

## MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA APLICADA EN LA CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL VOLÁTIL EN CERVEZA

M. Estarrón-Espinosa<sup>a</sup>, M.V. Montoya-Hernández<sup>a</sup>, J.E. López-Ramírez<sup>a</sup>, F.J. Pérez-Martínez<sup>a</sup>, M. Arellano-Plaza<sup>b</sup>, J. Villafaña-Rojas<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Unidad de Tecnología Alimentaria, <sup>b</sup> Unidad de Biotecnología Industrial. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.-Campus Zapopan. Camino Arenero 1227, El Bajío del Arenal, C.P. 45019, Zapopan, Jalisco. <sup>c</sup> Departamento de Química, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Guadalajara/ Av. Patria 1201, Col. Lomas del Valle, C.P. 45129, Zapopan, Jalisco, México. \*mestarron@ciatej.mx

### RESUMEN:

El conocimiento de la composición volátil que determina el aroma de las bebidas alcohólicas es un aspecto importante en la determinación de su calidad. En este estudio se evaluaron diferentes factores involucrados la recuperación cualitativa y cuantitativa de los compuestos que constituyen el perfil volátil de la cerveza, mediante el uso de microextracción en fase sólida en el espacio de cabeza seguido de cromatografía gaseosa-espectrometría de masas (HS-SPME-GC-MS). De los factores evaluados, solamente el tipo de fibra utilizada y la adición de sal mostraron diferencias significativas en la recuperación de los compuestos volátiles. Utilizando una fibra de DVB/CAR/PDMS y 5 ml de muestra adicionada con 20 % de sal, se identificaron 54 componentes volátiles involucrados en las características sensoriales de la cerveza. Cuantitativamente, los alcoholes, ésteres y ácidos fueron los mayores componentes del perfil volátil en cervezas claras elaboradas en México.

### ABSTRACT:

The knowledge of the volatile composition that determines the alcoholic beverages aroma is a major aspect in his quality measurement. In this work, various factors that are involved in the qualitative and quantitative extraction of the volatile profile of beer were evaluated by solid phase micro extraction combined with gas chromatography mass spectrometry (HS-SPME-GC-MS). The factors that showed significant differences in the extraction of the volatile compounds were the fiber composition and salting above all the factors evaluated. Using a 5 ml sample with 20 % of salt added, 54 aroma compounds were identified, of which alcohols, esters and organic acids were quantitatively the most abundant in the volatile profile of Mexican clear beers.

**Palabras clave:** HS-SPME, cerveza, perfil volátil

**Keywords:** HS-SPME, beer, volatile profile

**AREA:** Otros

### INTRODUCCIÓN

La cerveza es una de las bebidas alcohólicas más consumidas en América Latina, siendo México el sexto mayor consumidor en el mundo. Esta bebida se obtiene mediante la fermentación de una mezcla que consiste principalmente de cereales malteados, lúpulo, levaduras y agua. Las diferentes combinaciones de ingredientes y procesos de fabricación dan lugar a un producto químicamente complejo constituido principalmente de agua, etanol, carbohidratos, proteínas, además de un gran número de compuestos volátiles de diferente naturaleza química cuya proporción determinará las características y el gusto del producto final (Baxter & Hughes, 2001; RübSam, 2013).

En la elaboración de la cerveza, la fermentación y la maduración constituyen las etapas decisivas en la expresión de la calidad final del producto. Durante éstas se gestan importantes transformaciones bioquímicas dando lugar a la formación de una gran cantidad de compuestos volátiles, que aunque están presentes en pequeñas cantidades, contribuyen en los atributos sensoriales percibidos por el consumidor. El amplio rango de concentración en que se encuentran estos compuestos, además de la complejidad de la matriz en la que están contenidos, ha motivado diversas investigaciones enfocadas en el uso de diferentes técnicas analíticas capaces de extraer los compuestos volátiles de la matriz hidro-alcohólica y llevarlos a límites instrumentales que permitan su identificación y cuantificación (Bamforth & Stewart, 2011; Rodrigues *et al.*, 2011; Pinho & Santos, 2006).

Uno de los métodos que ha sido desarrollado con éxito en los últimos años ya que permite la determinación rápida de los perfiles volátiles con amplios rangos de puntos de ebullición y polaridad sin el empleo de solventes, es la microextracción en fase sólida (SPME) complementada con la separación de los analitos empleando cromatografía de gases (Pawliszyn, 1997; Hrivňák *et al.*, 2010). En este proceso diferentes factores influyen en la extracción de los componentes volátiles de la muestra. Entre ellos el tipo de material de la fibra, temperatura de extracción, saturación salina, tiempo de equilibrio de la muestra, tiempo de exposición de la fibra y el tiempo de desorción en el cromatógrafo, son determinantes tanto en el tipo de componentes extraídos como en la concentración detectada de éstos. (Charry-Parra *et al.*, 2011; Hrivňák *et al.*, 2010; Pinho & Santos, 2006; da Silva *et al.*, 2008).

Dado que existe poca información sobre la calidad fisicoquímica de las cervezas mexicanas, especialmente sobre la composición volátil íntimamente relacionada con su calidad, el objetivo de este trabajo fue optimizar las condiciones de microextracción en fase sólida en el espacio de cabeza (HS-SPME), previo al análisis cromatográfico, que permitan caracterizar la fracción volátil de la cerveza.

### **MATERIALES Y MÉTODOS.**

#### **Selección y preparación de Muestras**

Dos diferentes marcas de cerveza clara mexicana fueron adquiridas en un centro comercial. Las cervezas fueron desgasificadas durante 20 minutos en un baño ultrasónico a baja temperatura, previo al análisis.

#### **Optimización de la microextracción en fase sólida (HS-SPME)**

Los factores evaluados para optimizar las condiciones de extracción que maximizaran la recuperación de compuestos volátiles fueron: tipo de fibra (DVB/CAR/PDMS, CAR/PDMS y PA), salteo de la muestra (0%, 10% y 20%), temperatura de equilibrio (35°C, 45°C y 60°C), tiempo de equilibrio de la muestra (15, 30 y 45 min respectivamente) y tiempo de exposición (15, 30 y 45 min respectivamente). La microextracción se realizó manualmente colocando 5 ml de muestra en un vial de 22 ml, con agitación a 300 rpm.

Para evaluar el número de componentes y el área recuperada durante las diferentes extracciones, la desorción de la fibra en cada ensayo se realizó directamente en el inyector de un cromatógrafo de gases 6890 Series durante 5 minutos, operando en modo *split* a 220°C. La separación de los componentes extraídos se efectuó en una columna capilar HP-INNOWAX de 60m x 0.25mm DI x 0.25 mm de espesor. La temperatura inicial del horno se programó a 40°C durante 5 min, después se incrementó a 240°C con un gradiente de 3°C/min, manteniendo 5 minutos y finalmente hasta una temperatura de 250°C aumentando

10°C/min, mantenida 20 minutos. El gas acarreador fue He a un flujo de 0.7 ml/min. El detector operó a una temperatura de 260°C.

### **Tratamiento de datos**

Una vez concluidos todos los ensayos de optimización, los resultados fueron evaluados por medio de un análisis de varianza simple (ANOVA) utilizando el software *Statgraphics Centurion XVI.II.*, en el cual se analizó la influencia de cada factor sobre la concentración (área) y el número de compuestos obtenidos eligiendo las condiciones con el mejor rendimiento de extracción para proceder a la caracterización del perfil volátil de las muestras seleccionadas.

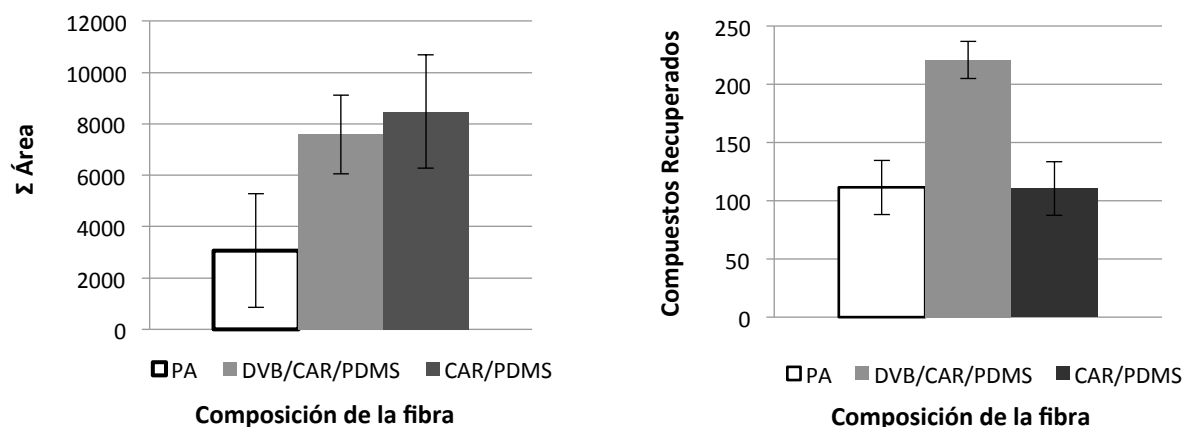
### **Caracterización del perfil volátil de la cerveza**

Se colocaron 5 ml de la muestra en viales de 22 ml con agitación. La desorción de los compuestos volátiles extraídos se realizó de acuerdo a las condiciones optimizadas utilizando un cromatógrafo de gases HP 5890 Series II acoplado a un espectrómetro de masas HP 5972. El detector operó a 70 eV. La identificación de los componentes separados fue efectuada en base a la comparación de espectros de los picos separados en la muestra con los de las bibliotecas Wiley 275L y NIST05L, y cuando fue posible, en base a los tiempos de retención de compuestos puros. La cuantificación preliminar fue basada en la proporción relativa de las áreas de los picos de los compuestos identificados. Cada muestra fue analizada por duplicado.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN.**

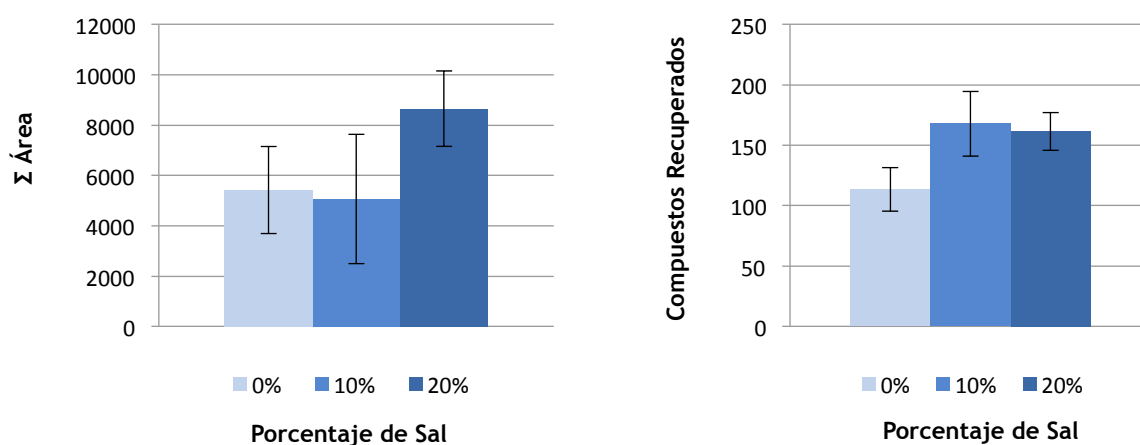
El análisis estadístico realizado tanto a los datos de área total recuperada de los componentes, como al número de compuestos separados, mostró que de los factores evaluados, los que tuvieron un efecto significativo sobre estas dos variables de respuesta fueron el tipo de fibra y el porcentaje de sal adicionado (datos no mostrados).

La figura 1, muestra el efecto del tipo de fibra utilizada sobre el número de compuestos y el área recuperada de éstos. Se puede observar que la fibra recubierta con Carboxeno/Polidimetilsiloxano (CAR/PDMS) recuperó mayor área de compuestos volátiles, pero no hubo diferencia en esta variable con la fibra de Divinilbenceno/Carboxeno/Polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS), mientras que la fibra recubierta con Poliacrilato (PA) recuperó significativamente menor área, la cual está directamente relacionada con su concentración. En cuanto al número de compuestos recuperados, las fibras recubiertas de (PA) y (CAR/PDMS) no mostraron diferencias significativas en comparación con la de (DVB/CAR/PDMS), que tuvo una mayor eficiencia en la recuperación de diversos compuestos volátiles de la cerveza.



**Figura 1.** Efecto del tipo de fibra sobre el área total (A) y el número de compuestos recuperados (B).

Por otra parte el efecto de la adición de sal puede observarse en la figura 2. La adición de 20% de sal previo a la extracción de los compuestos mejoró significativamente la concentración total de compuestos volátiles recuperados, mientras que la adición del 10% (w/v) de sal e incluso el no adicionarla a la muestra, no mostró diferencias estadísticas significativas en el área recuperada. En cambio, el número de compuestos extraídos fue significativamente menor en las extracciones no adicionadas con sal y mayor, aunque sin diferencias significativas cuando fue adicionado 10 y 20 % (w/v) de sal.



**Figura 2.** Efecto del salteo en el área total recuperada (A) y el número de compuestos extraídos (B).

De acuerdo a los resultados observados, como parámetros conducentes a una mejor extracción de los componentes volátiles de la cerveza, se utilizó la fibra recubierta con DVB/CAR/PDMS, adición de 20% de sal previo a la extracción, agitación a 300 rpm, un tiempo de equilibrio de 15 minutos a una temperatura de 45°C, exponiendo la fibra durante 45 minutos. Los últimos tres parámetros fueron seleccionados debido a que presentaron el mayor promedio en cuanto al número de compuestos extraídos, a pesar de no haber mostrado diferencias significativas durante la optimización.

Bajo estas condiciones de extracción se obtuvo la proporción en composición, basada en unidades de área, de 54 compuestos volátiles comunes en ambas cervezas. La mayor

concentración volátil correspondió al grupo de alcoholes, seguido por el grupo de ésteres, ácidos y fenoles. Entre los compuestos pertenecientes a estos grupos sobresalió además de la concentración del etanol, la de los alcoholes isoamílico y fenilético; de los ésteres acetato de etilo, acetato de isoamilo y acetato de fenetilo; los ácidos hexanoico, octanoico y decanoico; el 2,4-diterbutilfenol entre los fenoles volátiles y en menor concentración la beta-damascenona, nonalactona, el citrionelol y linalol, así como el metionol.

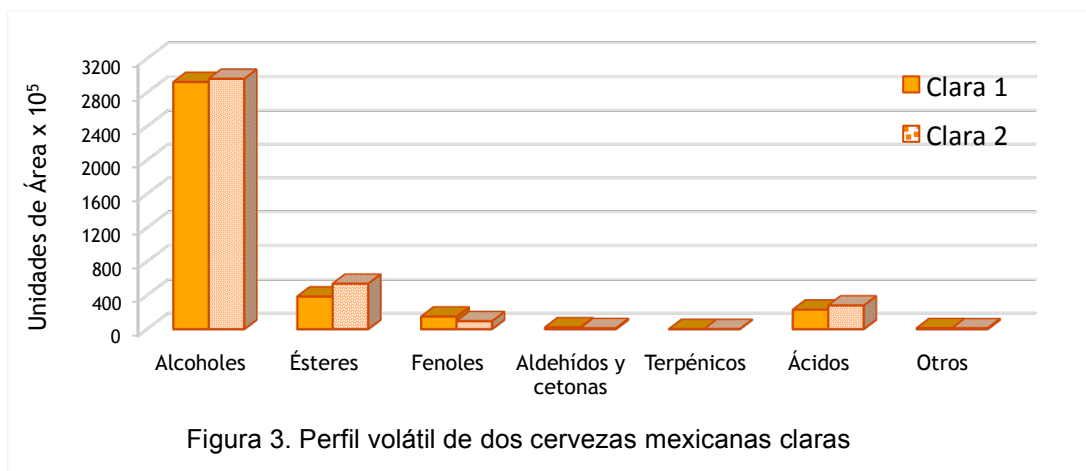


Figura 3. Perfil volátil de dos cervezas mexicanas claras

De entre los principales grupos de compuestos volátiles identificados en las cervezas claras, los alcoholes constituyen una parte importante de los productos secundarios generados durante la fermentación de la cerveza, estos contribuyen a los aromas fuertes y pungentes de la cerveza y su formación está ligada a la síntesis de proteína en la levadura. Su importancia radica en que actúan como precursores de los ésteres activos del sabor (Charry-Parra *et al.*, 2011; Pinho & Santos, 2006). Los ésteres son considerados el grupo más importante de compuestos volátiles, son formados principalmente durante la fermentación y son característicos de una cerveza joven. El acetato de isoamilo, es considerado uno de los ésteres más importantes en el perfil aromático de la bebida por su aporte a notas frutales. Los ácidos, constituyen un grupo importante de compuestos aromáticos que pueden contribuir con notas frutales, de queso y grasas. También contribuyen al amargor, la astringencia y la rancidez de la cerveza. La concentración de los ácidos cambia durante la maduración de la cerveza y son indicadores sensibles de daños inducidos a la cerveza por calor (Pinho & Santos, 2006). De manera similar, aún en bajas concentraciones, los otros grupos de compuestos volátiles tienen una importante influencia en la percepción sensorial global de la cerveza.

Por su impacto en las características sensoriales, el conocimiento de los perfiles volátiles contribuye, sin duda, en la comprensión y el establecimiento de estándares de calidad de la cerveza. Por lo anterior el uso de herramientas analíticas rápidas, aunada a condiciones de extracción y separación que permitan la recuperación de un mayor número de componentes volátiles en concentraciones adecuadas, es imprescindible en la caracterización volátil de esta bebida. En este trabajo se establecieron condiciones que permitieron optimizar tanto la obtención de un mayor número de componentes como de su área, para que aunada con el análisis cromatográfico acoplado a espectrometría de masas, coadyuven en el conocimiento del perfil volátil de cervezas elaboradas en México.

### Agradecimientos

Se agradece el apoyo financiero del proyecto CEREAGAVE del CIATEJ, A.C. para la realización de este estudio.

### **BIBLIOGRAFÍA**

- Bamforth, C., Russell, I., & Stewart, G. 2011. Beer: A quality perspective. Academic Press.
- Charry-Parra, G., DeJesus-Echevarria, M., & Perez, F. J. 2011. Beer volatile analysis: optimization of HS/SPME coupled to GC/MS/FID. *Journal of food science*, 76(2), C205-C211.
- Hrivňák, J., Šmogrovičová, D., Nádaský, P., & Lakatošová, J. 2010. Determination of beer aroma compounds using headspace solid-phase microcolumn extraction. *Talanta*, 83(1), 294-296.
- Baxter, E. D., & Hughes, P. S. 2001. Beer: Quality, safety and nutritional aspects. *Royal Society of Chemistry*.
- Pawliszyn, J. 1997. *Solid Phase Microextraction: Theory and Practice*. John Wiley & Sons.
- Pinho, O., Ferreira, I. M., & Santos, L. H. 2006. Method optimization by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography with mass spectrometry for analysis of beer volatile fraction. *Journal of Chromatography A*, 1121(2), 145-153.
- Rodrigues, J. A., Barros, A. S., Carvalho, B., Brandão, T., Gil, A. M., & Ferreira, A. C. S. 2011. Evaluation of beer deterioration by gas chromatography–mass spectrometry/multivariate analysis: A rapid tool for assessing beer composition. *Journal of chromatography A*, 1218(7), 990-996.
- Rübsam, H., Gastl, M., & Becker, T. 2013. Influence of the range of molecular weight distribution of beer components on the intensity of palate fullness. *European Food Research and Technology*, 236(1), 65-75.
- da Silva, G. A., Augusto, F., & Poppi, R. J. 2008. Exploratory analysis of the volatile profile of beers by HS–SPME–GC. *Food Chemistry*, 111(4), 1057-1063.