>.

Monoterpenoles	Descriptor olfativo	Umbral de percepción (ng L <sup>-1</sup> )
Linalol	Herbal, floral	100
Nerol	Rosas	400
Geraniol	Rosas, cera	130
Citronelol	Rosas, cítricos	100
$\alpha$ -Terpineol	Coníferas, pino	450

#### 2.2.2.1.2 Ésteres etílicos

Los ésteres etílicos son los derivados de ácido más frecuentes. Se encuentran en los aceites esenciales del lúpulo, dando lugar a los aromas afrutados que se asocian a sus flores y frutos maduros, éstos también se forman durante la etapa de fermentación mediante la esterificación de un ácido con el etanol, alcohol más abundante en el proceso de elaboración de la cerveza<sup>16</sup>. En la Tabla 5 se observan sus principales notas sensoriales.

Los ésteres etílicos pueden participar en los puentes de hidrógeno como aceptores de hidrógeno, pero no pueden participar como donadores, esta falta de capacidad de actuar como donador de hidrógeno ocasiona que no se puedan formar puentes de hidrógeno entre moléculas de ésteres, lo que los hace más volátiles que un ácido o alcohol de similar peso molecular<sup>16</sup>, sus principales notas sensoriales se observan en la Tabla 5.

En la actualidad el principal método para la identificación de compuestos relacionados al sabor en alimentos y bebidas es la cromatografía de gases y la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

**Tabla 5.** Principales notas sensoriales de los ésteres etílicos<sup>1</sup>.

Ésteres etílicos	Descriptor olfativo	Umbral de percepción (ng L <sup>-1</sup> )
2-fenil acetato de etilo	Miel, rosa, violetas	14,00
EE7	Manzana, plátano	5,000
EE8	Pera, piña, manzana	25,000
EE9	Afrutado, rosado	13,00
EE10	Fruta madura, plátano	20,000
EE12	Floral, afrutado	8,000

## 2.3 Cromatografía

La Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC, por sus siglas en inglés) la define como un método físico de separación en el cual los componentes (analitos de una muestra) al ser separados se distribuyen en dos fases: la fase estacionaria y la fase móvil<sup>24</sup>.

Generalmente 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<sup>25</sup>.

### 2.3.1 Cromatografía de gases

Técnica de separación donde los componentes de una muestra vaporizada son transportados hacia el sistema de separación (columna) mediante un gas acarreador. Los componentes se separan con base en su presión de vapor relativa y su afinidad por la fase estacionaria. Los componentes separados salen del sistema de separación y llegan a un detector, a éste proceso se le denomina elución<sup>24,26</sup>.

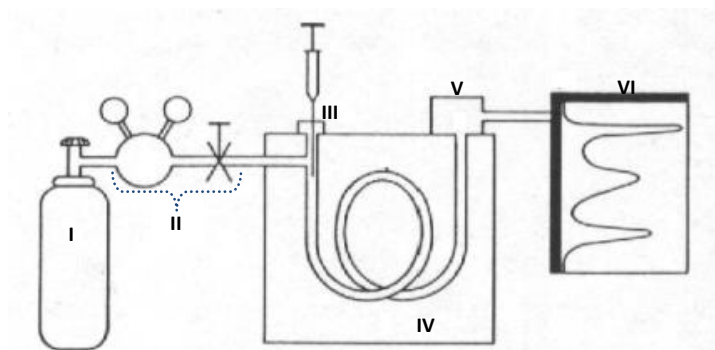
Las principales ventajas y limitaciones de la cromatografía de gases se presentan en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Ventajas y limitaciones de GC.

Ventajas	Limitaciones
Alta resolución	Sólo para muestras volátiles
Velocidad (análisis rápidos)	Necesario eliminar interferencias
Sensibilidad	Deficiente para análisis cualitativos
Sencillez	Deficiente en análisis preparativos
Resultados cuantitativos	
Poca cantidad de muestra	

### 2.4.1.1 Instrumentación

En la Fig. 2 se muestra el esquema general de un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas.



**Fig.2.** Esquema de un cromatógrafo de gases.

En general un cromatógrafo de gases se divide en siete partes

- I. Sistema o fuente de fase móvil
- II. Sistema neumático
- III. Sistema de introducción de muestra o inyección
- IV. Sistema de separación
- V. Sistema de detección

## VI. Sistema de registro

El gas acarreador (fase móvil), debe ser un gas inerte y puro (99.999%) que no reaccione con la muestra ni la fase estacionaria, normalmente He, N<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, almacenados en tanques con una presión entre 1000 y 3000 psi. La elección del gas acarreador depende del detector, la eficacia y la rapidez de separación deseadas<sup>27</sup>.

El caudal del gas portador se controla cuidadosamente para obtener tiempos de retención reproducibles, disminuir al mínimo la deriva y los ruidos del detector así como para la eficiencia de la columna. El sistema de flujo es un regulador de dos etapas conectado al cilindro con el gas portador. Se recomienda utilizar un caudal mínimo de 20 psi<sup>26</sup>.

Los dispositivos de inyección de muestras para cromatografía de gases tienen la misión de vaporizar la muestra a analizar e incorporarla a la corriente de gas portador que se dirige hacia la columna. La vaporización e introducción de las muestras en el sistema, debe realizarse cumpliendo una serie de requisitos:

- ✚ La vaporización de la muestra debe ser lo más rápida posible.
- ✚ La vaporización debe realizarse sin discriminar ningún componente de la muestra.
- ✚ La muestra debe llegar a la columna como una banda lo más fina posible, que contenga un intervalo mínimo entre el “frente” y “cola” de la banda (pico)<sup>26</sup>.

Casi todos los cromatógrafos de gases tienen una entrada metálica que se calienta. En las cámaras de inyección el gas portador debe precalentarse para asegurar una rápida vaporización, el diafragma debe mantenerse frío para evitar la degradación térmica, el flujo debe ser suave y uniforme para evitar la transferencia exponencial de la muestra en la columna, la temperatura del horno debe mantenerse uniforme para que no haya descomposición térmica<sup>25</sup>.

Existen distintos modos de inyección para diferentes tipos de muestras. Si los analitos de interés constituyen más del 0.1% de la muestra es preferible una inyección con división

(inyección split) para introducir la muestra a la columna, de este modo sólo se introducirá entre el 0.2 y 2% de muestra en la columna.

Por medio de un inyector “split” el flujo de gas portador junto con la muestra vaporizada se divide en dos, una parte es introducida a la columna y la otra se escapa fuera del sistema a través de una válvula de aguja que permite regular la proporción de gas introducido a la columna (Fig.3). La válvula de “split” dispone de un sistema de apertura y cierre automáticos para que únicamente permita la salida del gas durante el proceso de inyección. Algunas de sus desventajas son: la división de la muestra provoca que las cantidades de analito que llegan al detector sean muy pequeñas, por lo que los límites de detección aumentan por tanto no es ideal para un análisis de trazas<sup>26</sup>.

En la técnica de inyección “splitless” o inyección sin división la totalidad de la muestra es inyectada y dirigida hacia la columna, ésta se mantiene durante la inyección a una temperatura inferior al punto de ebullición del componente más volátil de la muestra. La totalidad de la muestra inyectada se condensa en la cabeza de la columna, actuando en éste caso el disolvente condensado en la columna a modo de trampa donde se concentran los componentes a analizar (Fig.3). Transcurrido un tiempo adecuado, se abre la válvula de purga con el fin de barrer a la atmósfera el disolvente vaporizado que pudiera quedar en el inyector. Dado que no existe división de muestra esta técnica adecuada para análisis de trazas<sup>25-27</sup>.

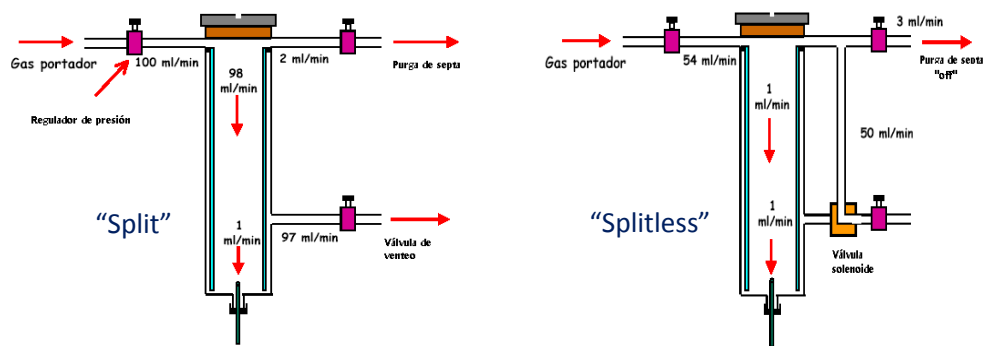
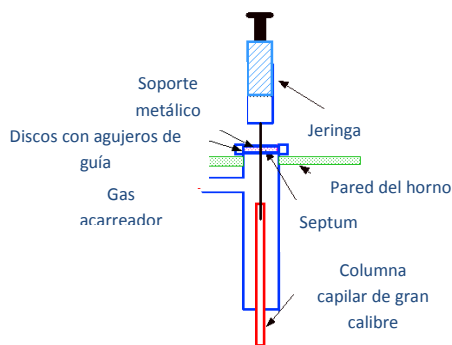


Fig.3. Esquema de un inyector con división (split) y sin división (splitless).

Los sistemas de inyección en frío en columna (normalmente conocidos por su nombre inglés “cold on-column”), han sido diseñados para posibilitar la introducción de muestras directamente en el interior de columnas capilares. Es evidente que la introducción de una muestra por medio de una jeringa directamente en el interior de una columna capilar (de 0,23 mm de diámetro interno), requiere la utilización de agujas extremadamente finas (suelen utilizarse agujas de sílice fundida de 0,15 mm de diámetro) que, en consecuencia, son incapaces de perforar un septum; la característica básica de un inyector “ cold on-column” (Fig.4), es la utilización de un sistema de válvulas y tubos de guía que permitan la introducción en el sistema de una aguja extremadamente fina.

En la inyección “cold on-column” la muestra es introducida directamente en la columna, manteniéndose ésta a una temperatura inferior al punto de ebullición del componente más volátil de la muestra. La gran ventaja que ofrece este sistema de inyección es que reduce la discriminación entre los componentes de la muestra prácticamente a cero<sup>28</sup>.

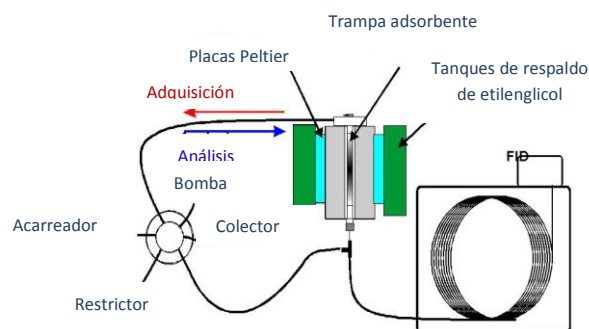


**Fig.4.** Esquema de un inyector “on-column”.

El inyector de vaporización con temperatura programada (PTV por sus siglas en inglés) que se observa en la Fig.5 generalmente tiene cinco modos operativos:

- ✚ El modo con división (split)
- ✚ El modo con división a pulsos (pulsed split) se aplica un pulso de presión al inyector durante la introducción de la muestra para acelerar el transporte de materia a la columna.

- ✚ El modo sin división (splitless)
- ✚ El modo sin división con pulsos (pulsed splitless) permite un pulso de presión durante la introducción de la muestra
- ✚ El modo de salida de disolvente (solvent vent) se utiliza para inyecciones de gran volumen. Se pueden realizar inyecciones individuales o múltiples para cada análisis.



**Fig.5.** Esquema de un inyector PTV.

Debido a los diversos modos de inyección y a la ventaja de inyecciones líquidas de gran volumen, en un intervalo de 5 a 25 $\mu$ l, el PTV se ha convertido en uno de los inyectores más utilizados<sup>28</sup>.

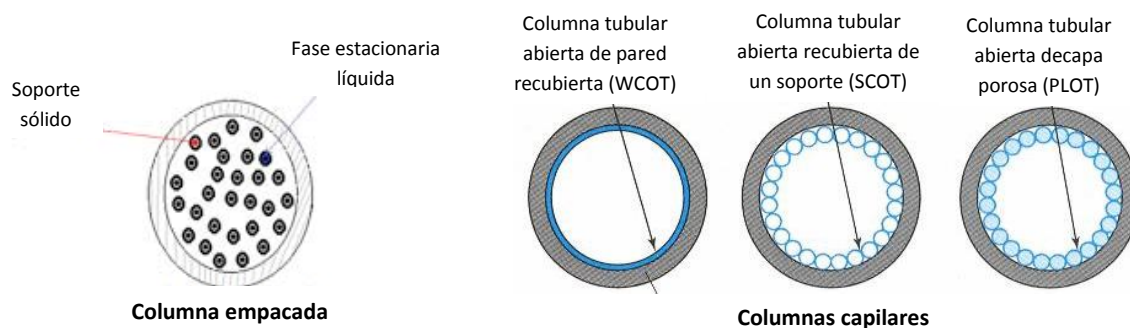
El sistema de separación está constituido principalmente por la columna dentro de un horno con termostato para que la separación pueda efectuarse a una temperatura reproducible y mantener la columna dentro de un amplio intervalo de temperaturas<sup>25</sup>.

La temperatura de la columna deberá ser suficientemente alta para que el análisis se efectúe en un plazo razonable y suficientemente baja para lograr la separación deseada. La temperatura programada se refiere a un aumento lineal de la temperatura de la columna con el tiempo. La programación de la temperatura es muy útil para muestras de mezclas con puntos de ebullición muy distintos<sup>26</sup>.

En cromatografía de gases las columnas utilizadas son empacadas y capilares (Fig.6). La mayoría de los análisis utilizan columnas capilares debido a su eficiencia, las columnas

capilares son de sílice fundida ( $\text{SiO}_2$ ), largas y estrechas, constan de dos partes principales: capilar y fase estacionaria. Una fina película (de 0,1 a 10,0  $\mu\text{m}$ ) de un polímero térmicamente estable y con un elevado peso molecular recubre la pared interna del capilar de diámetro pequeño (entre 0,05 y 0,53 mm de diámetro interno). Esta capa polimérica es a la que se le denomina fase estacionaria, de acuerdo con la composición de fase estacionaria que presentan existen 3 tipos de columnas capilares: con fase estacionaria líquida (WCOT), con fase estacionaria líquida sobre un soporte sólido (SCOT) y con partículas de fase estacionaria sólida (PLOT) (Fig.6)<sup>30</sup>.

Éste tipo de columnas ofrecen mayor resolución, eficiencia, sensibilidad y rapidez de análisis que las columnas empacadas<sup>24</sup>.



**Fig.6.** Esquema de columnas para GC.

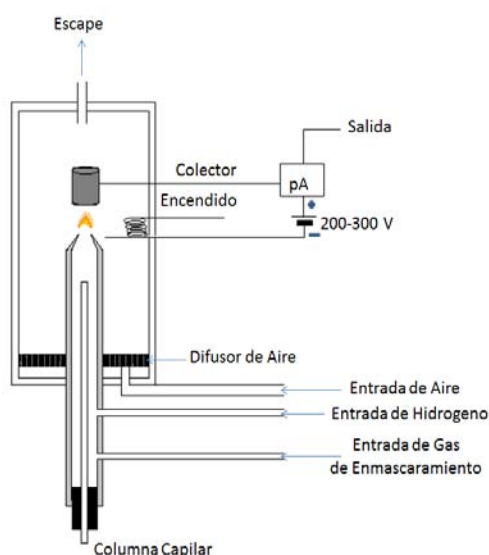
El detector cromatográfico es un dispositivo que mide la concentración de cada uno de los componentes de la muestra y genera una señal eléctrica proporcional a dicha concentración. Algunas de las características deseables para un detector son: sensibilidad (el detector genera una señal eléctrica grande para un determinado tamaño de muestra), amplio intervalo lineal, una respuesta selectiva o universal, bajo nivel de ruido y deriva<sup>2</sup>.

Existe una gran variedad de detectores: FID (detector por ionización de llama), TCD (detector por conductividad térmica), CCD (detector por combustión catalítica), ECD (detector por captura de electrones), entre otros. Elegidos dependiendo de la aplicación analítica, los límites de detección, la matriz y las normas regulatorias requeridos.



Uno de los detectores más utilizados es el detector de ionización de flama (FID) que se observa en la Fig.7 En este detector la muestra se mezcla con una corriente de hidrógeno que llega a una llama de oxígeno e hidrógeno, donde se quema y produce iones que son conducidos a un colector de iones gracias a un campo magnético de entre 200 y 300V, la corriente colectada es amplificada por un circuito de alta impedancia.

Éste tipo de detectores se operan a más de 250°C para evitar la condensación de agua y de muestras volátiles. Es un detector casi universal ya que responde a los compuestos que tengan carbonos sin importar su estructura, son robustos, sensibles, con amplio rango lineal y se adaptan a diversas columnas<sup>14</sup>.



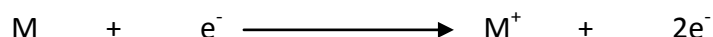
**Fig. 7.** Esquema de un detector de ionización de flama.

Un espectrómetro de masas es un potente detector para análisis cualitativo y cuantitativo de analitos en cromatografía de gases. La espectrometría de masas (MS, por sus siglas en inglés) es una técnica de análisis basada en la separación de acuerdo a las razones masa/carga de las especies cargadas formadas a partir de la ionización de una muestra. Se trata de una técnica extremadamente sensible, de gran versatilidad.

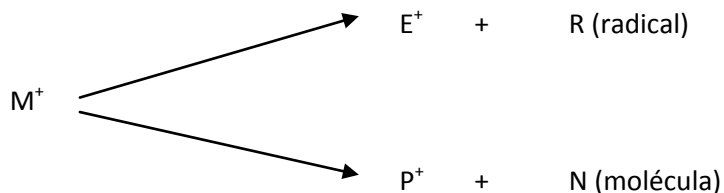
La MS suministra información muy valiosa sobre los compuestos químicos: la masa molecular, la fórmula global y, a partir del patrón de fragmentaciones, la estructura molecular así como la composición isotópica en sustancias naturales o marcadas. Para ello es necesario ionizar las moléculas, utilizando una separación cromatográfica previa, y obtener los iones formados en fase gaseosa. Este proceso tiene lugar en la fuente de ionización<sup>29</sup>.

Los iones generados son acelerados hacia un analizador y separados en función de su relación masa/carga ( $m/z$ ) mediante la aplicación de campos eléctricos, magnéticos ó simplemente determinando el tiempo de llegada a un detector. Los iones que llegan al detector producen una señal eléctrica que es procesada, ampliada y enviada a un ordenador. El registro obtenido se denomina espectro de masas y representa las abundancias iónicas obtenidas en función de la relación masa/carga de los iones detectados<sup>25</sup>.

Los fundamentos de la espectrometría de masas pueden ejemplificarse mediante la técnica de ionización electrónica donde electrones acelerados a través de un campo eléctrico adquieren energía cinética considerable y pueden interactuar con moléculas (M) para originar especies cargadas:

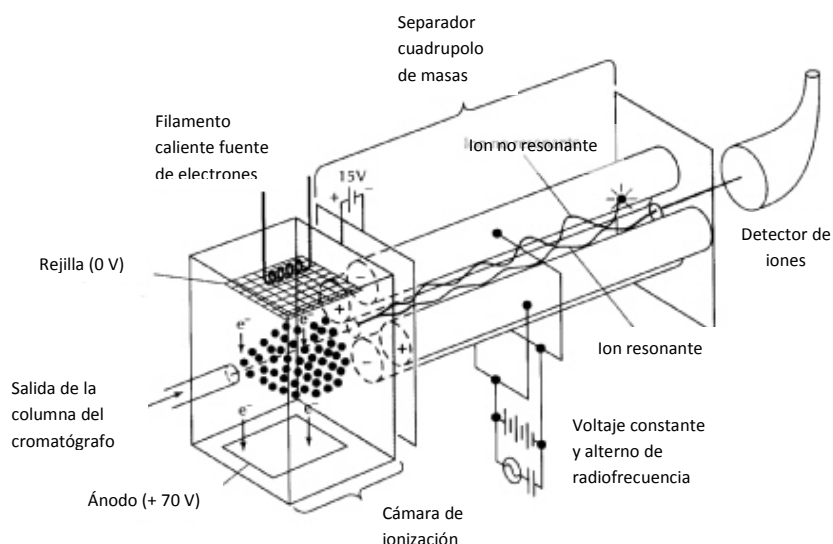


En este caso  $M^{+}$  es un catión-radical molecular. Normalmente  $M^{+}$  se forma en un estado excitado y puede sufrir fragmentación, que puede ser de diferentes formas:



Los iones  $E^+$  y  $P^+$  a su vez pueden fragmentarse y así sucesivamente. La forma de fragmentación dependerá en cada caso de la estructura molecular. La mayoría de los iones producidos tiene una carga correspondiente a la pérdida de un solo electrón ( $e = 1.6 \cdot 10^{-19} C$ ), aunque también se pueden obtener iones multicargados.

La masa se expresa en unidades de masa atómica. Los iones separados son detectados como corrientes iónicas cuyas intensidades son proporcionales a sus abundancias respectivas. Procesando esta información se obtiene el espectro de masas<sup>29</sup>.



**Fig.8** Esquema de un espectrómetro de masas cuadrupolar<sup>26</sup>.

El sistema de registro es un dispositivo electrónico que convierte la señal eléctrica procedente del detector en un cromatograma iónico el cual es un gráfico que representa la respuesta del espectrómetro de masas en función del tiempo de elución, éste proporciona la información necesaria para el análisis principalmente cuantitativo de los analitos de una muestra<sup>25</sup>.

## **2.5 Análisis cualitativo**

El análisis cualitativo tiene como objetivo identificar los componentes presentes en una muestra, es bien sabido que la GC por sí sola no es una buena técnica para el análisis cualitativo, pero su acoplamiento con un espectrómetro de masas crea una potente herramienta para el análisis cualitativo. Debido a que cada pico del cromatograma se identifica registrando su espectro de masas el cual se compara con una base de datos<sup>31</sup> mediante el perfil de fragmentación que presenta el compuesto y su ion molecular.

## **2.6 Análisis cuantitativo**

Con el objetivo de determinar la concentración de los componentes presentes en una muestra. Se prepara una curva de calibración (gráfica que muestra la respuesta del espectrómetro de masas en función de cantidades conocidas del analito). La mayoría de las veces se trabaja en una región en la que la curva de calibrado es lineal mediante el método de mínimos cuadrados<sup>26</sup>.

Algunos de los principales métodos de cuantificación son: estandarización interna, estandarización externa, adiciones patrón, factor de respuesta, entre otros.

### **2.6.1 Curvas de calibración**

La medida de la concentración mediante un método instrumental se basa en la existencia de una relación proporcional entre dicha concentración y la señal analítica o respuesta que genera un instrumento. Generalmente esta relación es lineal, de modo que puede expresarse como:

$$y = a + bC_A$$

Donde  $C_A$  es la concentración del analito,  $y$  la señal medida,  $a$  la ordenada en el origen y  $b$  la pendiente de la recta<sup>26</sup>.

La ecuación de la recta se obtiene mediante calibración con disoluciones de concentración conocida (disoluciones patrón) a partir de la medida de la señal analítica proporcionada por éstas. Los pares de valores concentración-síñal se ajustan a una recta, a partir de la cual puede obtenerse la concentración del analito en muestras desconocidas.

Para construir la curva de calibración primero se preparan patrones del analito que cubran un intervalo adecuado de concentraciones, y se mide la señal analítica proporcionada por los mismos. Posteriormente se traza un gráfico del área frente a la concentración de analito y se calcula la recta que mejor se ajusta a los datos mediante un ajuste por mínimos cuadrados. De esta forma se obtiene la pendiente ( $b$ ) y la ordenada al origen ( $a$ ) que definen la recta. Después se mide la señal analítica para las muestras desconocidas y se interpola en la recta de calibrado para obtener valores de concentración del analito. Para obtener la concentración de analito en la muestra hay que tener en cuenta las diluciones a las que se sometió<sup>27</sup>.

## **2.7 Preparación de muestra**

Es el proceso de transformación de una muestra en una forma adecuada para su análisis. Este proceso puede incluir la extracción de un analito de una matriz compleja, la preconcentración de analitos muy diluidos para obtener una concentración suficiente para ser medida, la eliminación o enmascaramiento de especies interferentes, o la transformación del analito en una forma que sea más fácilmente detectable<sup>26,32</sup>.

### 2.7.1 Microextracción en fase sólida

La microextracción en fase sólida (SPME, por sus siglas en inglés) es un método simple y eficiente, sin el empleo de disolventes, desarrollado por Janusz Pawliszyn en 1989. SPME es ideal para la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas. Todos los pasos de la extracción líquido-líquido convencional, tales como extracción, concentración y derivatización están integrados en un solo paso y un dispositivo, simplificando el procedimiento de preparación de la muestra<sup>32-33</sup>.

Combinando adsorbentes a base de sílice fundida y un recubrimiento polimérico, SPME es una técnica de enriquecimiento basada en la sorción de los analitos en dicho recubrimiento, seleccionado con base en la polaridad de los analitos (Tabla 7).

**Tabla 7.** Resumen de algunas fibras SPME disponibles comercialmente.

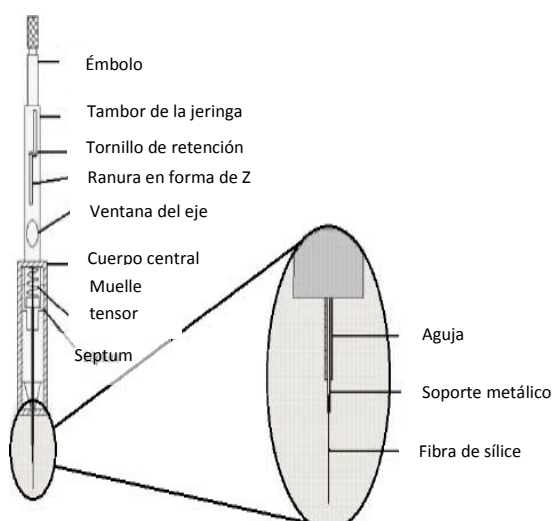
Recubrimiento de la fibra	Grosor de la película (µm)	Polaridad	Máx. temp. de operación (°C)	Compuestos que pueden analizarse
PDMS	100	No polar	280	Volátiles, no polares
PDMS	30	No polar	280	No polares, semivolátiles
PDMS	7	No polar	340	No polares y de media polaridad, semivolátiles
PDMS-Divinilbenceno	65	Polaridad media	270	Polares, volátiles
PDMS-DVB	60	Polaridad media	270	Cualquier propósito en general
Poliacrilato	85	Polar	320	Polares, semivolátiles (fenoles)
Carboxen-PDMS	75	Polar	320	Gases, volátiles

En un estudio realizado en el 2009 donde se evalúan distintos tipos de fibras para la extracción de compuestos volátiles en cerveza mayoritariamente ésteres etílicos, se observa que una de los recubrimientos con los que se extrae mayor cantidad de analitos es PDMS-DVB<sup>20,34</sup>.

Durante la adsorción de la muestra, el principio de extracción se basa en las normas generales de diferentes equilibrios, debido a las propiedades fisicoquímicas del polidimetilsiloxano (PDMS) éstas fibras son más utilizadas para los equilibrios gas-líquido o líquido-líquido y las Carboxen para equilibrios gas-sólido<sup>32</sup>.

La cinética de extracción está fuertemente influenciada por diferentes factores (cantidad de muestra, tiempo de equilibrio, tiempo de extracción, recubrimiento y grosor de película de la fibra, entre otros). Se sabe que el tiempo de equilibrio puede disminuirse con el uso de cualquier tipo de método de agitación (agitación con barra magnética, ultrasonidos, etc.), si se consigue una agitación ideal el tiempo de extracción depende sólo de la geometría de la fibra y los coeficientes de difusión del analito en la fibra. Una de las características más importante que determina el funcionamiento analítico de SPME es el tipo y el grosor del material de recubrimiento<sup>32</sup>.

En la Fig. 9 se muestra un esquema del dispositivo utilizado para SPME.



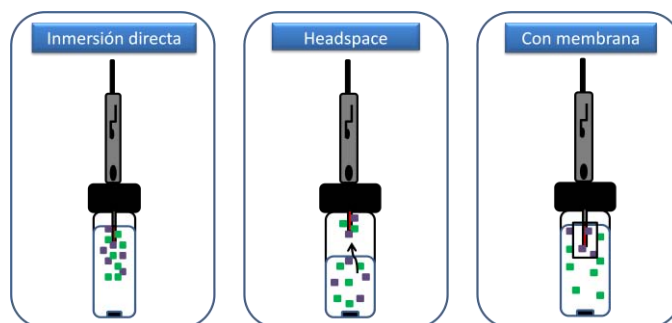
**Fig.9.** Esquema del dispositivo para SPME.

Para obtener resultados repetibles y reproducibles dentro de la técnica SPME-GC-MS es importante se determinen y controlen factores como la elección de la fibra con la que se extraerán los analitos, los tiempos de retención de los analitos mediante estándares, las condiciones ideales para realizar SPME como: cantidad de muestra, tiempo de equilibrio, tiempo de sorción, tiempo de desorción, agitación y calentamiento<sup>12,32</sup>.

Para SPME existen tres modos de muestreo: inmersión directa, headspace (HS), e inmersión con membrana (Fig.10), el modo de trabajo deberá ser elegido de acuerdo con el tipo de matriz que se posea y las características fisicoquímicas de los analitos de interés. Para una buena cuantificación es importante la elección correcta del modo de muestreo para SPME<sup>32</sup> (Tabla 8).

**Tabla 8.** Modos de muestreo para SPME.

Modo	Propiedades del analito	Muestras
<b>Directo</b>	Media o baja volatilidad	Gaseosas o líquidas
<b>Headspace</b>	Alta o media volatilidad	Líquidas y Líquidas complejas
<b>Con membrana</b>	Baja volatilidad	Complejas



**Fig.10** Esquema de los modos de muestreo con SPME.

La técnica HS-SPME mediante GC-MS es una herramienta que otorga una buena sensibilidad, permite la cuantificación de analitos presentes en muestras con concentraciones del orden de  $\text{mg L}^{-1}$  y en algunos casos hasta de  $\mu\text{g L}^{-1}$ <sup>35-36</sup>. Se considera de las mejores opciones para análisis relacionados con el sabor de diversas muestras



alimenticias y su perfil volátil debido a que permite el análisis sólo de la fracción volátil y no requiere de ningún proceso de limpieza de la muestra previo al análisis por GC<sup>11,21,37-40</sup>.

La extracción por HS-SPME se considera completa cuando la concentración de analito ha alcanzado el equilibrio de distribución entre el espacio de cabeza del vial que contiene la matriz de la muestra y el recubrimiento de la fibra, por lo cual las condiciones de equilibrio son determinantes en el proceso<sup>32</sup>.

Los factores que influyen dentro de la técnica de acuerdo con un estudio realizado para la cuantificación de alcoholes superiores en cervezas mexicanas<sup>12</sup> son: la velocidad de agitación, el tiempo de extracción, tiempo de desorción, temperatura de extracción y la adición de sal. Las condiciones óptimas obtenidas fueron: 1200 rpm, 30 min de extracción, 10 min de desorción térmica en el inyector del cromatógrafo y 50% de sal<sup>12</sup>.

En un estudio realizado en cervezas internacionales, se plantea la optimización del método de extracción de la fracción volátil de la cerveza por SPME, aquí evaluaron factores como la cantidad de muestra, la capacidad del vial, la adición de sal, el tiempo de equilibrio y el tiempo de extracción, llegando a condiciones similares de trabajo a las desarrolladas en el presente trabajo<sup>35</sup>.

# 3. Desarrollo experimental

---

## 3.1 Materiales, reactivos y estándares

- ✚ Balanza analítica Sartorius modelo CP124S.
- ✚ Vortex, Thermolyne; Barra magnética (1 cm), Spinbar.
- ✚ Fibra de sílice fundida (PDMS-DVB) con un espesor de película de 65µm y soporte de fibras para SPME (Supelco, USA).
- ✚ Material de vidrio Pyrex y Kimax: matraces volumétricos de 1, 2, 5, 10 y 25 mL, pipetas volumétricas de 1, 2, 3, 4, 5 y 10 mL.
- ✚ Viales de vidrio con capacidad para 8 mL, tapones con septas.
- ✚ Jeringas Hamilton de 10, 50 y 250 µL.
- ✚ Agua desionizada, Metanol, NaCl (J.T.Baker, USA)
- ✚ Estándares: linalol, citronelol y geraniol, pureza >97% (Fluka Chemika, Suiza), heptanoato de etilo, octanoato de etilo, nonanoato de etilo, decanoato de etilo, dodecanoato de etilo y 2-fenil etil acetato, pureza >99% (Nu-Chek Prep., USA).

## 3.2 Muestras

Las cervezas fueron adquiridas en supermercados. Las características de las muestras se enlistan en la Tabla 9.

**Tabla 9.** Características generales de las muestras analizadas

Muestra	Tipo	Subtipo	% Etanol (v/v)
Minerva Pale Ale	Ale	Pale Ale	6.0
Minerva Stout Imperial	Ale	Stout	6.0
Tecate	Lager	Dortmunder	5.6
Negra Modelo	Lager	Munich	5.3
Corona	Larger	Pilsener	4.6
Victoria	Lager	Viena	5.4

### **3.3 Condiciones cromatográficas**

#### **3.3.1 Cromatógrafo de gases**

Cromatógrafo de gases (HP 5890) con detector FID, inyector split-splitless y columna capilar ZB-5 (5% fenil-95% PDMS ) de 30 m de longitud x 0.25 mm de diámetro interno x 0.25  $\mu\text{m}$  de grosor de película (Zebron Phenomenex, USA). Gas acarreador hidrógeno, flujo 1 mL min<sup>-1</sup>. Temperatura del puerto de inyección 250 °C, en modo splitless (1 min). Temperatura del detector 300 °C. Programa de temperatura: 40 °C (1 min), incremento de 10°C/min hasta 140 °C, aumento de 7 °C/min hasta 300 °C/ 5min.

#### **3.3.2 Cromatógrafo de gases- espectrometro de masas**

Cromatógrafo de gases (HP 5890) inyector split-splitless y columna capilar ZB-5 (5% fenil-95% PDMS ) de 30 m de longitud x 0.25 mm de diámetro interno x 0.25  $\mu\text{m}$  de grosor de película (Zebron Phenomenex, USA) acoplado a un detector selectivo de masas (HP 5972) en modo barrido iónico total (SCAN, por sus siglas en inglés). Gas acarreador helio, flujo 1 mL min<sup>-1</sup>. Temperatura del puerto de inyección 250°C, en modo splitless (1 min). Temperatura de la línea de transferencia 280°C. Analizador cuadrupolar 150°C. Fuente de ionización 230°C. Programa de temperatura: 40 °C (1 min), incremento de 10°C/min hasta 140 °C, aumento de 7 °C/min hasta 250°C.

## **3.4 Optimización**

### **3.4.1 Terpenos**

Se evaluaron algunas de las condiciones utilizadas en un trabajo previo<sup>8</sup>. Temperatura (40 y 50 °C), capacidad del vial (8 y 11 mL) y adición de sal (50%) con el fin de determinar las mejores condiciones de trabajo para ésteres etílicos y terpenos. El estudio se realizó en los terpenos esperando que los ésteres etílicos presentaran un comportamiento similar.

Se prepararon disoluciones stock en metanol a una concentración aproximada de 1000 µg mL<sup>-1</sup> para cada compuesto: linalol, citronelol y geraniol. A partir de estas se preparó una disolución estándar en agua con los 3 analitos a una concentración de 0.1 µg mL<sup>-1</sup>. De esta se tomaron 5 mL para cada análisis, evaluándose la extracción de los analitos en viales de 8 y 11mL a 40 y 50°C con y sin adición de sal, con una agitación de 1200rpm durante 30 min, cada determinación se realizó por triplicado.

Evaluadas estas condiciones se decidió que las condiciones de trabajo para los terpenos serían: vial de 8 mL a una temperatura de 40 °C con 50% de NaCl y una agitación de 1200rpm con un tiempo de extracción de 30 min.

### **3.4.2 Ésteres etílicos**

Se realizaron disoluciones stock en metanol a una concentración aproximada de 1000 µg mL<sup>-1</sup> para cada compuesto: EE7, EE8, EE9, EE10, EE12 y 2-fenil acetato de etilo. A partir de estas se preparó una disolución estándar en agua con los 6 analitos a una concentración de 0.1 µg mL<sup>-1</sup>, se tomaron 5 mL y se procedió a su análisis por HS-SPME seguido de GC-MS con las condiciones establecidas para terpenos.

Se quería realizar la extracción de ésteres etílicos y terpenos simultáneamente pero se observó que el tiempo de extracción de 30 minutos no era óptimo para ésteres etílicos debido a que su concentración era mayor que la de terpenos. Por lo tanto se realizó un análisis del perfil de tiempo de extracción a 10, 15 y 30 minutos analizando las cervezas de mayor y menor concentración de ésteres etílicos con el fin de optimizar su tiempo de extracción, cada determinación se realizó por triplicado.

Evaluated el tiempo de extracción se decidió que las condiciones de trabajo para los ésteres etílicos serían: vial de 8 mL a una temperatura de 40 °C con 50% de NaCl y una agitación de 1200 rpm con un tiempo de extracción de 15 min.

### **3.5 Metodología**

Una vez obtenidas las condiciones óptimas para la extracción de terpenos y ésteres etílicos, el procedimiento para la identificación de los compuestos volátiles y semivolátiles en cerveza y la realización de las curvas de calibración para la cuantificación de ésteres etílicos y terpenos fue el siguiente:

En un vial de 8 mL se colocaron 0.9 g de NaCl y 5mL de la disolución estándar a analizar (disolución de terpenos o de ésteres etílicos). Los viales se sellaron con cinta teflón y un tapón con septa. Posteriormente, se puso el vial en baño maría a 40°C por 5 min a 1200 rpm con el fin de alcanzar un equilibrio entre la fase líquida y el espacio de cabeza del vial.

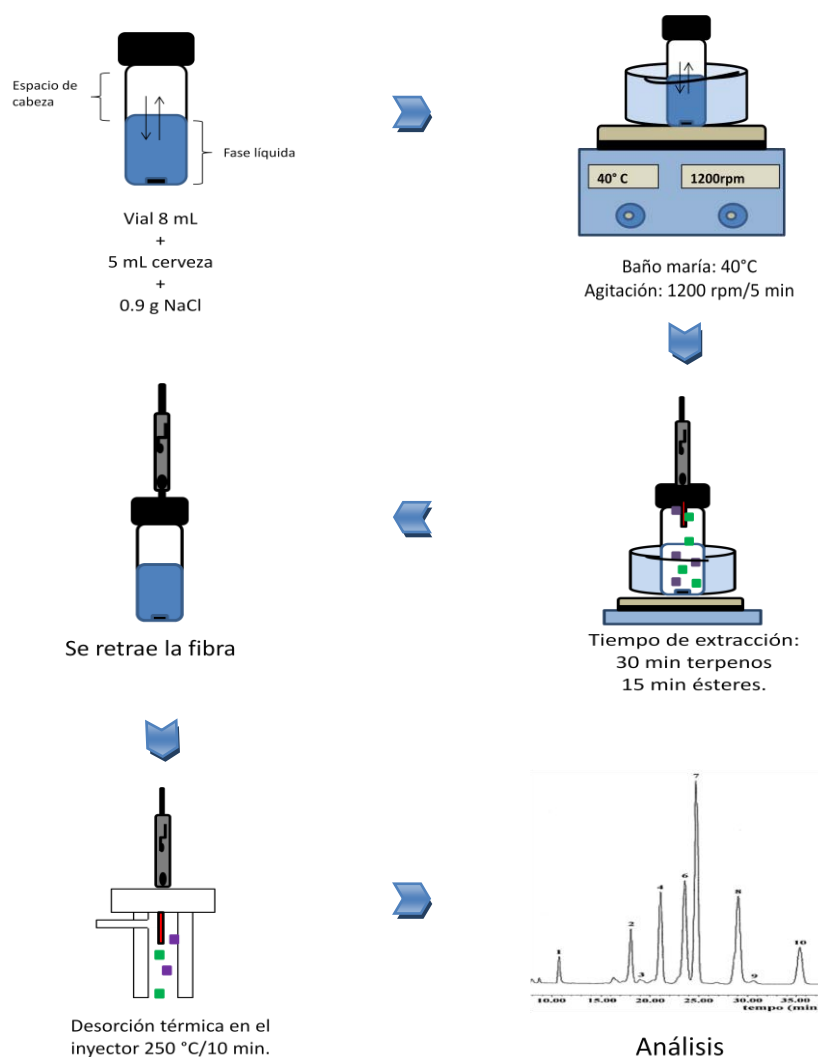
Alcanzado el equilibrio se colocó la fibra en el espacio de cabeza y se expuso por 30 min para los terpenos y por 15 min para los ésteres etílicos. Es importante que se mantenga controlada la temperatura y se observe que la agitación sea homogénea (es decir que la barra magnética gire de forma rotacional dentro del vial).

Después del tiempo de extracción la fibra se retrajo y se retiró del vial para introducirse en el puerto de inyección del cromatógrafo en el cual se realizó la desorción térmica por 10

min. Es importante que todo el material utilizado este perfectamente limpio y seco, cada análisis se realizó por triplicado.

Se requiere que la cerveza no se abra con mucho tiempo de antelación debido a que los compuestos de interés pueden volatilizarse con facilidad conforme transcurre el tiempo.

En la Fig.12 se observa el esquema analítico del procedimiento para el análisis de terpenos y ésteres etílicos en cerveza por HS-SPME seguido de GC-MS. La única diferencia entre el procedimiento para terpenos y ésteres etílicos fue el tiempo de extracción.



**Fig. 12** Esquema analítico para el análisis de terpenos y ésteres etílicos en cerveza por HS-SPME-GC-MS.

### **3.5.1 Caracterización de terpenos y ésteres etílicos**

Se prepararon disoluciones stock a una concentración aproximada de  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$  para el linalol, citronelol y geraniol. A partir de estas se preparó una disolución con los 3 terpenos a una concentración de  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  para cada analito, se realizó el análisis mediante inyección directa con el procedimiento descrito para HS-SPME seguido de GC-MS.

De la misma manera para los ésteres etílicos a partir de las disoluciones stock del EE7, EE8, EE9, EE10, EE12 y 2-fenil acetato de etilo a una concentración aproximada de  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$  se preparó una disolución con los 6 ésteres etílicos a una concentración de  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  para cada analito y se procedió a su análisis con el procedimiento descrito para HS-SPME seguido de GC-MS.

La identificación de terpenos y ésteres se realizó mediante la comparación de los tiempos de retención experimentales obtenidos de estándares con los obtenidos en las muestras, así como la comparación de los espectros de masas obtenidos con los de la base de datos del Instituto Nacional de Estandarización y Tecnología (NIST, por sus siglas en inglés) de Estados Unidos.

### **3.5.2 Cuantificación de terpenos y ésteres etílicos**

#### **3.5.2.1 Terpenos**

Se prepararon disoluciones stock en agua a  $1$  y  $100 \text{ ng mL}^{-1}$  para linalol;  $50$  y  $125 \text{ ng mL}^{-1}$  para citronelol y  $100 \text{ ng mL}^{-1}$  para geraniol, posteriormente se tomó la cantidad necesaria de cada una de las disoluciones stock para obtener disoluciones con los 3 terpenos para cada uno de los puntos de la curvas de calibración.

Las curvas de calibración se prepararon de la siguiente manera: para linalol el intervalo de concentración fue de 15 a 65 ng mL<sup>-1</sup> y de 0.06 a 0.6 ng mL<sup>-1</sup>; para citronelol de 15 a 40 ng mL<sup>-1</sup> y de 2 a 16 ng mL<sup>-1</sup> y para geraniol de 10 a 40 ng mL<sup>-1</sup>; todas se realizaron en agua y por triplicado (véase anexo I). Los intervalos se definieron analizando las muestras previamente debido a que los terpenos se encontraban a diferentes concentraciones.

### **3.5.2.2 Ésteres etílicos**

Se prepararon disoluciones stock para cada uno de los ésteres etílicos: EE7 (5 ng mL<sup>-1</sup>), EE8 (200 ng mL<sup>-1</sup>), EE9 (2 ng mL<sup>-1</sup>), EE10 (200 ng mL<sup>-1</sup>), EE12 (100 ng mL<sup>-1</sup>) y del 2-fenil acetato de etilo (1000 ng mL<sup>-1</sup>). Se tomó el volumen necesario de cada una de las disoluciones stock para obtener disoluciones con los 6 ésteres etílicos para cada uno de los puntos de la curvas de calibración.

Las curvas de calibración se realizaron: para el EE7 en un intervalo de concentración de 0.4 a 0.7 ng mL<sup>-1</sup>; para el EE8 de 100 a 600 ng mL<sup>-1</sup>; para el EE9 de 0.15 a 0.75 ng mL<sup>-1</sup>; para el EE10 de 3 a 40 ng mL<sup>-1</sup>; para el EE12 de 5 a 50 ng mL<sup>-1</sup> y para el 2-fenil acetato de etilo de 10 a 400 ng mL<sup>-1</sup>, todas se realizaron en agua y por triplicado (véase anexo I). Los intervalos se definieron analizando las muestras previamente debido a que los ésteres etílicos se encontraban a diferentes concentraciones.



# 4. Resultados y discusión

---

## 4.1 Optimización de la metodología

### 4.1.1 Terpenos

Mediante el análisis por HS-SPME seguido de GC-MS pudimos apreciar que la adición de sal mejora la extracción de los compuestos volátiles y semivolátiles.

Se observó que en el vial de 8 mL (con un volumen menor del espacio de cabeza al vial de 11mL) a 40 °C se obtenía respuesta similar para los tres compuestos a diferencia de la obtenida a 50 °C en donde la respuesta para linalol era muy grande en comparación con la obtenida para citronelol y geraniol. En el vial de 11 mL a 40°C se observa gran respuesta del linalol pero baja del geraniol, lo mismo ocurre a 50°C.

De acuerdo con los resultados obtenidos (Tabla 10) se determinó que las condiciones óptimas para la extracción de terpenos eran: vial de 8 mL a 40 °C con 50% de NaCl y una agitación de 1200rpm por 30 min.

**Tabla 10.** Extracción de terpenos a diferentes condiciones (n=3).

Vial	*8mL				11mL			
	*c/NaCl		s/NaCl		c/NaCl		s/NaCl	
Compuesto	*40°C	50°C	40°C	50°C	40°C	50°C	40°C	50°C
Linalol	283,300	461,830	95,813	118,350	126,510	227,990	218,00	180,820
Citronelol	279,080	62,910	41,370	21,780	179,820	223,830	25,010	30,829
Geraniol	92,200	5,280	4,399	1,2400	36,190	37,390	4,380	4,620

\*Condiciones elegidas

#### 4.1.2 Ésteres etílicos

Para los ésteres etílicos se realizó un análisis del perfil de tiempo de extracción a 10, 15 y 30 minutos analizando las cervezas de mayor y menor concentración de ésteres etílicos con el fin de optimizarlo.

En la Fig. 11 se observa que en general a mayor tiempo de extracción mayor sorción de los ésteres etílicos, la concentración del EE8 y del 2-fenil acetato de etilo es muy grande en comparación con los demás ésteres etílicos al contrario del EE7 y EE9 los cuales se encuentran a una concentración baja, el EE9 no se identificó en la cerveza Corona. Se determinó que con 15 min de extracción todos los ésteres etílicos en estudio se extraían a concentración adecuada para su análisis por GC-MS decidiéndose este fuera el tiempo de extracción para los ésteres etílicos.

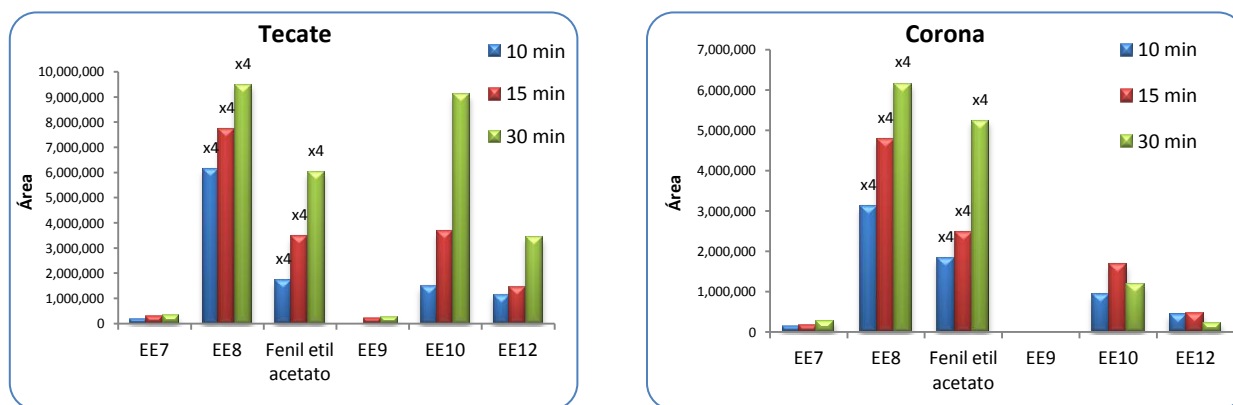


Fig. 11. Perfil de extracción de los ésteres etílicos presentes a 10, 15 y 30 min.

#### 4.2 Compuestos volátiles y semivolátiles en cervezas

La fibra PDMS-DVB considerada de polaridad intermedia permite la extracción de analitos de diversa polaridad. De acuerdo con estudios previos en cerveza<sup>12,36</sup> se observó que con este tipo de fibra y las condiciones mencionadas en la sección 3.5 se tiene una óptima extracción para compuestos orgánicos volátiles y semivolátiles.

## Resultados y discusión

Se identificaron 24 compuestos entre ellos ésteres etílicos, alcoholes, ácidos, compuestos aromáticos, terpenos, etc. Cada cerveza se analizó por triplicado. En la Tabla 11 se muestran los principales compuestos volátiles identificados.

**Tabla 11.** Compuestos orgánicos volátiles y semivolátiles en las cervezas por HS-SPME seguido de CG-MS.

Compuesto	tr (min)	Minerva Pale Ale	Minerva Stout Imperial	Tecate	Negra Modelo	Corona	Victoria
Hexil acetato	8.12	✓	✓				
2-etil hexanol	8.41				✓		✓
*Heptanoato de etilo	9.57	✓	✓	✓	✓	✓	✓
*Linalol	9.64	✓	✓	✓	✓	✓	✓
2-fenil etanol	9.90	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Ácido octanoico	10.9	✓	✓	✓	✓	✓	✓
*Octanoato de etilo	11.2	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Decanal	11.3			✓		✓	✓
Acetato de octilo	11.4				✓		✓
*Citronelol	11.7	✓	✓	✓	✓		
*Geraniol	12.1	✓	✓				
*2-fenil acetato de etilo	12.2	✓	✓	✓	✓	✓	✓
*Nonanoato de etilo	12.7	✓	✓	✓			✓
Tridecano	12.8	✓	✓	✓	✓	✓	✓
2-metoxi-4-vinilfenol	13.1			✓	✓	✓	
3-fenilpropanoato de etilo	13.7	✓	✓				
Ácido decanoico	13.9	✓	✓	✓	✓	✓	
Formiato de linalol	14.2			✓		✓	
9-etildecenoato	14.3			✓	✓	✓	✓
*Decanoato de etilo	14.4	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Tetradecano	14.5	✓	✓	✓	✓	✓	✓
1,2,3,4,4a,9,9a,10 octahidroantraceno	15.2			✓	✓	✓	
Butilhidroxitlueno	16.4	✓	✓				
*Dodecanoato de etilo	17.6	✓	✓	✓	✓	✓	✓

\*Compuestos cuantificados

Los compuestos orgánicos volátiles y semivolátiles identificados, responsables del sabor de la cerveza, se clasifican en compuestos de sabor derivados de ingredientes como la cebada y el lúpulo. Su sabor depende del tostado de la malta, la cocción del mosto, el metabolismo de la levadura, la influencia del oxígeno y la luz del sol durante el almacenamiento del producto<sup>41</sup>. En este trabajo, nos centramos en los terpenos y ésteres etílicos que principalmente se consideran subproductos del metabolismo de la levadura.

Los terpenos determinados en las cervezas fueron: linalol, citronelol y geraniol (Fig.13).

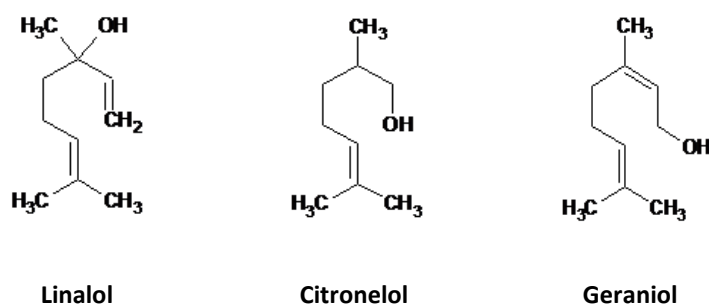


Fig.13. Estructura de los terpenos mayoritarios en cervezas mexicanas.

Así mismo se cuantificaron los ésteres etílicos: EE7, EE8, EE9, EE10, EE12 y 2-fenil acetato de etilo (Fig.14).

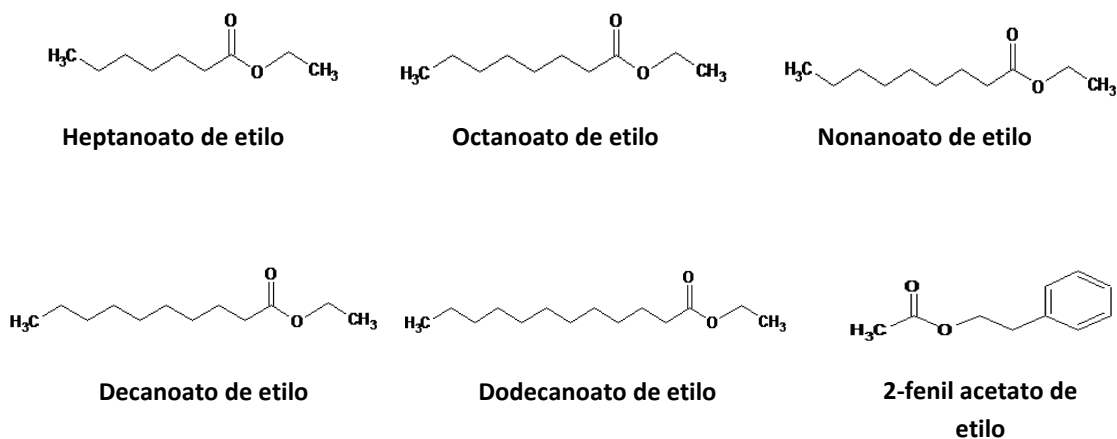
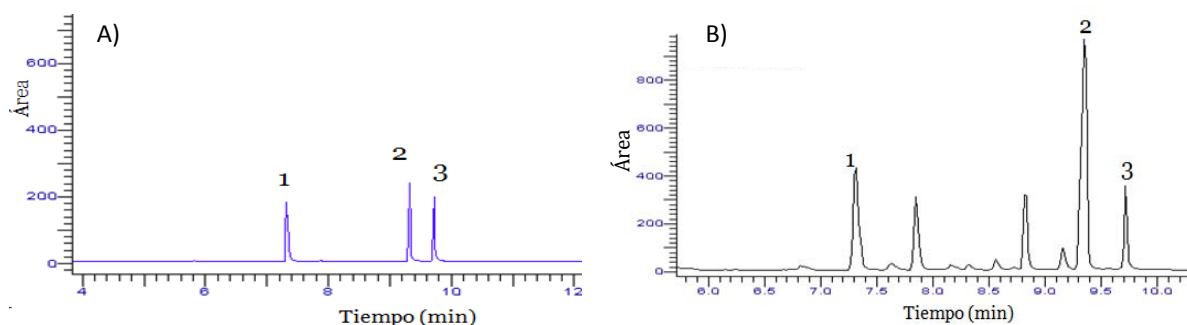


Fig.14. Estructura de los ésteres etílicos mayoritarios en cervezas mexicanas.

### 4.3 Análisis cualitativo de terpenos y ésteres etílicos

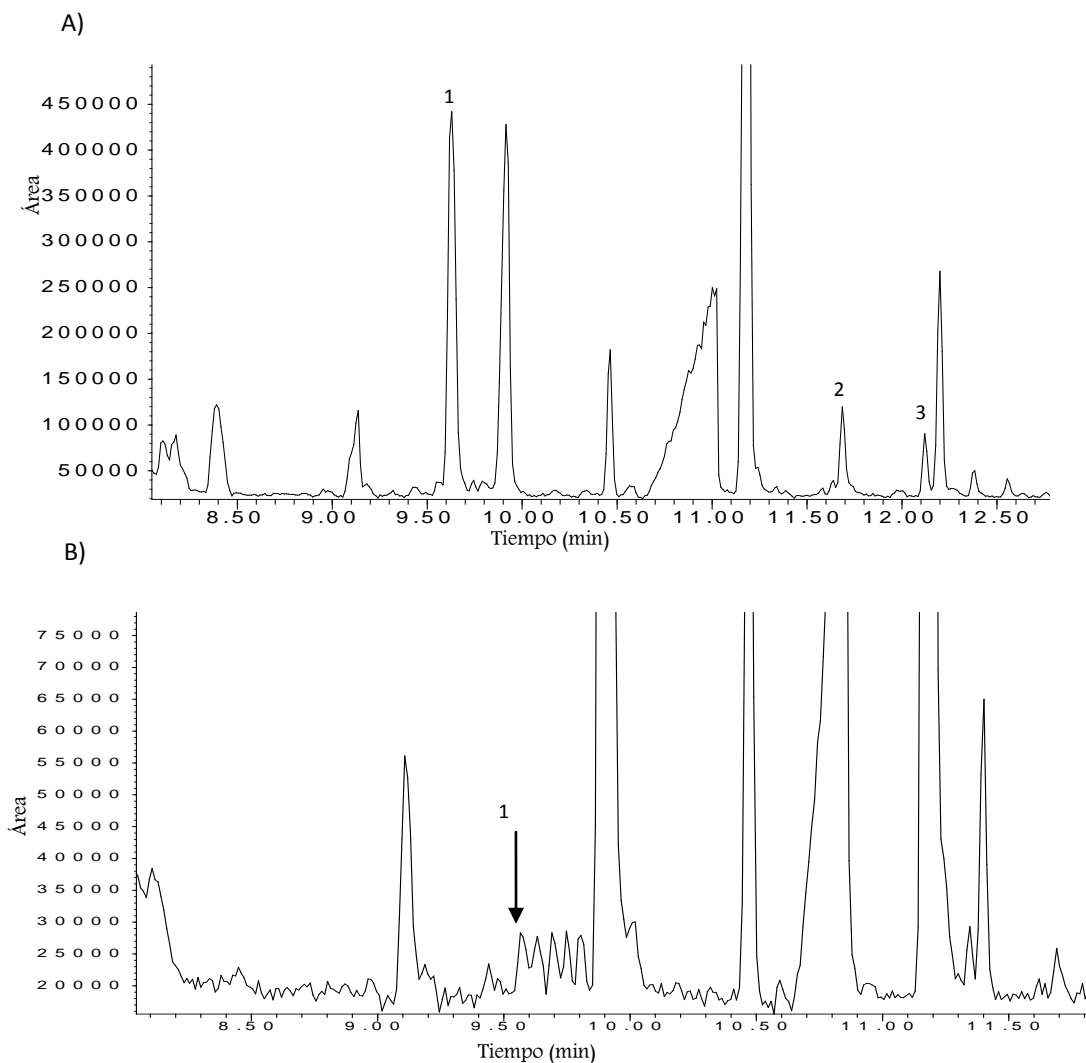
#### 4.3.1 Identificación de terpenos

Con el fin de determinar los tiempos de retención de los terpenos se realizó mediante inyección directa el análisis de una disolución estándar del linalol, citronelol y geraniol a una concentración de  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  en metanol. De igual manera se realizó el análisis de una disolución con la misma concentración por HS-SPME, esperando observar una mayor sensibilidad por HS-SPME debido a la preconcentración de los analitos. Ambos análisis se realizaron por GC con el fin de determinar los tiempos de retención para cada terpeno. En la Fig.15 se observan los cromatogramas obtenidos de ambos análisis.



**Fig.15.** Cromatograma de la disolución estándar de terpenos 1. Linalol, 2.Citronelol, 3. Geraniol a  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ . A. Inyección directa y B. HS-SPME ambos seguidos de GC. Los picos extra observados en la figura B son compuestos que se desprenden de la fibra.

Posteriormente se realizó la identificación de los terpenos mayoritarios por HS-SPME seguido GC-MS en cada cerveza con la metodología descrita en la sección 3.5.1. En la Fig. 16 se muestran los cromatogramas iónicos totales de una cerveza tipo Ale y una tipo Lager y la identificación de cada terpeno. En la cerveza Corona únicamente se identificó el linalol.

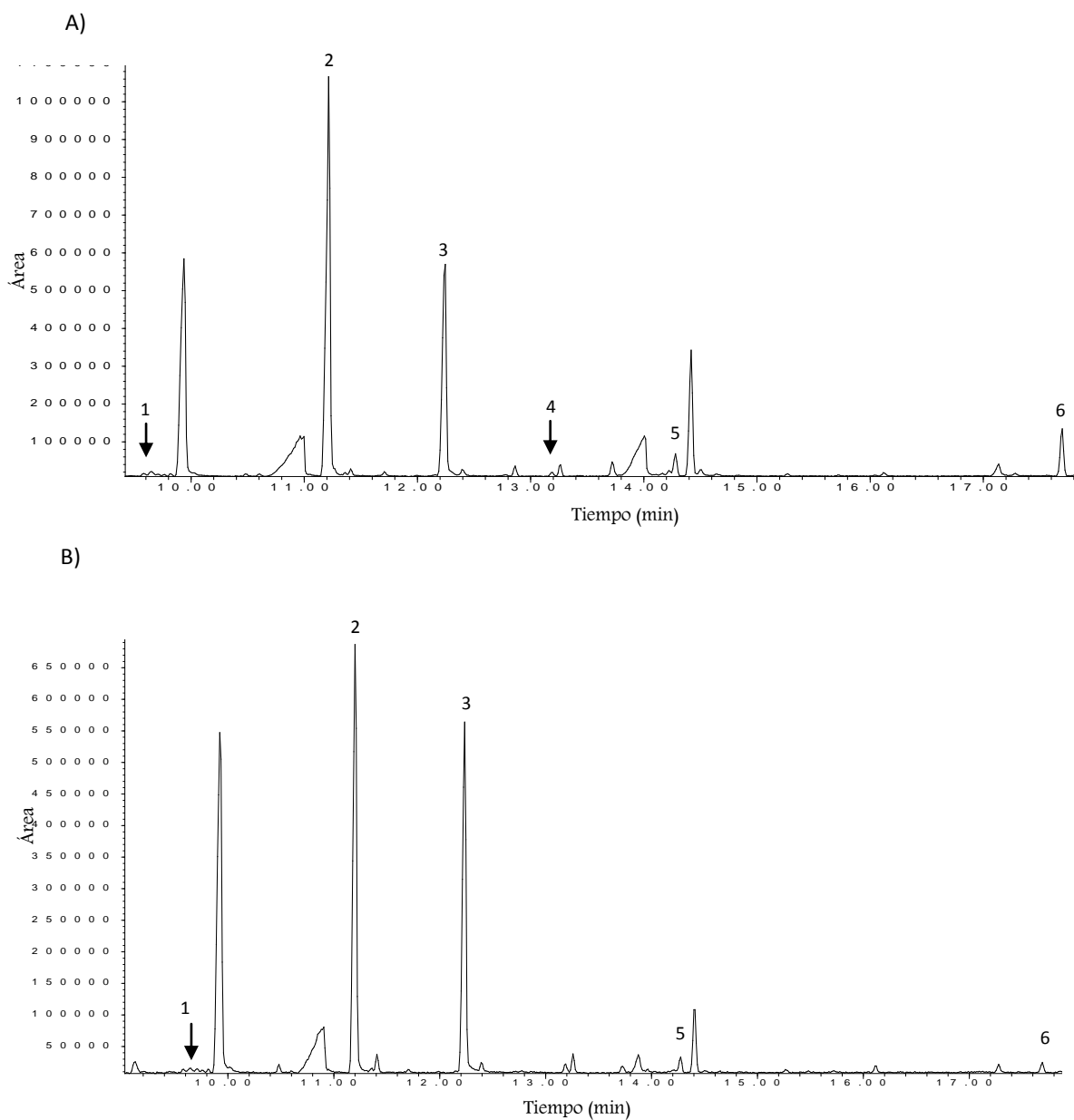


**Fig.16.** Cromatograma iónico total de A. Minerva Pale Ale y B. Corona. 1. Linalol, 2. Citronelol, 3. Geraniol.

### 4.3.2 Identificación de ésteres etílicos

Mediante la metodología descrita en la sección 3.5.1 se realizó la identificación de los ésteres etílicos mayoritarios y del 2-fenil acetato de etilo en cada cerveza por HS-SPME seguido de GC-MS. En la Fig. 17 se muestran los cromatogramas iónicos totales de las

cervezas en las que se observó mayor y menor contenido de éstos. En la cerveza Victoria no se identificó al EE9.



**Fig 17.** Cromatograma iónico total de A. Tecate B. Victoria. 1. EE7, 2. EE8, 3. 2-fenil acetato de etilo, 4. EE9, 5. EE10 y 6. EE12.

#### 4.4 Cuantificación de terpenos

La cuantificación se realizó por medio de curvas de calibración para cada terpeno como se describe en la sección 3.5.2.1, debido a la diferencia de concentraciones que presentaban en las cervezas los intervalos de las curvas de calibración se definieron analizando cada cerveza. Todas las curvas de calibración se realizaron por triplicado (véase anexo I). En la cerveza Victoria no se identificó ninguno de los terpenos en estudio por lo que no se realizó cuantificación de terpenos en ésta cerveza.

El intervalo de las curvas de calibración y sus coeficientes de determinación calculados se observan en la Tabla 12. Para el linalol y citronelol fue necesaria la realización de dos curvas de calibración una en un intervalo de concentración mucho más bajo que la otra debido a que en las cervezas tipo Ale la concentración de terpenos era mayor a la calculada en las cervezas tipo Lager. Se observó que la linealidad de las curvas de calibración del intervalo de concentración más bajo era menor debido una mayor variación en los datos, obteniendo coeficientes de variación mayores que nos indica una disminución en la presión y por consiguiente una pérdida de sensibilidad.

**Tabla 12.** Curvas de calibración de los terpenos mayoritarios. (Véase anexo I)

Compuesto	Curva de calibración
Linalol	15-55 ng mL <sup>-1</sup> R <sup>2</sup> =0.9995
	0.06-0.6 ng mL <sup>-1</sup> R <sup>2</sup> =0.9581
Citronelol	15-40 ng mL <sup>-1</sup> R <sup>2</sup> =0.9925
	2-16 ng mL <sup>-1</sup> R <sup>2</sup> =0.9810
Geraniol	10-40 ng mL <sup>-1</sup> R <sup>2</sup> =0.9625

En la Tabla 13 se muestran las concentraciones calculadas con base en las curvas de calibración para cada terpeno y el coeficiente de variación en cada cerveza. La cerveza con



mayor concentración de terpenos fue la cerveza Minerva Pale Ale con una concentración total de terpenos de 84 ng mL<sup>-1</sup> de cerveza, la cerveza con menor concentración de terpenos fue la cerveza Corona con una concentración total de terpenos de 0.302 ng mL<sup>-1</sup>.

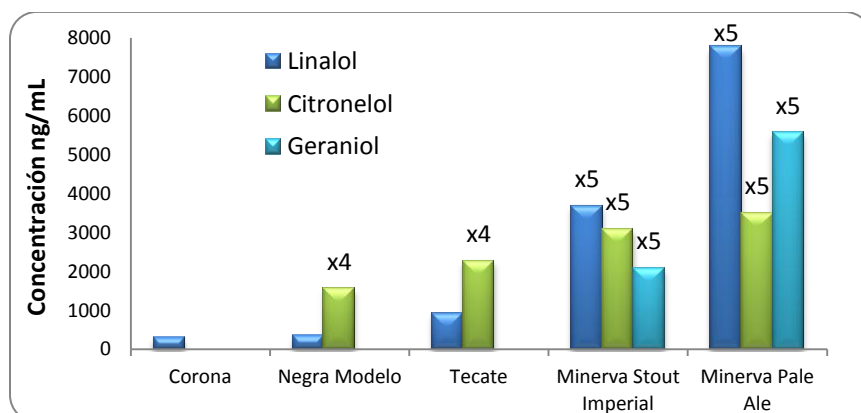
El terpeno mayoritario en todas las cervezas fue el Linalol y el minoritario el Geraniol. El tener coeficientes de variación menores al 15% nos indica buena repetibilidad del procedimiento de análisis.

**Tabla 13.** Cuantificación (ng/mL) de terpenos, n=3.

Cerveza	Linalol (ng mL <sup>-1</sup> de cerveza)	Citronelol (ng mL <sup>-1</sup> de cerveza)	Geraniol (ng mL <sup>-1</sup> de cerveza)	Total (ng mL <sup>-1</sup> de cerveza)	
LAGER	Tecate	0.907±0.021 3.8*	9.119±1.164 14.5*	N.D.	10.026
	Corona	0.302±0.004 2.2*	N.D.	N.D.	0.302
	Negra Modelo	0.353±0.004 1.8*	6.200±0.031 1.2*	N.D.	6.553
ALE	Minerva Pale Ale	38.803±0.453 1.5*	17.518±0.718 7.0*	27.821±0.345 2.1*	84.142
	Minerva Stout Imperial	18.422±0.334 1.9*	15.409±0.322 3.5*	10.373±0.142 2.3*	44.204

N.D.= No determinado      \* = % C.V.

En el Gráfico 1 se observa la concentración calculada para el linalol, citronelol y geraniol en las cervezas estudiadas.



**Gráfico 1.** Concentración de terpenos en muestras de cervezas mexicanas.

Posteriormente con la concentración calculada para cada terpeno y sus principales notas sensoriales se determinó la influencia de éstos en el olor y sabor de cada cerveza en estudio de acuerdo con el umbral de percepción reportado para cada terpeno (Tabla 14).

Las principales notas sensoriales de los terpenos son florales y a rosas<sup>2</sup>. De acuerdo con la concentración total calculada para los terpenos (Tabla 13) podemos decir que en las cervezas tipo Ale se debe percibir una mayor gama de olores florales y a frutos cítricos que en las cervezas tipo Lager.

**Tabla 14.** Principales notas sensoriales de los terpenos.

Descriptor olfativo	Umbral de percepción (ng L <sup>-1</sup> )	Corona	Negra Modelo	Tecate	Minerva Stout Imperial	Minerva Pale Ale
		C (ng L <sup>-1</sup> ) calculada				
<b>Linalol</b> (herbal, floral)	100	302	353	907	18,422	38,803
<b>Citronelol</b> (Rosas, cítricos)	100	---	6,200	9,119	15,409	17,518
<b>Geraniol</b> (Rosas, cera)	130	---	---	---	10,373	27,821

## 4.5 Cuantificación de ésteres etílicos

La cuantificación se realizó por medio de curvas de calibración para cada éster etílico y para el 2-fenil acetato de etilo como se describe en la sección 3.5.2.2, debido a la diferencia de concentración a la que se encontraban en las cervezas los intervalos de las curvas de calibración se definieron analizando cada cerveza. Todas las curvas de calibración se realizaron por triplicado (véase anexo I). Obteniéndose mayor concentración de éstos en las cervezas tipo Ale, exceptuando la cerveza Tecate.

El intervalo de las curvas de calibración y sus coeficientes de determinación calculados se muestran en la Tabla 15. Debido a que los ésteres etílicos y el 2-fenil acetato de etilo presentaban concentraciones similares en las cervezas estudiadas, se realizó una curva de calibración para cada analito en un intervalo adecuado para éstas concentraciones. Se observó que en los ésteres etílicos con intervalos de concentración más bajo (EE7,EE9 y EE10) la variación era mayor lo que nos indica una disminución en la precisión y por consiguiente una pérdida de sensibilidad, lo cual se ve reflejado en sus coeficientes de determinación.

**Tabla 15.** Curvas de calibración de los ésteres etílicos mayoritarios. (Véase anexo I)

Compuesto	Compuestos identificados
EE7	0.4-0.7 ng mL <sup>-1</sup> R <sup>2</sup> =0.9642
EE8	100-600 ng mL <sup>-1</sup> R <sup>2</sup> =0.9962
EE9	0.15-0.75 ng mL <sup>-1</sup> R <sup>2</sup> =0.9708
EE10	3-40 ng mL <sup>-1</sup> R <sup>2</sup> =0.9691
EE12	5-50 ng mL <sup>-1</sup> R <sup>2</sup> =0.9889
2-fenil acetato de etilo	15-400 ng mL <sup>-1</sup> R <sup>2</sup> =0.9910

En la Tabla 16 se muestran las concentraciones calculadas con base en las curvas de calibración para cada éster etílico y el 2-fenil acetato de etilo así como el coeficiente de variación.

La cerveza con mayor concentración de ésteres etílicos fue la cerveza Tecate con una concentración total de 699 ng mL<sup>-1</sup>, la cerveza con menor concentración de ésteres etílicos fue la cerveza Victoria con una concentración total de 287 ng mL<sup>-1</sup>. La cerveza con mayor concentración del 2- fenil acetato de etilo fue la Tecate con 259 ng mL<sup>-1</sup> y la de menor concentración fue la cerveza Minerva Pale Ale con 40 ng mL<sup>-1</sup>.

El éster etílico mayoritario en todas las cervezas fue el EE8 y los minoritarios fueron el EE7 y el EE9. El tener coeficientes de variación menores al 15% nos indica buena repetibilidad del procedimiento de análisis.

Se observó que en general las cervezas tipo Ale tienen una mayor concentración de ésteres etílicos (500 y 540 ng mL<sup>-1</sup>) que las cervezas tipo Lager (287, 395 y 407 ng mL<sup>-1</sup>) exceptuando a la Tecate (699 ng mL<sup>-1</sup>), no ocurre lo mismo con el 2-fenil acetato de etilo el cual presenta mayor concentración en las cervezas tipo Lager (218, 165, 203 y 259 ng mL<sup>-1</sup>) que en las Ale (40 y 65 ng mL<sup>-1</sup>).

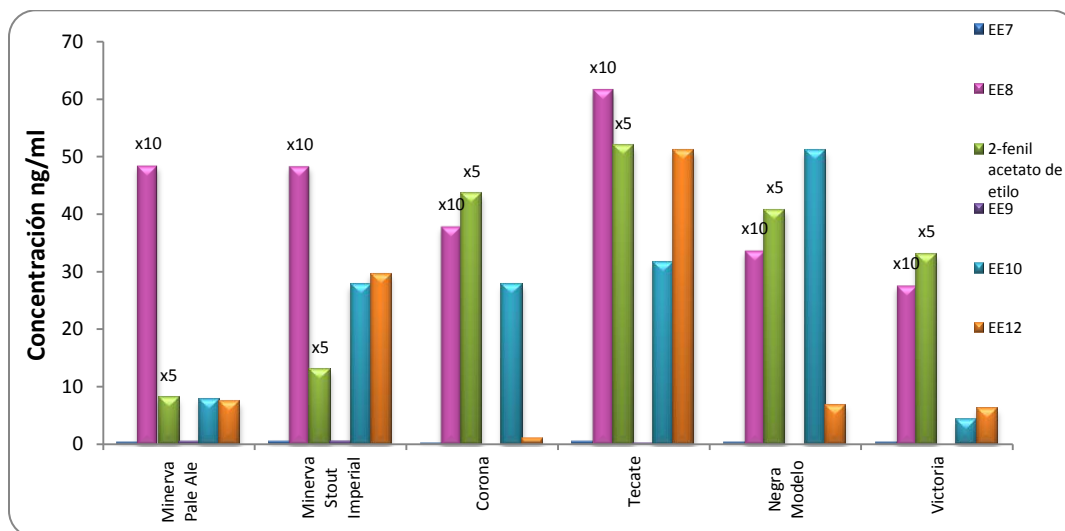
**Tabla 16.** Cuantificación (ng mL<sup>-1</sup>) de ésteres etílicos en cerveza, n=3.

	EE7 (ng mL <sup>-1</sup> de cerveza)	EE8 (ng mL <sup>-1</sup> de cerveza)	EE9 (ng mL <sup>-1</sup> de cerveza)	EE10 (ng mL <sup>-1</sup> de cerveza)	EE12 (ng mL <sup>-1</sup> de cerveza)	Total (ng mL <sup>-1</sup> de cerveza)	2-fenil acetato de etilo (ng mL <sup>-1</sup> de cerveza)
<b>L A G E R</b>	<b>Corona</b>	0.200±0.002 3.0*	378.100±0.024 9.9*	N.D.	27.800±0.279 8.1*	1.000±0.002 3.7*	<b>407.100</b> 217.600±0.016 11.1*
	<b>Victoria</b>	0.300±0.015 11.6*	275.900±0.030 15.7*	N.D.	4.300±0.961 18.0*	6.200±0.005 7.0*	<b>286.700</b> 165.200±0.003 2.6*
	<b>Negra Modelo</b>	0.300±0.017 11.0*	336.500±0.037 16.5*	N.D.	51.000±0.779 16.6*	6.800±0.006 8.2*	<b>394.600</b> 203.800±0.003 2.2*
	<b>Tecate</b>	0.400±0.006 2.8*	615.800±0.050 12.9*	0.200±0.012 10.3*	31.500±0.841 4.0*	51.000±0.002 5.4*	<b>698.900</b> 259.2±0.019 11.7*
<b>A L E</b>	<b>Minerva Pale Ale</b>	0.300±0.010 8.3*	483.700±0.037 11.9*	0.400±0.020 8.3*	7.800±0.753 10.2*	7.400±0.005 6.5*	<b>499.600</b> 40.400±0.001 3.4*
	<b>Minerva Stout Imperial</b>	0.400±0.017 8.7*	482.500±0.037 12.1*	0.500±0.027 8.1*	27.800±0.983 5.1*	29.600±0.003 13.4*	<b>540.800</b> 64.700±0.007 13.7*

N.D = no determinado

\* = %C.V

En el Gráfico 2 se observa la concentración calculada para los ésteres etílicos y 2-fenil acetato de etilo en cada una de las cervezas analizadas.



**Gráfico 2.** Concentración de ésteres etílicos en muestras de cervezas mexicanas.

Posteriormente con la concentración calculada para cada éster etílico y el 2-fenil acetato de etilo y sus principales notas sensoriales se determinó la influencia de éstos en el olor y sabor de cada cerveza en estudio de acuerdo con el umbral de percepción reportado para cada compuesto (Tabla 17).

Las principales notas sensoriales de los ésteres etílicos y el 2-fenil acetato de etilo son frutales<sup>1</sup>. De acuerdo con la concentración total calculada para los ésteres etílicos y el 2-fenil acetato de etilo (Tabla 16) podemos decir que en las cervezas Tecate ( $699 \text{ ng mL}^{-1}$ ), Minerva Pale Ale ( $500 \text{ ng mL}^{-1}$ ) y Minerva Stout Imperial ( $540 \text{ ng mL}^{-1}$ ) se espera una mayor percepción de aromas frutales (manzana, piña, plátano) que en las cervezas Corona ( $407 \text{ ng mL}^{-1}$ ), Victoria ( $287 \text{ ng mL}^{-1}$ ) y Negra Modelo ( $395 \text{ ng mL}^{-1}$ ).

**Tabla 17.** Principales notas sensoriales de los ésteres etílicos.

Descriptor olfativo	Umbral de percepción (ng mL <sup>-1</sup> )	Corona	Victoria	Negra Modelo	Minerva Pale Ale	Minerva Stout Imperial	Tecate
		C (ng mL <sup>-1</sup> ) calculada					
<b>EE7</b> (Manzana, piña)	14,000	200	300	300	300	400	400
<b>EE8</b> (Plátano, manzana, piña)	5,000	378,100	275,900	336,500	483,700	482,500	615,800
<b>2-fenil acetato de etilo</b> (Rosas, miel)	25,000	217,300	165,200	203,800	40,400	64,700	259,200
<b>EE9</b> (Rosas, frutas)	13,000	---	---	---	400	500	200
<b>EE10</b> (Plátano, fruta madura)	20,000	27,800	4,300	51,000	7,800	27,800	31,500
<b>EE12</b> (floral, afrutado)	8,000	1,000	6,200	6,800	7,400	29,600	51,000

La producción de un mayor contenido de ésteres etílicos y terpenos en las tipo Ale se debe probablemente a la temperatura de fermentación, la cual es aproximadamente 8°C más alta que en las tipo Lager<sup>16-17</sup>. El contenido de ésteres etílicos y terpenos dependerá de varios factores; la materia prima, el proceso y las condiciones de elaboración, entre otros.

# Conclusiones

---

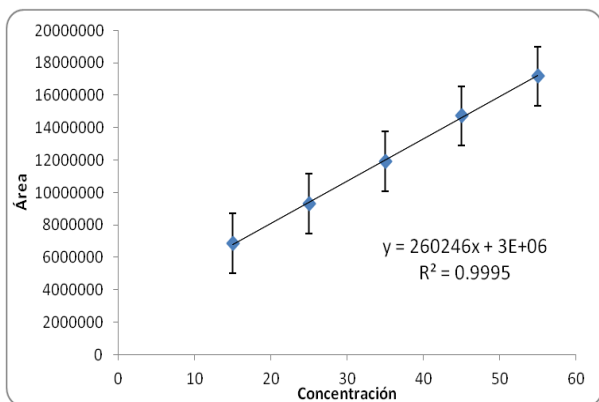
1. Se analizaron cervezas mexicanas tipo Lager y Ale por HS-SPME seguido de GC-MS, identificando 24 compuestos volátiles y semivolátiles entre ellos ésteres etílicos, alcoholes, ácidos grasos, compuestos aromáticos, terpenos, entre otros.
2. La cuantificación de terpenos, ésteres etílicos mayoritarios y el 2-fenil acetato de etilo se realizó mediante curvas de calibración.
3. Los terpenos mayoritarios fueron: linalol, citronelol y geraniol. La cerveza con mayor concentración de terpenos fue la Minerva Pale Ale ( $84 \text{ ng mL}^{-1}$ , Ale) y la de menor fue la Corona ( $0.3 \text{ ng mL}^{-1}$ , Lager).
4. Los ésteres etílicos mayoritarios fueron: EE7, EE8, EE9, EE12 y 2-fenil acetato de etilo. La cerveza con mayor concentración fue la Tecate ( $699 \text{ ng mL}^{-1}$ ) y la de menor concentración fue la Victoria ( $287 \text{ ng mL}^{-1}$ ) ambas tipo Lager. La cerveza con mayor concentración del 2-fenil acetato de etilo fue la Tecate ( $259 \text{ ng mL}^{-1}$ , Lager) y la de menor fue la Minerva Pale Ale ( $40 \text{ ng mL}^{-1}$ , Ale).
5. Las cervezas tipo Ale tuvieron mayor concentración de terpenos con respecto a las tipo Lager por lo que presentan un mayor sabor herbal y floral.
6. Las cervezas con mayor concentración de ésteres etílicos fueron: Tecate (Lager), Minerva Pale Ale y Stout Imperial (Ale) por lo que presentan notas afrutadas más evidentes.
7. En general las cervezas tipo Lager tienen menor concentración de terpenos y ésteres etílicos, lo que puede estar relacionado con el sabor más plano y ligero que caracteriza a este tipo de cervezas. Con respecto a las cervezas tipo Ale generalmente se percibe una mayor gama de olores y sabores, lo cual se puede asociar a una mayor concentración de congénicos, ésteres etílicos y terpenos.
8. Los resultados obtenidos en este trabajo presentan similitud con trabajos realizados en cervezas extranjeras, presentando un perfil de compuestos volátiles y semivolátiles muy parecido.



# Anexo I

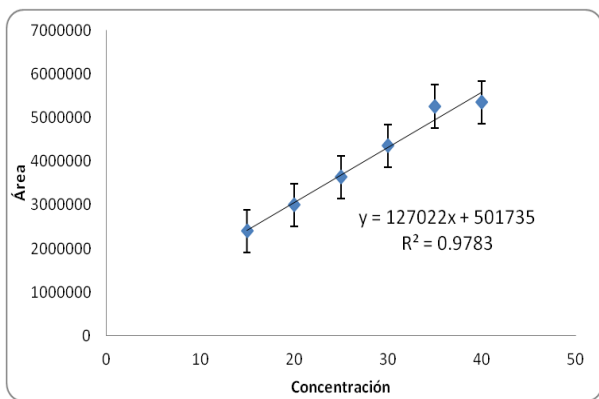
## Curvas de calibración terpenos

Curva de calibración para el linalol entre 15 y 55 ng mL<sup>-1</sup>.



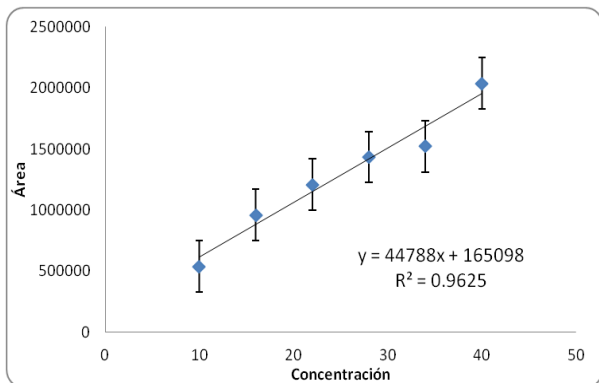
[C] dis. madre (ng mL <sup>-1</sup> )	Alicuota tomada	[C] final (ng mL <sup>-1</sup> )	Aforo a 25ml
125	3ml	15	Disolución 1
125	5ml	25	Disolución 2
125	7ml	35	Disolución 3
125	9ml	45	Disolución 4
125	11ml	55	Disolución 5

Curva de calibración para el citronelol entre 15 y 40 ng mL<sup>-1</sup>.



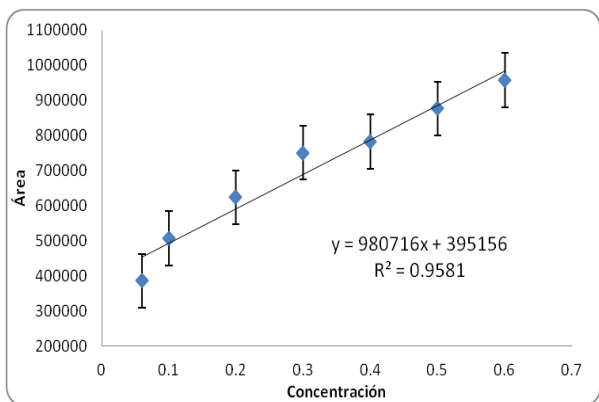
[C] dis. madre (ng mL <sup>-1</sup> )	Alicuota tomada	[C] final (ng mL <sup>-1</sup> )	Aforo a 25ml
125	3ml	15	Disolución 1
125	4ml	20	Disolución 2
125	5ml	25	Disolución 3
125	6ml	30	Disolución 4
125	7ml	35	Disolución 5
125	8ml	40	Disolución 6

Curva de calibración para el geraniol entre 10 y 40 ng mL<sup>-1</sup>.



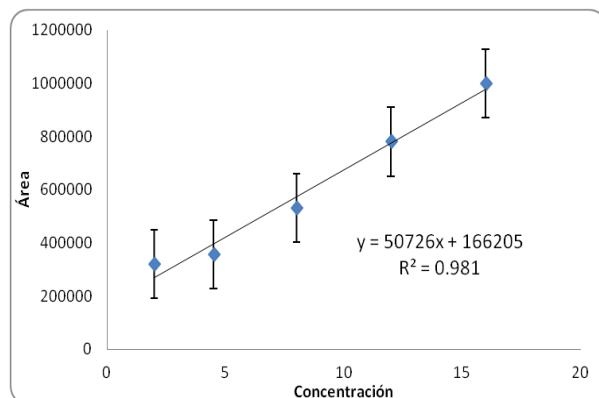
[C] dis. madre (ng mL <sup>-1</sup> )	Alícuota tomada	[C] final (ng mL <sup>-1</sup> )	Aforo a 25ml
100	2.5ml	10	Disolución 1
100	4ml	16	Disolución 2
100	5.5ml	22	Disolución 3
100	7ml	28	Disolución 4
100	8.5ml	34	Disolución 5
100	10ml	40	Disolución 6

Curva de calibración para el linalol entre 0.06 y 0.6 ng mL<sup>-1</sup>.



[C] dis. madre (ng mL <sup>-1</sup> )	Alícuota tomada	[C] final (ng mL <sup>-1</sup> )	Aforo a 25ml
1	1.5ml	0.06	Disolución 1
1	2.5ml	0.1	Disolución 2
1	5ml	0.2	Disolución 3
1	7.5ml	0.3	Disolución 4
1	10ml	0.4	Disolución 5
1	12.5ml	0.5	Disolución 6
1	15ml	0.6	Disolución 7

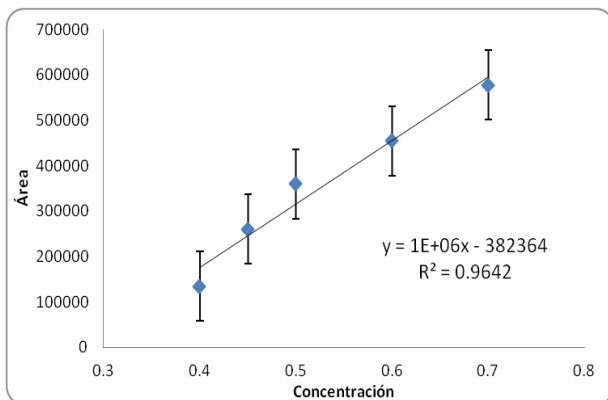
Curva de calibración para el citronelol entre 2 y 16 ng mL<sup>-1</sup>.



[C] dis. madre (ng mL <sup>-1</sup> )	Alícuota tomada	[C] final (ng mL <sup>-1</sup> )	Aforo a 25ml
50	1ml	2	Disolución 1
50	2ml	4	Disolución 2
50	4ml	8	Disolución 3
50	6ml	12	Disolución 4
50	8ml	16	Disolución 5

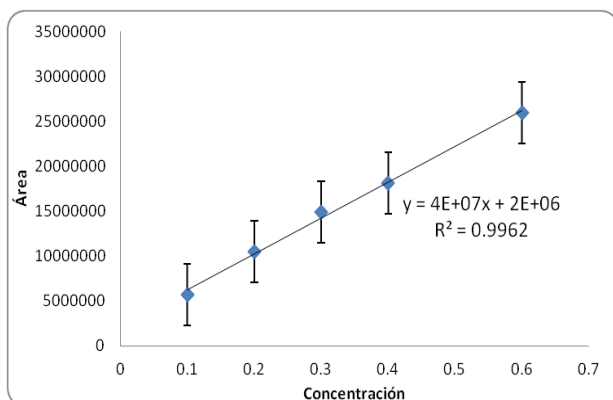
## Curvas de calibración ésteres etílicos

Curva de calibración para el heptanoato de etilo entre 0.4 y 0.7 ng mL<sup>-1</sup>.



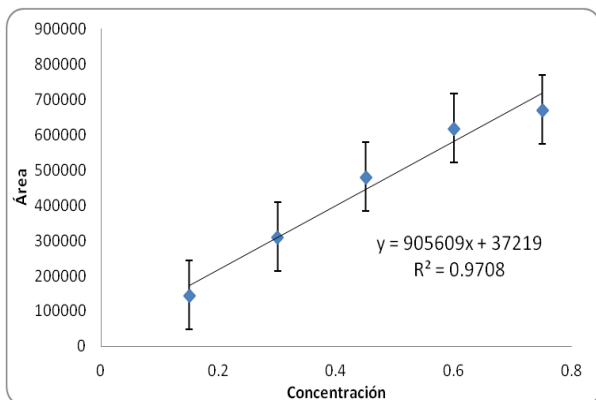
[C] dis. madre (ng mL <sup>-1</sup> )	Alícuota tomada	[C] final (ng mL <sup>-1</sup> )	Aforo a 25ml
5	2ml	0.4	Disolución 1
5	2.25ml	0.45	Disolución 2
5	2.5ml	0.5	Disolución 3
5	3ml	0.6	Disolución 4
5	3.5ml	0.7	Disolución 5

Curva de calibración para el octanoato de etilo entre 100 y 600 ng mL<sup>-1</sup>.



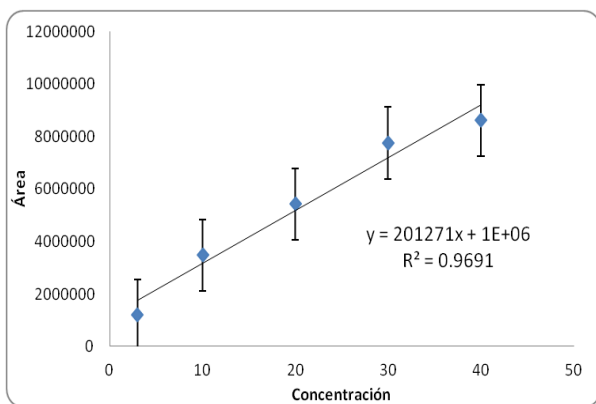
[C] dis. madre (ng mL <sup>-1</sup> )	Alícuota tomada	[C] final (ng mL <sup>-1</sup> )	Aforo a 25ml
2000	1.25ml	0.1	Disolución 1
2000	2.5ml	0.2	Disolución 2
2000	3.75ml	0.3	Disolución 3
2000	5ml	0.4	Disolución 4
2000	7.5ml	0.6	Disolución 5

Curva de calibración para el nonanoato de etilo entre 0.15 y 0.75 ng mL<sup>-1</sup>.



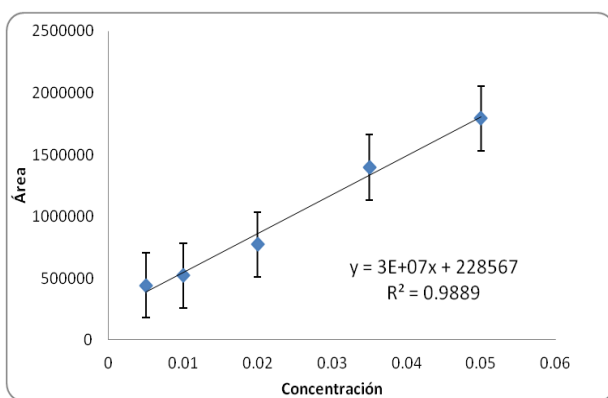
[C] dis. madre (ng mL <sup>-1</sup> )	Alícuota tomada	[C] final (ng mL <sup>-1</sup> )	Aforo a 25ml
2	1.8ml	0.15	Disolución 1
2	3.7ml	0.3	Disolución 2
2	5.6ml	0.45	Disolución 3
2	7.5ml	0.6	Disolución 4
2	9.4ml	0.75	Disolución 5

Curva de calibración para el decanoato de etilo entre 3 y 40 ng mL<sup>-1</sup>.



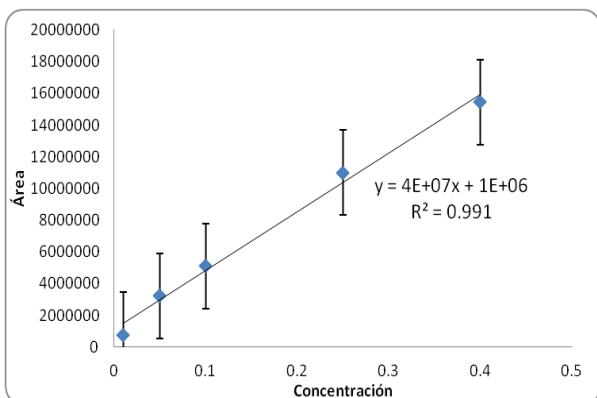
[C] dis. madre (ng mL <sup>-1</sup> )	Alícuota tomada	[C] final (ng mL <sup>-1</sup> )	Aforo a 25ml
100	0.75ml	3	Disolución 1
100	2.5ml	10	Disolución 2
100	5ml	20	Disolución 3
100	7.5ml	30	Disolución 4
100	10ml	40	Disolución 5

Curva de calibración para el dodecanoato de etilo entre 5 y 50 ng mL<sup>-1</sup>.



[C] dis. madre (ng mL <sup>-1</sup> )	Alícuota tomada	[C] final (ng mL <sup>-1</sup> )	Aforo a 25ml
200	0.6ml	5	Disolución 1
200	1.25ml	10	Disolución 2
200	2.5ml	20	Disolución 3
200	4.4ml	35	Disolución 4
200	6.25ml	50	Disolución 5

Curva de calibración para el 2-fenil acetato de etilo entre 10 y 400 ng mL<sup>-1</sup>.



[C] dis. madre (ng mL <sup>-1</sup> )	Alicuota tomada	[C] final (ng mL <sup>-1</sup> )	Aforo a 25ml
1000	0.25ml	10	Disolución 1
1000	1.25ml	50	Disolución 2
1000	2.5ml	100	Disolución 3
1000	6.25ml	250	Disolución 4
1000	10ml	400	Disolución 5

# Referencias

---

1. Li, H.; Wang, H. **(2008)**. "Impact odorants of Chardonnay dry white wine from Changli County (China)", *Eur Food Res Technol.*, **227**, p. 287–292.
2. Catania, C.; Avagnina, S. **(2007)**. "Curso superior de degustación", EEA Mendoza, INTA, Argentina, capítulo 13.
3. Arráiz, H. **(2012)**. "La cata de cerveza: El aroma" <http://culturillacervecera.blogspot.mx>  
Consulta 9 de junio 2014
4. Consulta en el Instituto Nacional de Estadística y Geografía sobre datos relacionados a la cerveza (definición y estadística de consumo y producción de cerveza hasta 2008) [http://www.inegi.org.mx/prod\\_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/integracion/pais/historicas10/Tema11Sector20Manufacturero.pdf](http://www.inegi.org.mx/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/integracion/pais/historicas10/Tema11Sector20Manufacturero.pdf)  
Consulta 22 de octubre 2013.
5. Consulta en la Organización de cerveceros en México "Historia de la cerveza y los objetivos de la industria cervecera en México"  
<http://www.cervecerosdemexico.org.mx/objetivos-vision-y-valores>  
Consulta 20 de febrero 2014.
6. Meilgaard, M. C. **(1982)**. "Prediction of flavor differences between beers from their chemical composition". *J. Agr. Food Chem.*, **30**, p. 1009-1017.
7. Tressl, R. **(1978)**. "Gas Chromatographic-Mass Spectrometric Investigation of Hop Aroma Constituents in Beer". *J. Agric. Food Chem.*, **26**(6), p. 1422-1426.
8. Buckee, G. K. **(1992)**. "Determination of the volatile components of beer". *J. Inst. Brew.*, **98**, p. 78-79.
9. Irwin, A.; Thompson, D. J. **(1987)**. "A rapid method for the extraction and analysis of beer flavour components". *J. Inst. Brew.*, **93**, p. 113-115.

## *Referencias*

---

10. Baltussen, E. **(1999)**. "Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE), a Novel Extraction Technique for Aqueous Samples: Theory and Principles". *J. Microcolumn Separations*, **11**(10), p. 737-747.
11. Horak, T. **(2010)**. "Analysis of Selected Esters in Beer: Comparison of Solid-Phase Microextraction and Stir Bar Sorptive Extraction". *J. Inst. Brew.* **116**(1), p. 81–85.
12. Olvera, A. **(2013)**. "Determinación de compuestos volátiles y semivolátiles en cerveza por MEFS-CG-EM y su relación con su perfil sensorial". Tesis Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., 100 p.
13. Irwin, A. **(1989)**. "Varietal dependence of hop flavour volatiles in Lager". *Inst. Brew.*, **95**, p. 185-194.
14. Skoog, D. **(2005)**. "Principios de Análisis Instrumental", 8ª Edición, Mc Graw Hill, España.
15. Norma Oficial Mexicana NOM-142-SSA1-1995. Bienes y servicios. Bebidas alcohólicas. Especificaciones sanitarias. Etiquetado sanitario y comercial. (Definición de bebidas alcohólicas, destiladas y fermentadas).
16. Wade, L.G, **(2004)**. "Química orgánica", 5ª Edición, Pearson, España.
17. Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicio. Publicado en el Diario Oficial de la Federación el 18 de enero de 1988. Capitulo V. Cerveza (Definición de cerveza).
18. García M., Quintero R., López A., **(2004)**. "Biotecnología de alimentos", 1ª Edición, Limusa, México D.F., capítulo 8.
19. Briggs, D. **(1982)**. "Malting and brewing Science", Vol.1, 1ª Edición, Chapman and Hall, Inglaterra.

## Referencias

---

20. Briggs, D. **(1982)**. "Malting and brewing Science", Vol.2, 2ª Edición, Chapman and Hall, Inglaterra.
21. Poppi, J. **(2008)**. "Exploratory analysis of the volatile profile of beers by HS-SPME-GC", J.Agric.Food Chem., **111**, p. 1057-1063.
22. Santillán, M.; García, M. **(2000)**. "Producción de congenéricos durante la fermentación de la cerveza", Vol. 1, 1ª Edición, Limusa, México.
23. HVG Cooperativa de Explotación de Lúpulo. (Lúpulo en la cerveza)  
<http://hvg-germany.de/es/en-la-cerveceria/lupulo-en-la-cerveza>  
Consulta 2 de junio 2014.
24. McNair, H.; Miller, J. **(1998)**. "Basic gas chromatography", 2ª edición, John Wiley & Sons. Inc., Canada.
25. McNair, H. **(1981)**. "Cromatografía de gases", monografía N°23, Secretaria General de la Organización de los Estados Americanos, EUA.
26. Harris, D. **(2001)**. "Análisis químico cuantitativo", 2ª edición, Reverté, España, capítulo
27. Skoog, D. **(2005)**. "Fundamentos de química analítica", 8ª edición, Thomson, España.
28. Guía de información para el usuario, Agilent (información sobre tipos de inyectores)  
[https://www.chem.agilent.com/Library/usermanuals/Public/Contents\\_023866](https://www.chem.agilent.com/Library/usermanuals/Public/Contents_023866)  
Fecha de publicación: Abril 2001
29. Requena, A; Zúñiga, J. **(2003)**. "Espectroscopía".1ª Edición, Pearson-Prentice Hall, Madrid.
30. Guía de selección de columnas, Agilent (información sobre columnas capilares),  
<http://www.chem.agilent.com/>  
Fecha de publicación: Mayo 2007
31. GI70IDA MSD Chem Station **(2001)**. Versión D.00.00.38, Agilent Technologies.



32. Pawliszyn, J. **(1997)**. "Solid phase microextraction theory and practice", New York, USA, 1<sup>a</sup> ed., Wiley-VCH.
33. Vas, G. **(2004)**. "Solid-phase microextraction: a powerful simple preparation tool prior to mass spectrometric analysis", *J. Mass Spectrom.*, **39**, p. 233–254.
34. Biazon, C.; Brambilla, R. **(2009)**. "Combining silica-based adsorbents and SPME fibers in the extraction of the volatiles of beer: an exploratory study". *Anal. Bioanal. Chem.*, **394**, p. 549–556.
35. Pinho, O.; Ferreira, I.; Santos, L. (2006). "Method optimization by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography with mass spectrometry for analysis of beer volatile fraction". *J. of Chrom. A.*, **1121**, p. 145–153.
36. Charry, G.; De Jesus M. **(2011)**. "Volatile Analysis: Optimization of HS/SPME Coupled to GC/MS/FID". *J. of Food Science*, **76** ( 2), p. 205-211.
37. Hu, B.; Xiao, Q. **(2006)** "Comparison of headspace and direct single-drop microextraction and headspace solid-phase microextraction for the measurement of volatile sulfur compounds in beer and beverage by gas chromatography with flame photometric detection". *J. of Chrom. A.*, **1125**, p. 133–137.
38. Biazon, C.; Brambilla, R. **(2009)**. "Combining silica-based adsorbents and SPME fibers in the extraction of the volatiles of beer: an exploratory study". *Anal. Bioanal. Chem.*, **394**, p. 549–556.
39. Wlazły, K. **(1998)**. "Solid-Phase Microextraction for the Analysis of some Alcohols and Esters in Beer: Comparison with Static Headspace Method". *J. Agric. Food Chem.*, **46**, p. 1469-1473.

## *Referencias*

---

40. Mingming, L.; Zhaorui, Z.; Bo, X. **(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". J. of Chrom. A., **1065**, p. 287–299.
41. Kobayashi M. ; Shimizu H. **(2008)**. "Beer Volatile Compounds and Their Application to Low-Malt Beer Fermentation". S. for Biotech., **106**, 317–323.