



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
POSTGRADO EN QUÍMICA

***Estudios analíticos por técnicas cromatográficas de la
participación de los ácidos amargos derivados del
lúpulo en la formación de los aldehídos de
Strecker en la cerveza***

Tesis Doctoral presentada ante la ilustre
Universidad Central de Venezuela por la
Lic. Génesis J. Carrillo M para optar al
título de Doctora en Ciencias, Mención
Química.

Tutor: Dra. Adriana Bravo

Caracas - Venezuela

15 de Febrero de 2011

“Al único que puede sostenerme, sin Él nada soy, mi amado Dios”

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y hermanas por estar siempre allí para mí y apoyarme. Gracias por no dejarme desmayar y por ser parte de los que me levantaron.

A mi tutora Adriana Bravo por guiarme en el desarrollo de este trabajo, por su apoyo constante y por abrir mi mente en un mundo tan interesante como el de la estabilidad del sabor de la cerveza, mil gracias!

A Empresas Polar por darme la oportunidad de desarrollar este proyecto como tesis de doctorado y la oportunidad de crecer profesionalmente.

A cada una de las gerentes por animarme y enseñarme con firmeza en cada labor realizada, con cada actividad aprendí mucho, sobre todo en materia de orden, seguridad y limpieza. Agradezco en especial a Graciela Troncone por ayudarme a solventar cada problema instrumental.

A toda mi gente bella de Polar por brindarme su calidez, una sonrisa, solidaridad y animarme siempre!: Lauri, Patricia, Carlos, Raquel, Montbruncita, Marianna, Luisi, Omar, Hector, Lusmary, Andreína, mi Sra Milagritos, mi Sra Irenita, Manuel, mil gracias!

A mis amados amigos por ser una fuente de estímulo constante en mi vida: Yusmary, Esmeralda, Esther, Hernani, Odry, Daniela, Juan, Mireya (mi segunda mamá), Álvaro, Carlos Avendaño, Eiling, Ervis, Jonathan, Engelberg, Jeimy, Anmary, Eyllin, Libia, María Goncálves, Roni, María Freitas, Wendy, Yoana.

A la profesora María Álvarez por guiarme siempre y estar allí para mí.

A Edgar, por cambiar mi vida y llenarme de fuerzas y amor para seguir adelante!

A cada profesor que me enseñó, inspiró y abrió mi mente en el mundo científico.

A los profesores: Elena Ehrmann, Beth Díaz, Luis Gómez y José Chirinos, por su contribución al evaluar este trabajo.

Al Fonacit por el financiamiento otorgado para la realización de este doctorado.

INDICE GENERAL

INDICE DE TABLAS	VI
INDICE DE FIGURAS	VII
LISTA DE ABREVIATURAS	IX
RESUMEN	XI
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1 La matriz de la cerveza	3
2.2 Cambios químicos durante el almacenamiento de la cerveza	4
2.2.1 Mecanismos de formación de los aldehídos de Strecker	4
2.2.2 Uso de sistemas modelo para estudiar posibles rutas de reacción en la cerveza	6
2.3 Determinación de aldehídos asociados al envejecimiento de la cerveza	8
2.3.1 Fundamentos de SPME	11
2.3.2 Fundamentos de la derivatización sobre la fibra	12
2.4 Ácidos amargos del lúpulo y sus derivados	15
2.4.1 Análisis de extractos de lúpulo	17
III. JUSTIFICACIÓN	21
IV. OBJETIVOS	24
V. PARTE EXPERIMENTAL	25
5.1 Optimización de una metodología para la determinación de aldehídos de Strecker, furfural y (E)-2-nonenal mediante derivatización sobre la fibra y GC/MS	25
5.1.1 Instrumentación	25
5.1.2 Reactivos	26
5.1.3 Preparación de soluciones de aldehídos	26
5.1.4 Muestras de cerveza	26
5.1.5 Metodología	26
5.2 Optimización de la separación cromatográfica de iso- α -ácidos, tetrahidro-iso- α -ácidos, rho-iso- α -ácidos y hexahidro-iso- α -ácidos en diferentes tipos de lúpulo y cerveza por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)	31
5.2.1 Instrumentación	31
5.2.2 Reactivos y materiales empleados	31

5.2.3 Metodología	32
5.3 Seguimiento de la formación de aldehídos de Strecker y de la degradación de ácidos amargos en sistemas modelos y cervezas	33
5.3.1 Reactivos empleados	33
5.3.2 Preparación de soluciones	34
5.3.3 Cervezas empleadas	35
5.3.4 Metodología	35
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
6.1 Optimización de una metodología para la determinación de aldehídos de Strecker, furfural y (E)-2-nonenal en cerveza mediante la derivatización sobre la fibra y GC/MS	38
6.1.1 Separación e identificación	38
6.1.2 Estudio de los factores involucrados en el proceso de cargado del recubrimiento con PFBHA	39
6.1.3 Estudio del efecto de los factores en el proceso de derivatización sobre la fibra	42
6.1.4 Perfiles de tiempo de extracción	46
6.1.5 Validación del método	49
6.2 Optimización de la separación cromatográfica de iso-α-ácidos, rho-iso-α-ácidos, tetrahidro-iso-α-ácidos y hexahidro-iso-α-ácidos en diferentes tipos de lúpulo y cerveza por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)	55
6.2.1 Extracción de iso- α -ácidos y tetrahidro-iso- α -ácidos en cerveza por sorción con barras magnéticas agitadoras (SBSE)	69
6.3 Seguimiento de la formación de los aldehídos de Strecker y de la degradación de ácidos amargos en sistemas modelo y cervezas	74
6.3.1 Formación de aldehídos de Strecker en sistemas modelo	74
6.3.2 Degradación de los ácidos derivados del lúpulo durante el almacenamiento	83
6.3.3 Formación de aldehídos de Strecker en cerveza	92
6.3.4 Degradación de los ácidos del lúpulo en cerveza	95
VIII. RECOMENDACIONES	102
IX. BIBLIOGRAFÍA	103
X. APÉNDICES	108
APÉNDICE A. Espectros de masas de las oximas obtenidos por impacto de electrones (EI)	108
APÉNDICE B. Resultados del ANOVA y pruebas realizadas para la verificación de los supuestos del modelo para 2-metil-butanal (solución estándar)	109
APÉNDICE C. Espectros de masas de las oximas obtenidos por ionización química negativa (NCI)	112
APÉNDICE D. Reportes de las fichas técnicas de los iso- α -ácidos modificados y sin modificar	113
D.1. Iso-α-ácidos	113
D.2. Tetrahidro- iso-α-ácidos	114
D.3. Rho-iso-α-ácidos	115
D.4. Hexahidro-iso-α-ácidos	116
APÉNDICE E. Espectros UV obtenidos para cada grupo de iso- α -ácidos	117

INDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Aldehídos generados en la degradación de Strecker de los aminoácidos	7
Tabla 2. Determinación de compuestos carbonílicos con diversas técnicas analíticas	10
Tabla 3. Determinación de ácidos amargos de la cerveza por HPLC/DAD	20
Tabla 4. Matriz del diseño factorial 2^2	28
Tabla 5. Matriz del diseño factorial 2^3	29
Tabla 6. Método recomendado y aplicado para la identificación de cada tipo de iso- α -ácido	32
Tabla 7. Iones monitorizados con el modo SIM por impacto de electrones (EI)	39
Tabla 8. Matriz del diseño factorial 2^2 , niveles y valores de la respuesta	41
Tabla 9. Análisis de varianza para diseño de saturación de la fibra.....	41
Tabla 10. Efectos principales, interacciones entre factores y efecto del bloque para cada analito en cerveza y soluciones estándares de aldehídos (etanol 5 %).....	43
Tabla 11. Linealidad, límite de detección, límite de cuantificación y repetibilidad del método optimizado utilizando como estándar interno el 3-metil-2-butenal.....	50
Tabla 12. Porcentaje de recuperación de aldehídos en muestras de cerveza empleando como estándar interno 3-metil-2-butenal	51
Tabla 13. Iones monitorizados con el modo SIM por NCI	52
Tabla 14. Linealidad, límite de detección, límite de cuantificación y repetibilidad del método optimizado utilizando como estándar interno el 3-metil-2-butenal.....	53
Tabla 15. Comparación de las concentraciones encontradas en cerveza con impacto de electrones e ionización química negativa utilizando como estándar interno el 3-metil-2-butenal.....	54
Tabla 16. Concentración de aldehídos generados al final del seguimiento de los sistemas modelo	83

INDICE DE FIGURAS

Pág.

Figura 1. Degradación de Strecker de los aminoácidos	5
Figura 2. Oximas generadas en la derivatización con PFBHA	9
Figura 3. Pasos de la derivatización sobre la fibra	13
Figura 4. Isomerización de α -ácidos a iso- α -ácidos	16
Figura 5. Producción de isohumulonas reducidas e hidrogenadas a partir de la <i>trans</i> -isohumulona	17
Figura 6. Barra magnética recubierta de polidimetilsiloxano	19
Figura 7. Cromatograma SIM de una mezcla de estándares de aldehídos derivatizados con PFBHA.	38
Figura 8. Efecto de la concentración de derivatizante sobre la respuesta del PFBHA	40
Figura 9. Efecto de la temperatura sobre la respuesta del PFBHA	41
Figura 10. Gráficos de interacción tiempo-temperatura	44
Figura 11. Diagrama esquemático de las reacciones involucradas en el proceso de derivatización y extracción simultánea sobre una fibra.	45
Figura 12. Perfiles de tiempo de extracción para las oximas de los aldehídos en cerveza y soluciones estándar	48
Figura 13. Separación de iso- α -ácidos de un extracto isomerizado	56
Figura 14. Cromatograma de un extracto isomerizado empleando $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}:\text{H}_3\text{PO}_4$ en diferentes proporciones (a, b) y separación de <i>trans</i> -iso- α -ácidos del estándar DCHA-iso (c)	57
Figura 15. Efecto del porcentaje de ácido fosfórico en la separación de iso- α -ácidos empleando $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (55:45, v/v)	59
Figura 16. Separación cromatográfica de iso- α -ácidos empleando $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}:\text{H}_3\text{PO}_4$ (45:55:0,05, v/v/v)	60
Figura 17. Separación cromatográfica de iso- α -ácidos empleando 45% $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}:\text{H}_3\text{PO}_4$ y 9% CH_3OH (0,08 % H_3PO_4)	61
Figura 18. Enriquecimiento del extracto isomerizado con una solución estándar de <i>trans</i> -iso- α - ácidos	62
Figura 19. Separación de tetrahidro-iso- α -ácidos de un estándar comercial	63
Figura 20. Separación de tetrahidro-iso- α -ácidos de un extracto de lúpulo empleando $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}:\text{H}_3\text{PO}_4$ (64:36:0,3, v/v/v) (a), 55:45:0,3, v/v/v (b) y 50:50:0,3, v/v/v (c)	63
Figura 21. Separación de <i>cis</i> - ρ -iso- α -ácidos de un estándar comercial empleando $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}:\text{H}_3\text{PO}_4$ (75:24:1, v/v/v)	64
Figura 22. Disminución de la fuerza de solvente para la separación de <i>cis</i> - ρ -iso- α -ácidos	64
Figura 23. Separación de ρ -iso- α -ácidos de un extracto de lúpulo ρ con una proporción $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}:\text{H}_3\text{PO}_4$ (65:35:1, v/v/v)	65
Figura 24. Disminución de la fuerza del solvente empleando 0,8 % en H_3PO_4	66
Figura 25. Separación de los hexahidro-iso- α -ácidos de un estándar comercial (a) y de un extracto de lúpulo hexa (b) empleando el método EBC 7.9	67
Figura 26. Efecto del ácido fosfórico en la separación de los hexahidro-iso- α -ácidos de un extracto de lúpulo hexa	68
Figura 27. Disminución de la fuerza del solvente en la separación de hexahidro-iso- α -ácidos	69
Figura 28. Extracción de iso- α -ácidos de la cerveza A mediante SBSE empleando diferentes volumenes	70
Figura 29. Efecto del tiempo de extracción y la velocidad de agitación en la extracción de iso- α - ácidos de la cerveza A por sorción con barras agitadoras	71
Figura 30. Separación de iso- α -ácidos de la cerveza A	72

Figura 31. Efecto del tiempo de extracción y la velocidad de agitación en la extracción de tetrahidro-iso- α -ácidos de la cerveza B por sorción con barras agitadoras.....	72
Figura 32. Separación de tetrahidro-iso- α -ácidos de la cerveza B	73
Figura 33. Formación de 2-metil-butanal en sistemas modelo.	75
Figura 34. Formación de 3-metil-butanal en sistemas modelo.	76
Figura 35. Formación de 2-metil-propanal d-8 en sistemas modelo.....	77
Figura 36. Formación de 2-metil-propanal en sistemas modelo.	79
Figura 37. Estructura de los <i>trans</i> -iso-alfa ácidos.....	79
Figura 38. Ruta hipotética de la formación de aldehídos a partir de isohumulonas.....	80
Figura 39. Formación de metional en sistemas modelo.	81
Figura 40. Formación de fenilacetaldehído en sistemas modelo	81
Figura 41. Rearreglo hipotético de la molécula de iso- α -ácido	82
Figura 42. Degradación de <i>trans</i> -iso- α -ácidos durante el almacenamiento en presencia y ausencia de aminoácidos	84
Figura 43. Degradación de <i>cis</i> y <i>trans</i> -iso- α -ácidos durante el almacenamiento (a) y relación <i>trans/cis</i> (b).....	85
Figura 44. Disminución en el porcentaje de <i>trans</i> -iso- α -ácidos durante el almacenamiento en presencia y ausencia de aminoácidos	86
Figura 45. Degradación de tetrahidro-iso- α -ácidos durante el almacenamiento en presencia y ausencia de aminoácidos	87
Figura 46. Disminución en el porcentaje de tetrahidro-iso- α -ácidos durante el almacenamiento en presencia y ausencia de aminoácidos	88
Figura 47. Degradación de <i>cis</i> -rho-iso- α -ácidos durante el almacenamiento en presencia y ausencia de aminoácidos	89
Figura 48. Relación <i>trans/cis</i> en sistemas modelo con lúpulo rho.....	90
Figura 49. Degradación de <i>cis</i> -hexahidro-iso- α -ácidos durante el almacenamiento en presencia y ausencia de aminoácidos	91
Figura 50. Relación <i>trans/cis</i> en sistemas modelo con lúpulo hexa.....	91
Figura 51. Generación de aldehídos de Strecker durante el almacenamiento de las cervezas comerciales A y B.	95
Figura 52. Porcentaje de <i>trans</i> -iso- α -ácidos durante el almacenamiento de la cerveza A	96
Figura 53. Relación <i>trans/cis</i> durante el almacenamiento de la cerveza A.....	97
Figura 54. Porcentaje de tetrahidro-iso- α -ácidos durante el almacenamiento de la cerveza B	97

LISTA DE ABREVIATURAS

GC-MS	Cromatografía de gases-espectrometría de masas (gas chromatography-mass spectrometry)
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia (High performance liquid chromatography)
EI	Impacto de electrones (electron impact)
NCI	Ionización química negativa (negative chemical ionization)
SPME	Microextracción en fase sólida (solid phase microextraction)
PDMS-DVB	Polidimetilsiloxano-divinilbenceno (polydimethylsiloxane/divinylbenzene)
PDMS	Polidimetilsiloxano (polydimethylsiloxane)
PFBHA	O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzil)-hidroxilamina (O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylamine)
PFPH	Pentafluorofenilhidrazina (pentafluorophenylhydrazine)
ECD	Detector de captura de electrones (electron capture detector)
HS	Espacio de cabeza (headspace)
SPE	Extracción en fase sólida (solid phase extraction)
SBSE	Extracción por sorción con barras magnéticas agitadoras (stir bar sorptive extraction)
DAD	Detector de arreglo de diodos (diode array detector)
SIM	Monitoreo selectivo de iones (selective ion monitoring)
IUPAC	Unión internacional de química pura y aplicada (International Union of Pure and Applied Chemistry)
ASBC	Asociación Americana de químicos cerveceros (American Society of Brewing Chemists)
EBC	Convención europea de la industria cervecera (European Brewery Convention)

ANOVA	Análisis de varianza (analysis of variance)
LD	Límite de detección (Limit of detection)
LQ	Límite de cuantificación (Limit of quantitation)
CV	Coefficiente de variación (coefficient of variation)
IS	Estándar interno (Internal standard)

RESUMEN

Se estudió la participación de los ácidos amargos del lúpulo en la generación de los aldehídos de Strecker en cerveza haciendo uso de las técnicas cromatográficas GC-MS y HPLC. Para la determinación de los aldehídos de Strecker en cerveza se optimizó una metodología, la cual consistió en la derivatización de los analitos sobre una fibra de PDMS-DVB y su posterior determinación por GC-MS (EI/NCI). Fueron obtenidos límites de detección entre 0,013 y 2 $\mu\text{g L}^{-1}$ y coeficientes de variación entre 1 y 13,6 %, comparables a métodos similares reportados. La metodología fue validada mediante estudios de recuperación, obteniéndose recuperaciones entre 73 y 117 %, lo cual confirma la eficacia del método de estandarización interna empleado. La separación de los diversos tipos de ácidos del lúpulo se llevó a cabo mediante HPLC. Se logró la separación de la mayor parte de las especies *cis* y *trans* y sus diastereoisómeros en los cuatro tipos de extractos de lúpulo estudiados: iso- α -ácidos (6 especies), tetrahidro-iso- α -ácidos (5 especies), rho-iso- α -ácidos (9 especies) y hexahidro-iso- α -ácidos (12 especies).

La participación de los ácidos amargos del lúpulo en la formación de los aldehídos de Strecker se evaluó en sistemas modelo y en cerveza. Se estudiaron 9 sistemas modelo: soluciones de iso- α -ácidos, tetrahidro-iso- α -ácidos, rho-iso- α -ácidos y hexahidro-iso- α -ácidos en presencia y ausencia de una mezcla de aminoácidos (Val-*d8*, Leu, Ile, Met y Phe). Los sistemas modelo fueron almacenados durante 60 días a 28°C seguidos de 80 días a 38°C, evaluándose la formación de aldehídos de Strecker y la degradación de los ácidos amargos cada 20 días. Los resultados mostraron que la formación de los aldehídos de Strecker en sistemas modelo se lleva a cabo a través de dos rutas mecánicas. La primera por la degradación de los ácidos amargos y la segunda a través de la reacción entre los aminoácidos y los ácidos amargos. Se observó que las diversas especies de los ácidos amargos tienen estabilidades químicas muy diferentes, siendo las especies del extracto tetra las más estables. Esto se correlacionó con el hecho de que éste extracto generó la menor cantidad de aldehídos de Strecker durante el almacenamiento a 28 y 38°C. Este estudio propone un método para evaluar el potencial de los extractos de lúpulo para formar aldehídos de Strecker, el cual puede ser utilizado para seleccionar los extractos más estables para mejorar la estabilidad sensorial de la cerveza durante el almacenamiento en anaquel.

I. INTRODUCCIÓN

La cerveza es una bebida muy antigua caracterizada por su baja graduación alcohólica y sus propiedades refrescantes. Hasta hace menos de un siglo su producción había sido principalmente artesanal, siendo consumida localmente. Posteriormente, el desarrollo globalizado del mercado permitió llevar el producto a sitios alejados de su lugar de producción, por lo que en la actualidad, su fecha de consumo puede diferir en semanas o meses respecto a su fecha de producción. Este cambio en la distribución geográfica del producto, de local a nacional, regional e incluso global, conduce a la pérdida de la propiedad sensorial más importante de esta bebida, su sabor y aroma fresco. Durante el transporte diurno en países tropicales, la cerveza puede alcanzar temperaturas mayores a 40°C. Asimismo, el almacenamiento en las distribuidoras y sitios de expendio no se realiza a bajas temperaturas, que sería lo ideal para preservar las propiedades sensoriales de la cerveza, pues esto resulta económicamente inviable. Esto ha llevado a la industria cervecera a plantearse la necesidad de mejorar la estabilidad sensorial del producto frente a las condiciones de almacenamiento.

Durante el almacenamiento, ocurren una serie de reacciones químicas que llevan a la formación de compuestos con diferente funcionalidad, los cuales deterioran el aroma y sabor de la cerveza. Entre los compuestos químicos que se forman durante el almacenamiento de la cerveza, se ha reportado que algunos aldehídos volátiles contribuyen de forma significativa con el deterioro sensorial del producto. En particular, se ha confirmado que los aldehídos comúnmente derivados de la reacción de alfa-dicarbonilos (provenientes de azúcares reductores) y aminoácidos, los aldehídos de Strecker, contribuyen de una manera muy importante a la formación de notas indeseadas en la cerveza envejecida [1,2,3,4].

El desarrollo de estrategias tecnológicas que permitan prolongar la estabilidad del sabor de la cerveza en anaquel requiere del conocimiento de las reacciones que ocurren durante el envejecimiento y de la determinación de los compuestos que se producen durante las mismas. En el estudio de las reacciones que conducen a la generación de aldehídos son clave los iso- α -ácidos, compuestos provenientes del lúpulo los cuales aportan el amargor a la cerveza. Estos compuestos pueden degradarse a altas temperaturas para generar diversos

aldehídos [5]. Es por ello que una parte de esta investigación se centró en la obtención de metodologías confiables para la determinación de los aldehídos de Strecker y de los iso- α -ácidos en cerveza.

Por otro lado, para la elaboración de cervezas estables a la luz, se ha empleado otro tipo de iso- α -ácidos, los cuales han sido modificados químicamente mediante procesos de hidrogenación y/o reducción. Se ha dicho que estos iso- α -ácidos modificados deberían mostrar más resistencia al rompimiento o la degradación oxidativa [6], ya que presentan menos posiciones estructurales sensibles a la formación de radicales. Este hecho indica que los diversos tipos de iso- α -ácidos deben ser considerados en el estudio de las reacciones que conducen a la formación de aldehídos de Strecker.

En esta investigación se propuso estudiar por medio de técnicas cromatográficas la participación de los ácidos amargos del lúpulo en la formación de aldehídos de Strecker en cerveza, haciendo uso de sistemas modelo. Los sistemas modelo estuvieron orientados a simular lo que ocurriría en la cerveza entre los aminoácidos (precursores de los aldehídos de Strecker) y los distintos tipos de iso- α -ácidos provenientes del lúpulo.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 La matriz de la cerveza

La cerveza es una bebida que resulta de fermentar soluciones provenientes de cereales y otros granos. La mayoría de las cervezas se elaboran con cebada malteada y además se utilizan otras fuentes de carbohidratos tales como el maíz, arroz y trigo. A la cerveza se le da sabor con lúpulo, planta que se caracteriza por dotar a la cerveza de su amargor y aroma característicos.

Los cereales se mezclan con agua a altas temperaturas para activar las enzimas amilolíticas y proteolíticas que van a degradar durante la maceración las macromoléculas contenidas en el endospermo y el germen; esto es, los almidones y las proteínas. Luego de la maceración se realiza una filtración que permite remover los sólidos del mosto. El mosto resultante contiene aproximadamente 10 % de azúcares (principalmente maltosa y maltotriosa) y aminoácidos, sales, vitaminas, carbohidratos y pequeñas cantidades de péptidos y proteínas.

Después de la separación el mosto se somete a ebullición para detener la actividad enzimática y para permitir la coagulación y precipitación de las proteínas indeseables. Durante la ebullición se adiciona la cantidad precisa de lúpulo, el cual es el precursor de los componentes que generan el sabor amargo característico (iso- α -ácidos).

Luego del paso de ebullición, el mosto se enfría y se lleva a cabo la fermentación mediante la inoculación de levaduras, cuyo metabolismo aeróbico produce etanol y CO₂. Durante la fermentación las células de levadura consumen aminoácidos, glucosa, fructosa, sacarosa, maltosa y maltotriosa, y por reacciones metabólicas se producen compuestos de sabor y aroma de bajo umbral de detección, tales como alcoholes, aldehídos, dicetonas, ésteres, cetonas, mercaptanos y otros compuestos que contienen azufre [7]. Durante la etapa de maduración, en la cual la levadura se va al fondo del tanque de fermentación y se retira de éste, algunas de las reacciones químicas que llevan a la formación de aromas se completan. Posteriormente la cerveza se filtra y es embotellada.

2.2 Cambios químicos durante el almacenamiento de la cerveza

Una vez que la cerveza es embotellada, comienzan a ocurrir una serie de reacciones químicas que conducen al deterioro de las características sensoriales de esta bebida.

Aún en la actualidad no se conocen todas las reacciones que ocurren durante el almacenamiento de la cerveza, y en especial aquellas que pueden generar compuestos activos de aroma. Existen varios factores que afectan la ocurrencia de estas reacciones químicas en la cerveza, estos son: temperatura, oxígeno y pH. Se ha demostrado que concentraciones moderadas de oxígeno promueven la degradación oxidativa de muchos sustratos; sin embargo, se ha encontrado que aún en concentraciones de oxígeno muy bajas el sabor de la cerveza se deteriora [8], indicando la ocurrencia de un proceso no oxidativo de deterioro.

Se ha encontrado que durante el almacenamiento de la cerveza se incrementa la concentración de diferentes clases de compuestos volátiles: compuestos carbonílicos, acetales cíclicos, compuestos heterocíclicos, ésteres y compuestos azufrados [8]. Recientemente se demostró que un grupo particular de aldehídos derivados de la degradación de los aminoácidos, los llamados aldehídos de Strecker, se incrementan de manera significativa durante el almacenamiento de la cerveza y posiblemente son responsables del desarrollo de notas a pan, caramelo/quemado, dulce y vino/sherry en la cerveza envejecida, de allí la relevancia del estudio de las diferentes rutas químicas que contribuyen a la formación de estos aldehídos.

2.2.1 Mecanismos de formación de los aldehídos de Strecker

En la literatura se ha reportado un mecanismo principal para la formación de los aldehídos de Strecker a través de la degradación de los aminoácidos en presencia de intermediarios de la reacción de Maillard. Por otro lado, se ha encontrado que la degradación de iso- α -ácidos a altas temperaturas [5] produce una diversidad de compuestos carbonílicos, entre ellos el 2-metil-propanal, uno de los aldehídos de Strecker, sin involucrar los aminoácidos. Esta última reacción ha sido poco investigada.

La degradación de Strecker se considera una sub-reacción dentro de la compleja serie de reacciones que conforman la llamada reacción de Maillard [9]. La degradación de Strecker es parte de las reacciones de descarboxilación oxidativa de aminoácidos, la cual puede ser llevada a cabo por diversos reactantes y condiciones de reacción. En particular, se denomina degradación de Strecker cuando el agente oxidante que causa la descarboxilación del aminoácido es un α -dicarbonilo derivado de la reacción de Maillard (ver Figura 1). En esta reacción el aminoácido (1) se condensa con el α -dicarbonilo (2) para producir una imina (3), la cual se descarboxila. La descarboxilación es seguida por una hidrólisis que puede producir amoníaco libre o una amina primaria (tal como una α -aminocarbonil, (5)) y un aldehído (4). Los aminoácidos que pueden generar aldehídos de Strecker se muestran en la Tabla 1.

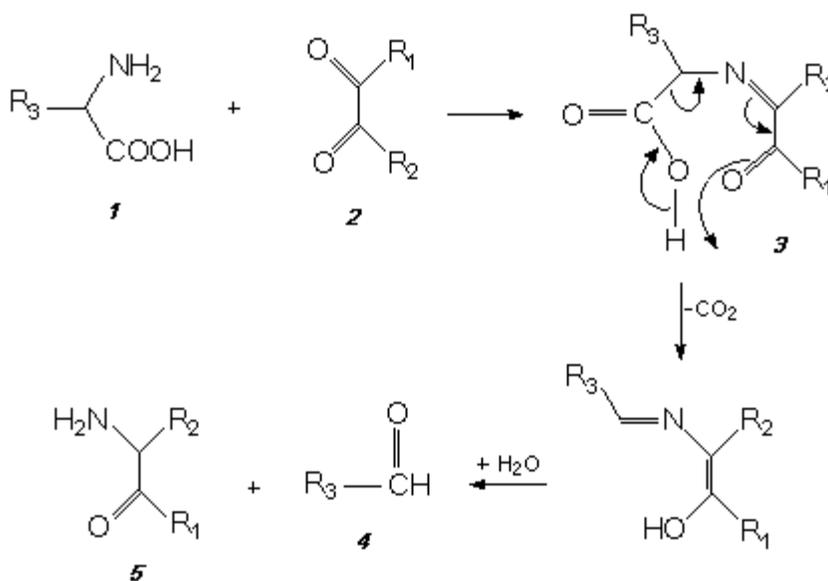


Figura 1. Degradación de Strecker de los aminoácidos

Algunos investigadores [10] han indicado que la degradación de Strecker solo sería importante cuando el contenido de aminoácidos es superior al encontrado normalmente en la cerveza (± 1 g/L). Por otro lado, otro grupo de investigadores [1] identificó en la cerveza un grupo de α -dicarbonilos derivados de la reacción de Maillard, lo que sugiere que la degradación de Strecker sí puede ocurrir durante el envejecimiento de la cerveza.

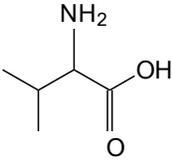
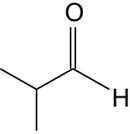
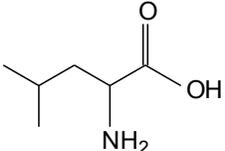
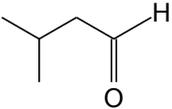
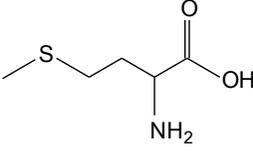
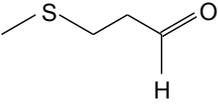
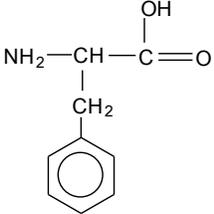
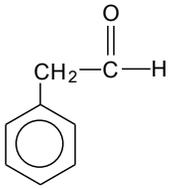
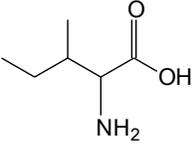
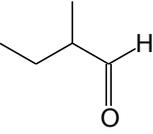
Es de especial interés hacer mención que se ha reportado que una degradación *tipo-Strecker* de aminoácidos puede tener lugar en presencia de otros substratos tales como los productos de oxidación de los ácidos grasos insaturados, 4,5-epoxi-2-alquenes [11] e hidroxialquenes [12]. En estas investigaciones han sugerido que en el mecanismo de reacción primero se forma una imina, seguida por una descarboxilación e hidrólisis que conduce a un aldehído de Strecker y una alquilpiridina. Esto nos hace pensar que pueden existir rutas no conocidas hasta el momento en las que participan los aminoácidos con otros substratos y que pueden conducir a la generación de aldehídos de Strecker.

2.2.2 Uso de sistemas modelo para estudiar posibles rutas de reacción en la cerveza

Los sistemas modelo consisten en mezclas de substratos hipotéticamente involucrados en una reacción específica dentro de una matriz particular. Estos sistemas permiten estudiar rutas químicas desconocidas, así como también la velocidad de reacción de los substratos en el caso de reacciones conocidas (estudios cinéticos). De manera particular, en el caso de la cerveza, estos sistemas han sido empleados en el estudio de los mecanismos de formación de compuestos de deterioro en la cerveza. Los estudios con sistemas modelos permitieron conocer que una gran variedad de compuestos pueden ser formados a través de la reacción de Maillard, al hacer reaccionar un tipo de azúcar simple con un aminoácido [13]. Otros autores han simulado la reacción de Maillard mezclando ácidos α -cetocarboxílicos y α -amino alcoholes [9].

Por otro lado, también se han empleado sistemas modelos para conocer la degradación de iso- α -ácidos que puede ocurrir en la cerveza, simulando la matriz de cerveza al mezclar azúcares reductores (producidos por la reacción de las enzimas amilasas sobre los almidones de la cebada malteada), iso- α -ácidos (derivados del lúpulo) y prolina (aminoácido mayoritario de la cerveza) [14]. Al sustituir los iso- α -ácidos por otras especies similares derivadas del lúpulo, tales como, rho-iso- α -ácidos o ácidos humunílicos, la cantidad de aldehídos formados fue reducida, por lo que se ha dicho que una degradación oxidativa de los iso- α -ácidos puede ocurrir durante el almacenamiento de la cerveza.

Tabla 1. Aldehídos generados en la degradación de Strecker de los aminoácidos

Aminoácido Padre	Aldehído generado
 <p>Valina</p>	 <p>Isobutanal, Isobutiraldehído ó 2-metil-propanal</p>
 <p>Leucina</p>	 <p>Isopentanal, Isovaleraldehído ó 3-metil-butanal</p>
 <p>Metionina</p>	 <p>Metional</p>
 <p>Fenilalanina</p>	 <p>Fenilacetaldehído</p>
 <p>Isoleucina</p>	 <p>2-metil butanal ó 2-metil-butiraldehído</p>

2.3 Determinación de aldehídos asociados al envejecimiento de la cerveza

El interés creciente en la determinación de aldehídos de Strecker, *E*-2-nonenal y otros aldehídos ha generado el desarrollo de diversas técnicas analíticas para medir sus concentraciones en cerveza. Los problemas asociados a la determinación de estos compuestos se deben a sus bajas concentraciones, a niveles de ppb, las interferencias causadas por la matriz y la alta reactividad de estos compuestos, en especial de aquellos insaturados [15,16]. Esto ha generado la búsqueda de metodologías sensibles, que permitan la determinación de estos compuestos con menos interferencias de la matriz, menores límites de detección y buena reproducibilidad. Se han empleado técnicas de análisis de alta sensibilidad como lo son la cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas [15-18] y por captura de electrones [16,19]. Sin embargo, la determinación adecuada también dependerá de la técnica de extracción de estos analitos de la matriz de la muestra.

Las bajas concentraciones de estos compuestos hacen que la extracción del espacio de cabeza o la extracción con solventes sean ineficientes, pues los compuestos volátiles más abundantes pueden enmascarar a los analitos de interés. Un método adecuado para disminuir la interferencia causada por volátiles mayoritarios es el empleo de la derivatización de los compuestos carbonílicos.

Los reactivos derivatizantes empleados en la determinación de aldehídos por cromatografía de gases son pentafluorofenilhidrazina (PFPH, por sus siglas en inglés, pentafluorophenylhydrazine) y O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzil)-hidroxilamina (PFBHA, por sus siglas en inglés, O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylamine). Los estudios realizados en 1979 demostraron que la concentración de PFBHA requerida para completar la derivatización en muestras acuosas es menor que las requeridas con PFPH y como consecuencia el tiempo de reacción es menor. Además, los derivados son más volátiles cuando se emplea el PFBHA [16], por lo que éste último ha sido el reactivo derivatizante más empleado en el análisis de cerveza y agua.

El PFBHA reacciona de manera selectiva con los grupos carbonílicos de aldehídos y cetonas en soluciones acuosas, por lo que la reacción puede ser ejecutada directamente en la muestra de cerveza. En dicha derivatización se forman dos oximas (*syn* y *anti*) por cada

aldehído (Figura 2). El empleo de este agente derivatizante genera derivados sensibles a los detectores de captura de electrones y espectrometría de masas, para este último en especial en el modo de ionización química negativa, ya que los derivados consisten en estructuras con 5 átomos de flúor, confiriéndole la capacidad para capturar electrones.

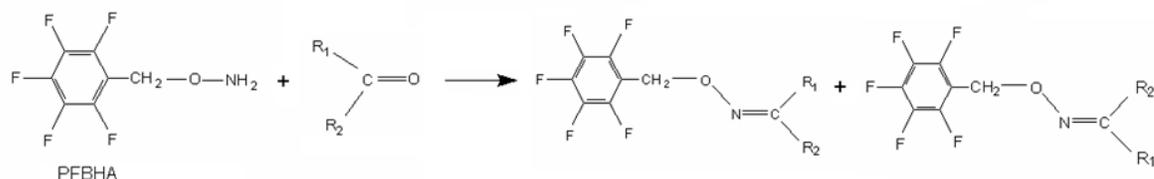


Figura 2. Oximas generadas en la derivatización con PFBHA

En los primeros estudios la derivatización con PFBHA se combinó con la extracción con solventes, sin embargo, estos métodos generan un mayor consumo de tiempo y de reactivos [16,20,21]. Es así como surge la derivatización combinada con microextracción en fase sólida (SPME, por sus siglas en inglés, *solid phase microextraction*), lo cual permitió eliminar el consumo de solventes y reducir el tiempo de extracción. En la extracción de aldehídos en cerveza surgieron dos combinaciones: 1) derivatización sobre la fibra y 2) derivatización *in situ* con posterior extracción por SPME [22]. Martos y Pawliszyn en 1998 [23] fueron los que desarrollaron la derivatización sobre la fibra. Su investigación consistió en la derivatización y extracción simultánea del formaldehído gaseoso sobre el recubrimiento de una fibra SPME. Con esta técnica eliminaron el consumo de solventes, redujeron la preparación de la muestra a un sólo paso y pudieron obtener buena sensibilidad y reproducibilidad.

En el caso de la derivatización *in situ*, el derivatizante es añadido a la muestra, ocurriendo así la derivatización en el medio acuoso y luego los derivados son extraídos por SPME. En la Tabla 2 se muestran los trabajos más representativos en el empleo de estas dos modalidades, para lo cuales fueron encontrados buenos límites de detección.

Tabla 2. Determinación de compuestos carbonílicos con diversas técnicas analíticas

Autor	Matriz	Derivatización/extracción/separación-detección	Analitos	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Cancho, B y col., 2001 [24]	agua	<i>in situ</i> /SPME/GC-ECD	2-metil-propanal, 2-metil-butanal, 3-metil-butanal, etc	0,05-0,07
Tsai S y col., 2003 [25]	agua	Sobre la fibra/GC-MS	aldehídos C1-C4	0,12-0,34
Wardencki, W y col., 2003 [19]	bebidas alcohólicas	<i>in situ</i> /HS-SPME/GC-ECD	dimetilcetona, propanal, propenal, butanal, 2-butenal y hexanal	0,05-0,5
Vesely, P y col., 2003 [15]	cerveza	Sobre la fibra/GC-MS (EI)	aldehídos de Strecker, hexanal, pentanal, furfural y (E)-2-nonenal	-
Saison D y col., 2008 [26]	cerveza	Sobre la fibra/GC-MS (EI)	Aldehídos y esteres	0,02-7

En el caso de la derivatización *in situ* [19,24] la reacción es ejecutada en un tiempo promedio de 1,5 h y luego la muestra es enfriada, se le añade H_2SO_4 para protonar el PFBHA residual y luego es realizado el muestreo por SPME en el espacio de cabeza de la muestra. Aunque este método es muy útil en especial para aquellos analitos muy polares en muestras acuosas, el tiempo total de extracción tiende a ser más largo al empleado en una derivatización sobre la fibra.

En el caso de la derivatización sobre la fibra se ha indicado que el metional es uno de los aldehídos más difícil de detectar [16], por lo que los autores optimizaron las condiciones de extracción para maximizar la respuesta de este analito. Encontraron que una temperatura de 50 °C y un tiempo de 60 minutos para la extracción de todos los analitos es adecuada. Esta aproximación no es del todo correcta ya que cada analito exhibe un comportamiento diferente durante la extracción tal como fue observado por otros autores [17,26]. Además, han sido observado problemas de co-elución y de baja sensibilidad en la determinación de metional y fenilacetaldehído [17].

En todos los trabajos en donde ha sido empleada la derivatización sobre la fibra se indica que la temperatura, tiempo y adición de sal son los factores que potencialmente afectan la extracción del analito, tal como ocurre con la extracción por SPME sin derivatización.

Algunos investigadores han realizado la derivatización de los aldehídos en cerveza a 50 °C durante 60 minutos, y han indicado que la adición de sal no tiene ningún efecto [15]. Otros investigadores han realizado la derivatización a 45 °C por 30 min, y notaron que la presencia de NaCl aumenta la eficiencia de la extracción [26]. Como se observa, no hay consenso, por lo cual estos factores deben ser estudiados para definir como afectan la respuesta de cada analito.

A continuación se detallan aspectos teóricos de la microextracción en fase sólida y de su combinación con la derivatización.

2.3.1 Fundamentos de SPME

La microextracción en fase sólida fue desarrollada en 1990 por Arthur y Pawliszyn [27] y se basa en la extracción de los analitos de la matriz de una muestra por medio de una fibra de sílice fundida recubierta de una fase polimérica sorbente, seguida de la desorción térmica de los analitos o desorción con un solvente orgánico en un cromatógrafo de gases o líquido, respectivamente. Usualmente la cantidad de fase extractante es menor de 1 µL. La fibra está instalada sobre un soporte, generando un sistema semejante a una jeringa.

De acuerdo al tipo de recubrimiento empleado pueden ocurrir diferentes mecanismos de extracción. Estos mecanismos son: absorción y adsorción. El polidimetilsiloxano (PDMS, por sus siglas en inglés, *polydimethylsiloxane*) y el poliacrilato son polímeros viscosos que extraen los analitos por absorción, disolviéndolos. El mecanismo que opera en estos casos es la partición de los analitos entre la matriz de la muestra y el recubrimiento de la fibra. Se ha indicado que estos materiales se encuentran a temperaturas por encima de su punto de transición vítrea y esto les confiere un estado similar a un líquido, por lo que su comportamiento es semejante al de los solventes orgánicos [28]. Por otro lado, existen otros tipos de recubrimientos combinados tales como PDMS-DVB (polidimetilsiloxano-divinilbenceno), Carbowax-DVB y Carboxen-PDMS, en los cuales el DVB y el carboxen, son sólidos porosos que permiten que algunos analitos sean extraídos por adsorción [28].

La cantidad de analito extraído por el recubrimiento es determinada por la magnitud del coeficiente de distribución del analito entre la matriz de la muestra y el recubrimiento

(K_{fm}). Generalmente, los analitos no son extraídos cuantitativamente de la matriz, es decir, la extracción no es exhaustiva, a menos que la constante de distribución sea muy grande. Es por ello que la SPME es un método de equilibrio y esto le confiere la posibilidad de reducir posibles interferencias de matriz, ya que existe la posibilidad de seleccionar una fase con mayor selectividad hacia el analito de interés que en una técnica de extracción exhaustiva [29].

En el modo de extracción por espacio de cabeza, los analitos son extraídos de la fase de vapor equilibrada con la muestra. En realidad, se establecen dos sistemas de equilibrio: espacio de cabeza-muestra y recubrimiento-espacio de cabeza, por lo que la distribución del analito entre la muestra y el recubrimiento son el resultado de la distribución del analito en los dos sistemas de equilibrios. Los analitos volátiles son más rápidamente extraídos que los semivolátiles. La temperatura tiene un efecto significativo sobre la cinética del proceso [29].

El modo de extracción por espacio de cabeza protege a la fibra de interferentes y de posibles agentes que deterioran la fase sorbente. Además, permite realizar modificaciones de la matriz tales como ajuste de pH y adición de aditivos.

2.3.2 Fundamentos de la derivatización sobre la fibra

En este modo la derivatización y extracción ocurre simultáneamente en el recubrimiento de una fibra. Para ello dos pasos son realizados: 1) el recubrimiento es saturado con el reactivo derivatizante por exposición de la fibra al espacio de cabeza de la solución de derivatizante, y 2) la fibra ya cargada es expuesta en el espacio de cabeza de la muestra. Para llevar a cabo este tipo de derivatización es importante que el reactivo derivatizante tenga una presión de vapor apropiada y una alta afinidad hacia el recubrimiento para que pueda permanecer sobre la fibra durante su exposición a la muestra, de esta manera los analitos son convertidos a derivados cuya afinidad por el recubrimiento es alta. Un dibujo representativo de este modo de extracción se muestra en la Figura 3.

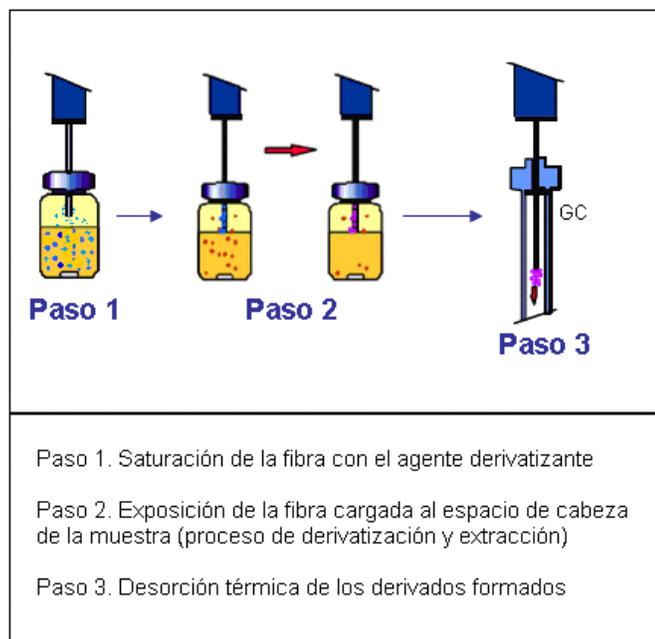
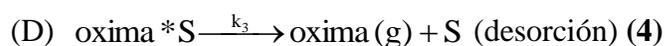
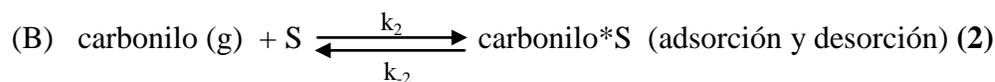


Figura 3. Pasos de la derivatización sobre la fibra

En la derivatización sobre la fibra pueden ser considerados 4 pasos (representados con las ecuaciones 1-4) para deducir la velocidad global de la formación de la oxima sobre el recubrimiento. Paso A: cargado del derivatizante (PFBHA) sobre el recubrimiento sólido (S). Martos y Pawliszyn [23] dedujeron que la velocidad de desorción es despreciable, es decir, $k_1 \gg k_{-1}$ (ecuación 1). Esto está asociado a la relativa baja presión de vapor del agente derivatizante. Paso B: contempla la posibilidad de que una molécula de carbonilo gaseoso pueda enlazarse a sitios de la superficie no ocupados. Sin embargo, dado que casi todos los sitios de adsorción están ocupados por el PFBHA, se espera que la velocidad de adsorción del carbonilo sea despreciable ($k_2 \approx 0$) (ecuación 2). Paso C: En la reacción entre el PFBHA adsorbido y el carbonilo gaseoso se asume que la parte aromática del PFBHA provee la gran afinidad del reactivo hacia el polímero, mientras que la parte de la molécula que contiene la hidroxilamina está libre para reaccionar con el compuesto carbonílico (ecuación 3). Paso D: A temperatura ambiente la oxima formada tiene una alta afinidad por el recubrimiento, por lo que la desorción de la oxima es despreciable, $k_3 \approx 0$ (ecuación 4). Por el contrario, k_3 es mucho mayor a la temperatura del inyector por lo que se desorbe la oxima.



La presencia de la oxima sobre la superficie del recubrimiento, oxima*S, ahora ocupando un sitio activo, previene la adsorción de carbonilos gaseosos y puede reducir la velocidad global aparente de la reacción. La reducción de la velocidad de la reacción ocurre debido a que el número de moléculas de PFBHA disponible se va reduciendo [23].

Debe haber un exceso de reactivo derivatizante sobre el recubrimiento para que la concentración del derivatizante permanezca relativamente constante a lo largo del proceso de extracción-derivatización, de modo que la velocidad de la reacción que ocurre en el recubrimiento sea proporcional solo a la concentración carbonilo gaseoso, es decir, la reacción se convertiría en una de pseudo primer orden [23], tal como se observa en la ecuación 5.

$$v = \frac{\partial}{\partial t} [\text{Oxima}]_f = K^* [\text{Carbonilo}]_g \quad (5)$$

El procedimiento de saturación del recubrimiento de la fibra con el agente derivatizante deberá ser optimizado, de manera de garantizar la máxima concentración de derivatizante en el mismo.

Un aumento de temperatura durante la exposición de la fibra cargada en el espacio de cabeza de la muestra puede generar un incremento de K^* , pero recíprocamente un incremento de k_3 (velocidad de la desorción de la oxima formada en el recubrimiento) y una disminución de K_A (k_1/k_{-1}) (constante de equilibrio del proceso de cargado del PFBHA sobre el recubrimiento). Esto quiere decir que puede generar la disminución de la concentración de la oxima y del PFBHA sobre el recubrimiento [23] y con ello reducir la eficiencia de la extracción. Esto sugiere que la temperatura debe ser optimizada para la

obtención de la mayor cantidad de oxima posible y a su vez evitar la pérdida de la misma o del derivatizante por desorción.

2.4 Ácidos amargos del lúpulo y sus derivados

El lúpulo es una planta cuyo nombre científico es *Humulus lupulus*. Las flores de esta planta contienen en su interior una resina llamada lupulina. La lupulina aporta los componentes amargos (α -ácidos y β -ácidos), componentes aromáticos y taninos (compuestos que contribuyen a la preservación microbiológica de la bebida). Además el lúpulo contiene aminoácidos, celulosa, clorofila, aceites esenciales, monosacáridos, ácidos grasos, pectinas, polifenoles, proteínas, sales, entre otros [30].

La forma en la que el lúpulo se utiliza en la cervecería es como extracto, siendo el más aceptado el de dióxido de carbono. Esto se debe a que este solvente permite generar un extracto que contiene casi todos los aceites esenciales y una cantidad alta de α -ácidos. El extracto de CO₂ permite la producción de una cerveza con un mejor balance de aromas de lúpulo y sabor amargo [31].

Los compuestos más relevantes del lúpulo son los α -ácidos, siendo los mayoritarios humulona, cohumulona y adhumulona (Figura 4). La importancia de estos ácidos radica en que a partir de ellos se generan durante la ebullición del mosto, los iso- α -ácidos, los cuales son más solubles que los primeros y son los responsables reales del amargor característico de la cerveza [32].

La isomerización de los α -ácidos ocurre cuando el mosto es hervido con el lúpulo, ocurriendo un rearrreglo de la estructura molecular, transformándose el anillo de seis carbonos de los α -ácidos en un anillo de cinco carbonos. Esta conversión es inducida por la temperatura y es acelerada a valores de pH superiores a 5,5 y en presencia de cationes o metales divalentes, particularmente Mg y Ca [33]. Cada α -ácido genera dos iso- α -ácidos epiméricos, los *cis* y *trans*-iso- α -ácidos (Figura 4); consecuentemente seis iso- α -ácidos estarán presentes en la cerveza [34].

Las insaturaciones de los iso- α -ácidos pueden sufrir una reacción fotolítica a través de un mecanismo de radicales libres entre el radical isoprenil proveniente de la ruptura del iso- α -ácido y el radical SH• proveniente de la degradación fotolítica de la cisteína generando el 3-metil-2-butenotiol, responsable del aroma indeseado azufrado que se genera cuando la cerveza es expuesta a la luz. Es por ello que las cervezas que contienen éstos iso- α -ácidos deben ser embotelladas en botellas color ámbar.

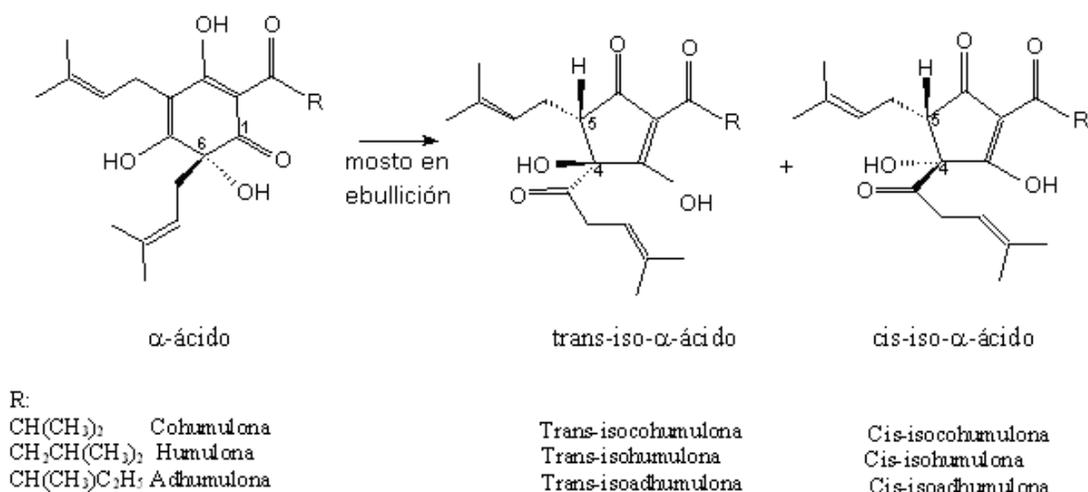


Figura 4. Isomerización de α -ácidos a iso- α -ácidos [34]

Cuando se desea elaborar una cerveza estable a la luz deben emplearse extractos en los cuales los iso- α -ácidos han sido modificados mediante reacciones de reducción e hidrogenación [34]. Dentro de estos se tienen: 1) los rho-iso- α -ácidos o dihidro-iso- α -ácidos, obtenidos por la reducción del grupo carbonilo de los iso- α -ácidos con NaBH₄, generando un centro quiral y en consecuencia dos diastereoisómeros por cada iso- α -ácido. Se ha dicho que los rho-iso- α -ácidos mejoran el sabor de la cerveza y la estabilidad de la espuma; 2) los tetrahidro-iso- α -ácidos, generados a través de la hidrogenación del doble enlace de las cadenas isoprenílicas y catalizada por un metal noble. Las especies generadas son dos veces más amargas que los iso- α -ácidos; 3) los hexahidro-iso- α -ácidos, los cuales se generan por la hidrogenación de las cadenas isoprenílicas y la reducción del grupo

carbonilo con NaBH₄. En la Figura 5 se puede apreciar un esquema de los iso- α -ácidos modificados.

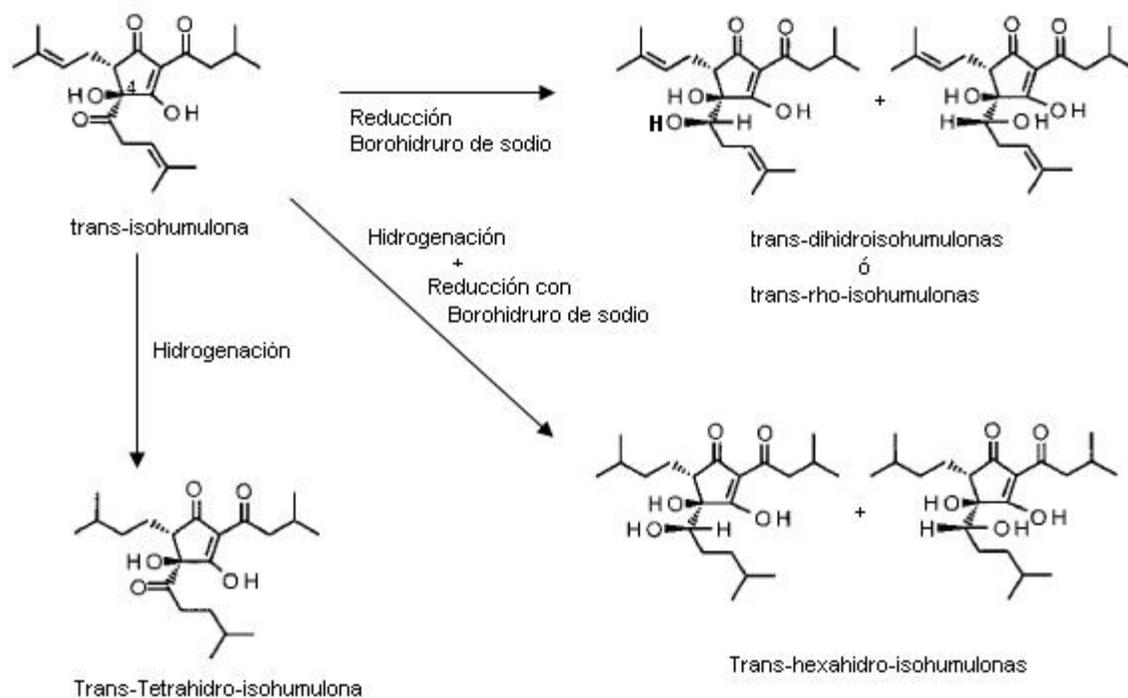


Figura 5. Producción de isohumulonas reducidas e hidrogenadas a partir de la *trans*-isohumulona [34]

2.4.1 Análisis de extractos de lúpulo

La separación de los ácidos amargos derivados del lúpulo ha sido realizada mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC, por sus siglas en inglés, *high performance liquid chromatography*) en fase reversa con formación de par iónico, lo cual indica que los iso- α -ácidos pueden ser especies fácilmente ionizables [32,35]. Han sido empleados como formadores de par iónico: fosfato de tetrabutilamonio e hidróxido de tetrabutilamonio. Sin embargo, en algunos trabajos no se emplean estos agentes y se hace énfasis en el empleo de ácidos, tales como el ácido fosfórico, el cual permite ajustar el pH del medio a la condición donde predomine la especie no ionizada [35-37].

Para llevar a cabo el análisis de la cerveza por HPLC, deben ser aislados previamente los ácidos amargos de aquellos interferentes que están presentes en la matriz. Inicialmente se

empleó la extracción líquido-líquido, trayendo como desventajas un gran consumo de solvente y mayor cantidad de tiempo. Es por ello que se ha implementado la técnica de extracción en fase sólida (SPE, por sus siglas en inglés, *solid phase extraction*) [35,38-40] y más recientemente la extracción por sorción con barras magnéticas agitadoras (SBSE, por sus siglas en inglés, *stir bar sorptive extraction*) [41,42].

Por medio de la extracción en fase sólida se concentran y purifican los analitos de una solución por sorción sobre una fase sólida, eluyendo el analito con un solvente apropiado para su posterior análisis. Esta técnica permite un menor tiempo de preparación de la muestra, ahorro de reactivos y es más selectivo que la técnica de extracción líquido-líquido. Se han empleado fases sólidas hidrofóbicas sílica-C8 y sílica-C18 para la separación de α -ácidos, β -ácidos e iso- α -ácidos en muestras de lúpulo, mosto y cerveza [35,36,40,43]. Se ha observado buena repetibilidad [40,43]. La Tabla 3 resume los trabajos realizados en la determinación de iso- α -ácidos modificados y sin modificar en diferentes matrices.

A pesar de las ventajas que ofrece la técnica de SPE, han surgido técnicas de preconcentración donde la manipulación de la muestra y el consumo de solventes son aún menores, los cuales igualmente exhiben buena reproducibilidad. Estas técnicas son la microextracción en fase sólida (SPME) y la extracción por sorción con barras agitadoras (SBSE). Ésta última fue desarrollada por Baltussen y col. [44] y consiste en el empleo de una barra agitadora recubierta con polidimetilsiloxano (PDMS), la cual puede contener de 24 a 300 μL de PDMS, es decir, un volumen 800 veces mayor al encontrado en una fibra de PDMS (0,35 μL). Consecuentemente la sensibilidad con SBSE es aumentada por un factor de 100 a 1000. Los analitos son extraídos introduciendo la barra recubierta (Figura 6) directamente en la muestra, la cual es agitada por algunos minutos. La técnica de SBSE requiere poco tiempo y muchas muestras pueden ser extraídas simultáneamente [44]. Además, muchos compuestos podrían ser extraídos de manera exhaustiva de una solución acuosa. El tiempo de extracción es un parámetro que deberá ser optimizado y dependerá de la velocidad de agitación y de las dimensiones de la barra [45].

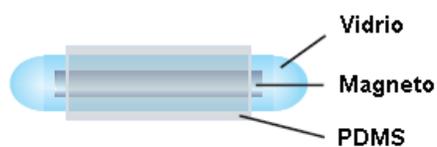


Figura 6. Barra magnética recubierta de polidimetilsiloxano

Una vez que los analitos son extraídos, pueden desorberse térmicamente (en el sistema de inyección de un cromatógrafo de gases) o mediante un solvente orgánico (desorción líquida). En el aislamiento de iso- α -ácidos de la cerveza se ha realizado la desorción con solventes de los analitos de la barra y posteriormente se ha utilizado la cromatografía capilar electrocinética micelar [41] y la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) [42]. En ambos casos se observaron cromatogramas muy puros, con buenas formas de pico, aunque con una resolución baja para algunas especies ($R_s=1$).

Tabla 3. Determinación de ácidos amargos de la cerveza por HPLC/DAD

Autores	Técnica de extracción	Columna empleada	Analito (s)/muestra	Fase móvil	Parámetros de calidad
Jacobsen, T y col., 1989 [36]	SPE, cartucho C18	RoSil C18 (25 x 0,46 cm, 5 µm)	Iso-α-ácidos y α-ácidos/mosto y cerveza	Elución por gradiente con A y B A: CH ₃ OH:H ₂ O:H ₃ PO ₄ (72,5:30:0,25) B: CH ₃ OH:H ₃ PO ₄ (100:0,25)	-
Donley, J y col., 1992 [35]	SPE, cartucho C8	Shimpack C18(25x 0,46 cm, 5 µm)	α-ácidos, β-ácidos e iso-α-ácidos/mosto y cerveza	elución por gradiente con A y B A: CH ₃ OH:H ₂ O (75:25), Fosfato de tetrabutilamonio, H ₃ PO ₄ (85%) B: CH ₃ OH	-
Clark, J y col., 1998 [40]	SPE, cartucho C8	Zorbax XDB-C8 (25x 0,46 cm,5µm)	iso-α ácidos y tetrahydro-iso-α ácidos/cerveza	elución por gradiente A: CH ₃ OH, B: H ₂ O C: CH ₃ CN D: CH ₃ CN en 1 % de ac cítrico ajustado a pH:7 con KOH	CV = 0,64 %
Harms, D y col., 2001 [43]	SPE, cartucho C8	Nucleosil 100-5, C18	Iso-α ácidos, isoxantohumul /cerveza	Elución isocrática CH ₃ CN:CH ₃ OH: ácido cítrico (17:21:62)	CV = 1,8 - 4,1 %
			Tetrahydroiso-α ácidos y Rho-iso-α-ácidos/cerveza	Elución por gradiente con: A: CH ₃ CN: CH ₃ OH: ácido cítrico (17:25:57) B: CH ₃ CN: ácido cítrico (55:45)	
Harms, D y col., 2001 [42]	SBSE	Nucleosil 100-5, C18	Iso-α-ácidos/ cerveza	Elución por gradiente con: A: CH ₃ CN: CH ₃ OH: ácido cítrico (17:25:57) B: CH ₃ CN: ácido cítrico (55:45)	-
Khatib, A y col., 2006 [37]	Extracción líquida con cloroformo	Hypersil C18 (25x0,46cm,5 µm)	Iso-α ácidos/cerveza	elución isocrática CH ₃ CN:H ₂ O:H ₃ PO ₄ (50:50:0,01)	LOD = 53-95 ng

III. JUSTIFICACIÓN

A pesar de las numerosas investigaciones que se han realizado para mejorar la estabilidad del sabor de la cerveza en anaquel, aún hoy se desconocen muchas de las reacciones que podrían estar involucradas en el deterioro sensorial del producto durante su almacenamiento.

Se ha reportado que el incremento en la concentración de los aldehídos de Strecker está correlacionado con el deterioro del sabor y aroma de la cerveza durante el almacenamiento [1]. El mecanismo aceptado en la literatura para la formación de estos aldehídos es a través de la degradación de Strecker, la cual involucra la descarboxilación y desaminación de aminoácidos en presencia de los alfa-dicarbonilos derivados de azúcares reductores. Sin embargo, recientemente se ha reportado que la degradación de aminoácidos en presencia de otros sustratos como los productos de oxidación de los ácidos grasos insaturados, puede dar lugar a la formación de aldehídos de Strecker, por reacciones muy similares a la degradación de Strecker clásica [11,12].

En el caso de la cerveza, se ha reportado que los iso- α -ácidos del lúpulo (compuestos que aportan el amargor en la cerveza), pueden generar una diversidad de aldehídos cuando son almacenados a altas temperaturas, entre ellos el 2-metil-propanal, uno de los aldehídos de Strecker [5]. Esta observación y la evidencia de la participación de diversos sustratos en la formación de los aldehídos de Strecker en sistemas de alimentos, sugieren la importancia de estudiar la participación de los ácidos amargos y los aminoácidos en la formación de los aldehídos de Strecker en la cerveza, reacción que no ha sido estudiada hasta el presente.

Los iso- α -ácidos son compuestos inestables químicamente y sufren diferentes reacciones de degradación durante el envejecimiento de la cerveza [6]. Por esta razón se han desarrollado extractos comerciales que involucran la reducción de sus grupos carbonilos y/o hidrogenación de algunas de sus insaturaciones para hacerlos más estables a la luz. No se conoce si estas formas modificadas de iso- α -ácidos pueden generar 2-metil-propanal. En consecuencia, debe ser investigado el efecto de las diferentes formas disponibles comercialmente de lúpulo, es decir, extractos de iso- α -ácidos y extractos modificados:

tetrahidro-iso- α -ácidos (hidrogenado), rho-iso- α -ácidos (reducido) y hexahidro-iso- α -ácidos (hidrogenado y reducido) en la formación de los aldehídos de Strecker.

Para conocer la participación de las diferentes formas de lúpulo en la generación de los aldehídos de Strecker, se planteó el seguimiento en el tiempo de la concentración de estos aldehídos en diversos sistemas modelo de aminoácidos con distintos tipos de iso- α -ácidos, y en cervezas comerciales con dos tipos de extractos de lúpulo. La ventaja de la utilización de sistemas modelo es que permiten simular una reacción específica que pudiese estar ocurriendo en el sistema real (cerveza), al hacer reaccionar los substratos hipotéticamente involucrados. En el presente estudio los substratos putativos son iso- α -ácidos y aminoácidos. Adicionalmente, se planteó el seguimiento de la estabilidad de los iso- α -ácidos modificados y sin modificar en los sistemas modelos en función del tiempo, con la finalidad de correlacionar la estabilidad química de estos extractos con la generación de los aldehídos de Strecker. De aquí que se planteó el desarrollo de dos metodologías, la determinación de aldehídos en cerveza por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS, por sus siglas en inglés, *gas chromatography-mass spectrometry*) y la separación de los diversos iso- α -ácidos del lúpulo por HPLC.

En cuanto a la determinación de los aldehídos de Strecker, se propuso el empleo de la derivatización sobre la fibra como técnica de extracción. En la literatura se ha usado esta técnica en combinación con GC-MS empleando ionización por impacto de electrones (EI, por sus siglas en inglés, *electron impact*), para la determinación de aldehídos en agua y en cerveza. A pesar de que muchos de los resultados han sido satisfactorios, analitos como metional y fenilacetaldehído presentan los mayores límites de detección, los cuales no permiten su cuantificación en cervezas frescas y/o con pocos días de almacenamiento. Además, no se ha profundizado en el estudio de los factores involucrados en el proceso de derivatización sobre la fibra. Por lo tanto, se propuso estudiar los factores involucrados en este tipo de derivatización mediante el uso de diseños factoriales. La derivatización fue combinada con GC-MS y se emplearon dos modos de ionización: impacto de electrones (EI) e ionización química negativa (NCI, por sus siglas en inglés, *negative chemical ionization*), siendo la última una fuente con la que podría alcanzarse una mayor sensibilidad en la cuantificación de los analitos.

En cuanto a la separación de los distintos tipos de ácidos amargos, la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) permite la separación de estas especies empleando formadores de par iónico o ajustando el pH a condiciones apropiadas para su separación. Adicionalmente, en muestras de cerveza es necesario aislar los iso- α -ácidos, previo a la separación cromatográfica. Una técnica de extracción sencilla y novedosa para el aislamiento de compuestos hidrofóbicos o de mediana hidrofobicidad de matrices acuosas lo ha constituido la extracción por sorción con barras magnéticas agitadoras (SBSE), por lo que se plantea el uso de la misma en la extracción de los iso- α -ácidos en cerveza.

El estudio de la participación de los ácidos amargos de extractos de lúpulos comerciales en la formación de aldehídos de Strecker va a permitir el proponer recomendaciones al proceso cervecero que lleven a mejorar la estabilidad de la cerveza en anaquel. El seguimiento analítico de la formación de aldehídos de Strecker en los diferentes sistemas modelo de los lúpulos comerciales en presencia de aminoácidos, puede permitir el desarrollo de un indicador del potencial que tiene cada extracto de lúpulo de formar aldehídos de Strecker bajo ciertas condiciones de almacenamiento, lo que a su vez se correlaciona con el deterioro sensorial de la cerveza. De esta forma, este estudio podría generar una metodología para el cálculo de un indicador del potencial de envejecimiento de los extractos de lúpulo, el cual pudiese ser utilizado a la hora de evaluar los diferentes extractos comerciales para su uso en la producción de cerveza.

IV. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Estudiar, por medio de técnicas cromatográficas, la participación de ácidos amargos del lúpulo en la formación de aldehídos de Strecker en cerveza.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Optimizar la metodología para la determinación de los aldehídos de Strecker, furfural y E-2-nonenal por GC-MS aplicando derivatización y microextracción en fase sólida (SPME) y empleando dos modos de ionización: impacto de electrones (EI) e ionización química negativa (NCI).
2. Optimizar la separación cromatográfica de iso- α -ácidos, rho-iso- α -ácidos, tetrahidro-iso- α -ácidos y hexahidro-iso- α -ácidos en diferentes extractos de lúpulo mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) y su extracción en cerveza mediante sorción con barras magnéticas agitadoras (SBSE).
3. Estudiar la formación de los aldehídos de Strecker y la degradación de ácidos amargos en sistemas modelo y cervezas almacenadas a lo largo del tiempo, a temperatura ambiente y temperatura máxima de almacenamiento en anaquel.
4. Evaluar el efecto de los distintos tipos de iso- α -ácidos en presencia de aminoácidos en la generación de los aldehídos de Strecker y determinar la importancia de esta ruta en el envejecimiento de la cerveza.
5. Generar una recomendación sobre el uso de extractos de lúpulo basada en la menor formación de los aldehídos de Strecker y la mayor estabilidad de los ácidos amargos del lúpulo.

V. PARTE EXPERIMENTAL

5.1 Optimización de una metodología para la determinación de aldehídos de Strecker, furfural y (E)-2-nonenal mediante derivatización sobre la fibra y GC/MS

5.1.1 Instrumentación

Se utilizó un cromatógrafo de gases Agilent Technologies modelo 7890, acoplado a un espectrómetro de masas Agilent Technologies 5975C con opción a impacto electrónico e ionización química. Se utilizó una columna capilar HP-5FMS (5% fenil-metil siloxano) de 30m x 0,25mm d.i., 0,25 μm , Agilent Technologies. La desorción fue realizada en un inyector split/splitless (modo con división/sin división de flujo) en el modo splitless (230 °C, 2,5 min). El horno fue programado a una temperatura inicial (40 °C) seguida por una rampa (6 °C/min hasta 230 °C). El He fue empleado como gas portador y se mantuvo un flujo constante (1,3 mL min⁻¹). La línea de transferencia se mantuvo a 280 °C, y se emplearon dos modos de ionización: impacto de electrones e ionización química negativa. En el modo de EI (70 eV) las temperaturas de la fuente y del cuadrupolo fueron de 230 y 150 °C, respectivamente. El cuadrupolo fue fijado en el modo scan (escaneo completo en un rango de masas) en el rango de 170 a 350 uma. En el modo SIM (monitoreo selectivo de iones) los iones monitorizados fueron: 181, 195, 239, 248, 250, 252, 264, 277, 279, 291, 297, 299, 307, 315 uma.

Para la ejecución de la ionización química negativa (NCI), fue realizado el cambio de fuente de ionización. Se encendió el equipo y se permitió que el sistema se acondicionara térmicamente y se purgara durante 2 horas. Se empleó He como gas portador (1,3 mL min⁻¹) y como gas reactivo, metano. El ajuste final del flujo del gas reactivo fue de 2 mL min⁻¹. Tanto la temperatura de la fuente como la del cuadrupolo fueron de 150 °C. Se realizaron las pruebas de sensibilidad pertinentes a este modo de ionización empleando un estándar de octafluoronaftaleno (Agilent). Se empleó el modo scan (176-320 uma) y el modo SIM (iones monitorizados: 229, 240,9, 247, 257, 259, 261, 267, 267,9, 270,9, 279, 287, 294,5, 315 uma). El modo SIM fue empleado para la cuantificación de los aldehídos.

5.1.2 Reactivos

Los estándares empleados para la determinación de los aldehídos fueron: 2-metil-propanal $\geq 97,7\%$ y fenilacetaldehído $98,7\%$ (Chem Service); 3-metil-butanal 97% , 2-metil-butanal 95% , furfural 99% , metional y (E)-2-nonenal 97% (Sigma-Aldrich). Los estándares internos empleados fueron: 3-metil-2-butenal 97% (Aldrich) y benzaldehído *d-6* ($98\%, +0,1\%$ hidroquinona) de Cambridge Isotope Laboratories. Se empleó etanol $99,9\%$ pro analysis (Merck) para la preparación de soluciones de aldehídos. Además, se empleó H_3PO_4 85% w/w (Mallinckrodt Baker) para la preparación de H_3PO_4 $0,1\%$, usado para ajustar el pH de las soluciones patrones. Se empleó NaCl $99,5\%$ pro analysis (Merck).

El agente derivatizante utilizado fue O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzil)hidroxilamina $98,5\%$ (Chem Service). Para la preparación de soluciones del derivatizante fue empleada agua Milli-Q (Millipore purification system).

5.1.3 Preparación de soluciones de aldehídos

Las soluciones madre de aldehídos (1000 mg/L) fueron preparadas en etanol $99,9\%$ y almacenadas en un congelador ($-20 \text{ }^\circ\text{C}$). Las soluciones de trabajo fueron preparadas semanalmente a partir de las soluciones madre empleando una solución etanólica (5%). Las soluciones empleadas para experimentos de optimización y calibración fueron preparadas a partir de las soluciones de trabajo y fueron ajustadas a pH $4,5$ con H_3PO_4 ($0,1\%$).

5.1.4 Muestras de cerveza

Se emplearon cervezas comerciales tipo Pilsen con lúpulo estable a la luz.

5.1.5 Metodología

Procedimiento de la derivatización sobre la fibra. La derivatización y extracción simultánea sobre el recubrimiento de una fibra SPME, se llevó a cabo mediante los dos pasos siguientes: 1) saturación del recubrimiento con el reactivo derivatizante (PFBHA) empleando el modo de espacio de cabeza y 2) exposición del recubrimiento saturado en el espacio de cabeza de la muestra. Para la derivatización/extracción se empleó una fibra recubierta (polidimetilsiloxano/divinilbenceno PDMS/DVB, $65 \mu\text{m}$, Supelco), previamente

acondicionada en el inyector del GC (cromatógrafo de gases, por sus siglas en inglés, *gas chromatograph*) (250 °C, 30 min). Antes de cada análisis la fibra se limpió en el inyector del GC (230 °C, 2,5 min).

Estudio de los factores involucrados en el proceso de cargado del recubrimiento con PFBHA. Se determinó la concentración de reactivo derivatizante apropiada para este proceso. Se emplearon diversas soluciones de PFBHA (0,06-8 g/L). Este procedimiento consistió en colocar la solución de PFBHA (10 mL) con una barra magnética en un vial de vidrio (20 mL). Cada vial fue sellado con un septum de silicona/teflón y colocado sobre un baño de agua en una plancha de agitación/calentamiento (240 rpm, 40 °C). La fibra fue expuesta al espacio de cabeza de cada solución (5 min) y luego al puerto de inyección del GC para la desorción térmica del derivatizante sorbido. Para determinar la cantidad de derivatizante apropiada fue obtenida la respuesta (área de PFBHA) para cada solución y fue graficada en función de la concentración del derivatizante. Posteriormente fue estudiado el efecto de la temperatura y el tiempo sobre el cargado del derivatizante mediante un diseño factorial 2^2 , empleando la concentración de PFBHA seleccionada. En la Tabla 4 se observa la matriz del diseño junto con los niveles elegidos para cada factor. Los niveles fueron seleccionados de acuerdo a métodos reportados similares [15,26].

Para conocer el efecto de los factores sobre la variable de respuesta fue aplicado el análisis de varianza y los supuestos del modelo fueron comprobados. Se empleó la prueba de Anderson-Darling y el gráfico de probabilidad normal de los residuos para confirmar la normalidad de los errores. La prueba de Bartlett fue aplicada para confirmar la homogeneidad de las varianzas y el gráfico de residuales vs el orden de la corrida permitió confirmar la independencia de los residuos. El paquete estadístico empleado fue Minitab 15 (statistical software english).

Tabla 4. Matriz del diseño factorial 2²

Corrida	Temperatura	Tiempo
1	-1	1
2	1	-1
3	-1	-1
4	-1	1
5	1	1
6	1	1
7	1	-1
8	-1	-1
-1	30 °C	5 min
1	40 °C	10 min

Matriz generada con el software Minitab, 2 réplicas

Estudio del efecto de los factores involucrados en el proceso de derivatización/extracción. Los factores que se consideraron importantes en dicho proceso fueron: la temperatura, el tiempo y la adición de NaCl. Para estudiar la influencia de estos factores y sus posibles interacciones se eligió un diseño factorial 2³, tipo bloques al azar. El número de repeticiones fueron 3. En la Tabla 5 se observa la matriz de este diseño y los niveles seleccionados para cada factor. Los niveles elegidos para cada factor estuvieron basados en las condiciones comúnmente empleadas en la determinación de aldehídos en cerveza y agua [15,26]. Se mantuvieron fijos el tiempo de equilibrio (tiempo empleado para permitir el equilibrio de los aldehídos entre la fase líquida y el espacio de cabeza) y la velocidad de agitación.

Las variables de respuesta fueron las áreas de los aldehídos derivatizados (*syn* y *anti*). El diseño experimental fue aplicado a dos matrices: solución estándar de aldehídos (etanol 5%) y cerveza. El número de repeticiones (r) consideradas fueron 3 y fue calculada de acuerdo a la ecuación: $(T-1)(r-1) \geq 12$, donde T es el número de los tratamientos (2³). Dado que el diseño con sus repeticiones no podía ser ejecutado en un mismo día, las repeticiones fueron establecidas como bloques del experimento corridos en días distintos. Esto permitió eliminar el día como fuente de variabilidad. Para conocer el efecto de los factores sobre la variable de respuesta fue aplicado el análisis de varianza y los supuestos del modelo fueron comprobados mediante las pruebas especificadas en la sección anterior.

Tabla 5. Matriz del diseño factorial 2³

Tratamiento	Bloques	Temperatura	Tiempo	NaCl
1	1	-1	-1	-1
2	1	1	-1	1
3	1	1	1	-1
4	1	1	1	1
5	1	-1	-1	1
6	1	-1	1	-1
7	1	-1	1	1
8	1	1	-1	-1
9	2	1	1	1
10	2	1	1	-1
11	2	1	-1	-1
12	2	-1	1	-1
13	2	1	-1	1
14	2	-1	-1	1
15	2	-1	1	1
16	2	-1	-1	-1
17	3	1	-1	1
18	3	-1	-1	-1
19	3	1	1	1
20	3	-1	-1	1
21	3	1	1	-1
22	3	-1	1	-1
23	3	-1	1	1
24	3	1	-1	-1
-1		30 °C	10 min	0
1		50 °C	30 min	2,6 M

Matriz generada con el software estadístico Minitab

Para la ejecución del diseño, la solución estándar (20 mL) de aldehídos (15 ppb de 2-metilpropanal, 2-metilbutanal y 3-metilbutanal; 50 ppb de furfural; 0,1 ppb de (E)-2-nonenal; 20 ppb de metional y fenilacetaldehído en etanol 5%) y/o las muestras de cerveza y el estándar interno (3-metil-2-butenal, 30 ppb) fueron colocadas en un vial ámbar de vidrio (40 mL) con una barra magnética (1 pulgada), sellados con septum de teflón/silicona y colocados en un baño de agua sobre una plancha de agitación/calentamiento (240 rpm). Cada muestra fue mantenida en el baño de calentamiento por un tiempo fijo (20 min) antes de la derivatización/extracción. Luego cada muestra fue extraída de acuerdo a los tratamientos especificados en la matriz del diseño e inyectada al GC para la desorción térmica de los derivados.

Perfiles de tiempo de extracción. Estos perfiles fueron estudiados para cada analito tanto en solución estándar de aldehídos como en cerveza, variando el tiempo de extracción (2-50 min) y empleando la temperatura y cantidad de sal seleccionada a través del diseño experimental. Las concentraciones de aldehídos en la solución estándar fueron las mismas mencionadas en la sección anterior. Cada muestra fue equilibrada (20 min) a la temperatura de estudio y extraída a los diferentes tiempos.

Validación del método. Los parámetros de calidad del método: linealidad, límites de detección, límites de cuantificación, repetibilidad, porcentaje de recuperación, fueron determinados para cada analito, tanto por impacto de electrones como por ionización química negativa. Los rangos dinámicos lineales fueron determinados por estandarización externa e interna. Para ello se prepararon viales conteniendo concentraciones diversas de cada aldehído y una concentración fija del estándar interno. Para el estudio por impacto de electrones fueron empleados (3-metil-2-butenal, 30 ppb y benzaldehído *d-6*, 3 ppb) y para ionización química negativa (3-metil-2-butenal, 30 ppb y benzaldehído *d-6*, 1 ppb). Cada solución fue ajustada a pH 4,5 con H₃PO₄ (0,1 % v/v) y preparada en etanol 5 %. Cada solución fue sometida a las condiciones elegidas tanto en el proceso de cargado como el de derivatización/extracción.

Los límites de detección fueron determinados mediante el método de la IUPAC [46], donde la señal analítica más pequeña, y_L , viene dada por la ecuación: $y_L = y_b + k s_b$. En esta ecuación, y_b es el promedio de las medidas del blanco, s_b es su desviación estándar y k es un factor numérico elegido de acuerdo al nivel de confianza deseado. En este caso, $k=3$, correspondiente a un 95% de confianza. Para la estimación del límite de detección, fueron realizadas 10 medidas del blanco (solución etanólica 5%, ajustada a pH 4,5 y adición de estándares internos). El límite de cuantificación fue calculado como 3 veces el límite de detección. Se realizó además un estudio de repetibilidad usando soluciones estándares de cada analito a dos niveles de concentración con 5 réplicas.

Para validar la metodología propuesta se realizaron ensayos de recuperación, en donde la muestra de cerveza fue enriquecida con concentraciones conocidas del estándar. Este ensayo se realizó a dos niveles de concentración.

5.2 Optimización de la separación cromatográfica de iso- α -ácidos, tetrahidro-iso- α -ácidos, rho-iso- α -ácidos y hexahidro-iso- α -ácidos en diferentes tipos de lúpulo y cerveza por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

5.2.1 Instrumentación

Para ejecutar la determinación de ácidos amargos del lúpulo se empleó un cromatógrafo Waters Alliance, modelo 2695, acoplado a un detector de arreglo de fotodiodos Waters 2996. La separación de los distintos ácidos amargos fue realizada por HPLC en fase reversa empleando una columna C18 (Atlantis dC18 150 x 4,6 mm, 5 μ m). El flujo de la fase móvil a través de la columna fue de 1,2 mL min⁻¹ y la temperatura de la columna fue de 35 °C. El intervalo de longitud de onda utilizado fue 210-400 nm. La longitud de onda de detección utilizada para los diversos iso- α -ácidos fue 270 nm.

5.2.2 Reactivos y materiales empleados

Los solventes empleados para la separación cromatográfica por HPLC fueron acetonitrilo (CH₃CN) y metanol (CH₃OH), grado HPLC (Sigma-Aldrich). Además se empleó H₃PO₄ 85% w/w (Mallinckrodt Baker) para ajustar el pH necesario de las fases móviles. El agua empleada como fase móvil fue agua Milli-Q (Millipore purification system).

Se utilizaron como estándares para la identificación de los distintos iso- α -ácidos las sales de dicitclohexilamina (DCHA-Iso, ICS-I2; DCHA-Hexa, ICS-H1 y DCHA-Rho, ICS-R1) y Tetra-ICS-T2, todos de la ASBC (American Society of Brewing Chemist).

Los extractos de lúpulos empleados fueron los siguientes: extracto isomerizado 30% m/v (Hopsteiner), lúpulo tetra 10,225% m/v, lúpulo rho 30,1% m/v y lúpulo hexa 14% m/v (Kalsec).

Para la extracción de los ácidos amargos en cerveza se emplearon barras magnéticas o Twister con espesor de película 0,5 mm (equivalente a 24 μ L de PDMS) y longitud 10 mm (GERSTEL).

5.2.3 Metodología

Identificación. La identificación de cada tipo de iso- α -ácido en los diversos extractos de lúpulo fue realizada mediante los estándares disponibles empleando como punto de partida las especificaciones del método EBC 7.9 (método estándar de análisis de la convención europea de la industria cervecera). Basado en éste método se emplearon las condiciones especificadas en la Tabla 6. Estas condiciones se emplearon únicamente como punto de partida para la identificación de los distintos iso- α -ácidos.

Tabla 6. Método recomendado y aplicado para la identificación de cada tipo de iso- α -ácido

Parámetro	Método recomendado (EBC 7.9)	Método aplicado
Fase móvil	75 % MeOH /24 % H ₂ O/ 1 % H ₃ PO ₄	75 % MeOH /24 % H ₂ O/ 1 % H ₃ PO ₄
Columna	Nucleosil C18 250 mm x 4,6 mm x 5 μ m	Atlantis dC18 150 mm x 4,6x 5 μ m
Temperatura (°C)	35 ó 40	35
Longitud de onda (nm)	270	210-400
Flujo (mL.min ⁻¹)	1-1,4	1,2

Optimización de la separación cromatográfica. Se optimizó la separación considerando los parámetros que permiten mejorar la resolución cromatográfica: factor de capacidad, selectividad y eficiencia. En la separación inicial de iso- α -ácidos y tetrahydro-iso- α -ácidos se probó con varias columnas: Xterra RP18 150 mm x 3,9 mm x 5 μ m, Symmetry C18 150 mm x 3,9 mm x 5 μ m y Atlantis dC18 150 mm x 4,6 mm x 5 μ m. Se eligió la columna que permitió picos más simétricos y sin colas. La columna elegida fue usada para todas las separaciones cromatográficas. La temperatura de la columna y el flujo de la fase móvil fueron seleccionados de acuerdo a las condiciones del método EBC 7.9. El porcentaje de H₃PO₄ fue optimizado para la separación de cada tipo de iso- α -ácido.

Extracción de ácidos amargos en cerveza por SBSE. La extracción de los iso- α -ácidos se optimizó empleando una cerveza que contenía este tipo de especies (cerveza A), tomando como punto de partida la literatura consultada [42], la cual recomienda colocar 500 μ L de cerveza diluida con 500 μ L de agua desionizada y 50 μ L de H₃PO₄ (85% w/w) en contacto con una barra magnética o twister. Se agita por 15 minutos y luego se retira con una pinza. La barra debe ser lavada brevemente con agua para remover ciertas proteínas u

otros componentes de la muestra. Luego la barra es secada con un papel libre de pelusas y se desorben los analitos con una mezcla $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (50:50, v/v).

Considerando las indicaciones anteriores se realizaron pruebas preliminares para conocer el volumen apropiado de cerveza y el efecto del ácido fosfórico sobre la extracción de los iso- α -ácidos. En este experimento el volumen de cerveza fue variado entre 1 y 20 mL y el tiempo de extracción fue aumentado. Fue estudiado el efecto del tiempo y de la velocidad de agitación en la extracción de los iso- α -ácidos variando el tiempo (5,15 y 30 min) a dos velocidades de agitación (500 y 1000 rpm). La desorción fue realizada manteniendo la barra en contacto con la mezcla $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (50:50, v/v) por un tiempo de 15 min y agitando a una velocidad de 500 rpm. Fueron inyectados 20 μL del eluato al sistema cromatográfico. La eficacia de la desorción fue comprobada mediante la desorción sucesiva con la misma barra. Las barras fueron lavadas (según especificaciones del fabricante) con una mezcla $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ y se mantuvieron en esta mezcla hasta el día siguiente, luego se colocaron en $\text{CH}_3\text{CN}/\text{CH}_3\text{OH}$ por 1 hora. Por último se sacaron las barras, se dejaron secar por 2 horas y se guardaron en recipientes debidamente tapados.

Las condiciones elegidas fueron aplicadas a la extracción de tetrahidro-iso- α -ácidos en una cerveza que contenía este tipo de lúpulo (cerveza B). En este tipo de cerveza también se estudió el efecto del tiempo y la velocidad de agitación en la extracción de los tetrahidro-iso- α -ácidos.

5.3 Seguimiento de la formación de aldehídos de Strecker y de la degradación de ácidos amargos en sistemas modelos y cervezas

5.3.1 Reactivos empleados

Los aminoácidos empleados fueron DL-leucina ≥ 99 %, DL-isoleucina 98 %, DL-metionina 99 % y DL-fenilalanina 98 % (Sigma). El aminoácido deuterado empleado fue DL-valina-2,3,4,4,4,5,5,5-*d*-8 98 atom % D (Aldrich). Fue utilizado HCl fumante pro análisis (Merck) en la preparación de las soluciones de aminoácidos.

Se empleó acetato de potasio extra puro 99-100,5 % (Merck) y ácido acético 99,8 % (Riedel-de Haën) para la elaboración del búfer acetato de potasio 0,02 M /ácido acético.

Para la preparación de las diferentes soluciones fue empleada agua Milli-Q (Millipore purification system).

Los extractos de lúpulos utilizados fueron: extracto isomerizado 30 % m/v (Hopsteiner), lúpulo tetra 10,225 % m/v, lúpulo rho 30,1 % m/v y lúpulo hexa 14 % m/v (Kalsec).

5.3.2 Preparación de soluciones

Soluciones de aminoácidos 4 mM en 0,01 M HCl. Cada solución fue preparada por pesada del respectivo aminoácido (entre 0,1000 - 0,1400 g). Luego fueron transferidos cuantitativamente con agua, fueron añadidos 2480 μ L HCl (1,206 M) y aforado con agua hasta 200 mL.

Búfer (Acetato de potasio 0,02 M/ácido acético, pH: 4,5). Fueron pesados $3,9260 \pm 0,0001$ g de acetato de potasio, transferidos cuantitativamente a un balón de 2 L, luego fueron incorporados 4 mL de ácido acético concentrado y fue aforado con agua hasta el volumen final (2 L).

Solución etanólica buferada (etanol 5%, pH: 4,5). 100 mL de etanol 99,9 % fueron aforados hasta 2 L con solución búfer.

Solución de Iso- α -ácidos 47,4 ppm. Primero fue preparada una solución más concentrada de iso- α -ácidos (948 ppm); para ello se emplearon 632 μ L del extracto isomerizado (30 % m/v) y se aforaron con etanol 99,9 % (200 mL). La solución de 47,4 ppm fue preparada empleando 100 mL de la solución 948 ppm y aforando con solución búfer (2 L).

Solución de Rho-iso- α -ácidos 47,4 ppm. Esta solución fue preparada de la misma manera que la solución de iso- α -ácidos, con la diferencia del empleo de lúpulo rho (30,1 % m/v), en lugar del isomerizado.

Solución de tetrahidro-iso- α -ácidos 47,4 ppm. Inicialmente también fue preparada la solución más concentrada (948 ppm); para ello se emplearon 1854 μ L del lúpulo tetra (10,225 % m/v) y se aforaron con etanol 99,9 % (200 mL). La solución de 47,4 ppm fue preparada empleando 100 mL de la solución 948 ppm y aforando con solución búfer (2 L).

Solución de hexahidro-iso- α -ácidos 47,4 ppm. Inicialmente también fue preparada una solución más concentrada (948 ppm); para ello se emplearon 1354 μ L lúpulo hexa (14 % m/v) y se aforaron con etanol 99,9 % (200 mL). La solución de 47,4 ppm fue preparada empleando 100 mL de la solución 948 ppm y aforando con solución búfer (2 L).

Sistemas modelo. Fueron preparados 10 sistemas modelo: 1 blanco (etanol 5%, pH: 4,5), 1 sistema de aminoácidos, 4 sistemas con los diferentes tipos de lúpulo y 4 sistemas de combinaciones lúpulo más aminoácidos.

Sistema de aminoácidos 0,125 mM. Fue preparado mezclando 31 mL de cada aminoácido 4 mM y aforando a 1 L con solución etanólica buferada.

Sistema de Iso- α -ácidos 40 ppm. 844 mL de la solución de iso- α -ácidos (47,4 ppm) fueron llevados a un volumen final de 1 L con solución etanólica buferada.

Sistema de Iso- α -ácidos y aminoácidos. Fueron mezclados 31 mL de cada aminoácido 4 mM con 844 mL de solución de iso- α -ácidos (47,4 ppm).

Los sistemas con los otros tipos de lúpulo (rho, tetra y hexa) fueron preparados siguiendo el mismo procedimiento experimental que el explicado para los sistemas con iso- α -ácidos.

5.3.3 Cervezas empleadas

Fueron empleadas dos cervezas comerciales tipo Pilsen las cuales se denominaron A y B, suministradas por planta los Cortijos.

5.3.4 Metodología

Almacenamiento de sistemas modelo y cervezas. Los sistemas modelo fueron preparados y embotellados en frascos (100 mL) con septum de silicona blanca y sello de aluminio. Un número de frascos fue reservado para la determinación del punto inicial del seguimiento (almacenado a 0 °C) y el resto fue almacenado en una incubadora (28 °C). La concentración de aldehídos de Strecker en el punto inicial de cada sistema modelo fue determinada en la misma semana de preparación de los mismos. La medida inicial de ácidos amargos por HPLC, fue realizada a la semana siguiente de la preparación.

En el caso de las muestras de cerveza, la medida en el punto inicial de aldehídos de Strecker y ácidos amargos se realizó a la semana siguiente de su fecha de producción, por lo que se mantuvieron en el cuarto frío (6-8 °C) hasta el momento de su análisis. El resto de las cervezas fueron almacenadas en una incubadora (28 °C) para análisis posteriores.

Análisis de los sistemas modelos y cervezas

a) Determinación de aldehídos de Strecker

La derivatización y extracción simultánea fue ejecutada sobre el recubrimiento de una fibra PDMS/DVB, previamente acondicionada en el inyector del GC (250 °C, 30 min). El procedimiento de cargado del derivatizante se llevó a cabo exponiendo la fibra en el espacio de cabeza de una solución de PFBHA (6 g/L) durante 5 min. La solución de PFBHA fue mantenida en un baño de agua sobre una plancha de agitación/calentamiento (240 rpm, 40 °C). El proceso de derivatización/extracción se realizó colocando en el vial ámbar 20 mL de la muestra, 3 g de NaCl y los estándares internos (30 ppb de 3-metilbutenal y 3 ppb de benzaldehído *d-6*) con una barra magnética (1 pulgada), sellados con septum de teflón/silicona y colocados en un baño de agua sobre una plancha de agitación/calentamiento (240 rpm, 30 °C). La muestra fue mantenida en el baño de calentamiento por un tiempo de 20 min antes de la derivatización/extracción, esto para permitir el equilibrio de los analitos entre la fase acuosa y el espacio de cabeza. Luego la fibra cargada con PFBHA fue expuesta al espacio de cabeza de la muestra durante 30 min. Una vez culminado el procedimiento de derivatización sobre la fibra los derivados fueron desorbidos en el puerto de inyección del GC (230 °C, 2,5 min).

La concentración fue determinada mediante el método de estandarización interna y se hicieron triplicados por cada muestra.

b) Separación de ácidos amargos por HPLC

Para el seguimiento de la degradación de ácidos amargos en sistemas modelos, la muestra fue pasada por un filtro de jeringa (0,45 µm) y luego colocada en un vial para su inyección en el sistema cromatográfico (20 µL). Diversas mezclas de solventes fueron empleadas de acuerdo al tipo de lúpulo de estos sistemas modelo: a) Iso- α -ácidos:

CH₃CN:H₂O:CH₃OH:H₃PO₄ (45:46:9:0,08, v/v/v/v); b) tetrahidro-iso- α -ácidos: CH₃CN:H₂O:H₃PO₄ (64:36:0,3, v/v/v); c) rho-iso- α -ácidos: CH₃OH:H₂O:H₃PO₄ (65:35:0,8, v/v/v) y d) hexahidro-iso- α -ácidos: CH₃OH:H₂O:H₃PO₄ (76:24:0,8, v/v/v).

En cuanto a las muestras de cerveza, fue necesario aislar los ácidos amargos del lúpulo previo a la inyección en el sistema cromatográfico. La cerveza fue desgasificada y un volumen de 20 mL se colocó en un vial (40 mL), se le adicionó H₃PO₄ (2 mL, 85% w/w) y se colocó la barra de PDMS en contacto con la muestra. La extracción de los ácidos amargos fue ejecutada por agitación (1000 rpm, 30 min). Luego fue sacada la barra, lavada brevemente con agua y secada con un papel libre de pelusas. La desorción líquida fue realizada agitando la barra (500 rpm, 15 min) en contacto con una mezcla CH₃CN:H₂O (2 mL, 50:50 v/v). La solución fue pasada por un filtro de jeringa (0,45 μ m) y luego colocada en un vial para su inyección en el sistema cromatográfico (20 μ L). La extracción fue realizada por duplicado.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Optimización de una metodología para la determinación de aldehídos de Strecker, furfural y (E)-2-nonenal en cerveza mediante la derivatización sobre la fibra y GC/MS

6.1.1 Separación e identificación

La separación de los derivados fue ejecutada de acuerdo al programa mencionado anteriormente (sección 5.1.1). En la Figura 7 se muestra la separación cromatográfica de las oximas (*syn* y *anti*) resultantes de la derivatización con PFBHA de una mezcla de estándares de aldehídos. La identificación fue realizada por espectrometría de masas usando ionización por impacto de electrones en el modo *scan*, de los estándares puros de aldehídos sometidos al proceso de derivatización. El analizador establecido en el modo *scan* permitió conocer los iones característicos de cada oxima mediante los espectros de masa generados (Apéndice A). Para todas las oximas fue observado el ión molecular, lo cual es muy útil para la identificación de los compuestos de interés. Fue confirmado el fragmento de m/z 181 en todas las oximas, el cuál corresponde al pico base (ión $C_6F_5CH_2^+$).

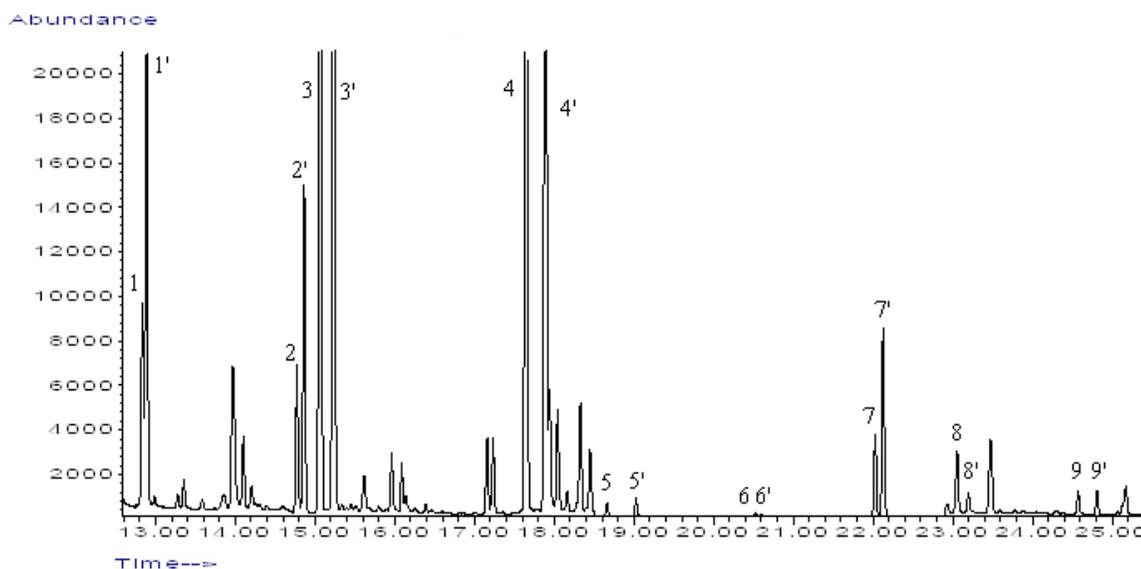


Figura 7. Cromatograma SIM de una mezcla de estándares de aldehídos derivatizados con PFBHA. Picos: 1 y 1': 2-metil-propanal, 2 y 2': 2-metil-butanal, 3 y 3': 3-metil-butanal, 4 y 4': 3-metil-2-butanal, 5 y 5': furfural, 6 y 6': metional, 7 y 7': benzaldehído *d*-6, 8 y 8': fenilacetaldehído, 9 y 9': (E)-2-nonenal.

Para la cuantificación se utilizó el espectrómetro en modo SIM, los iones monitorizados se muestran en la Tabla 7. Se observaron coeluciones para furfural, metional y benzaldehído *d-6* cuando se empleaba el ión 181 por lo que fueron seleccionados los iones característicos (minoritarios) para la cuantificación de estos aldehídos. La respuesta considerada para cada aldehído fue la suma de las áreas de las oximas generadas (*syn* y *anti*).

Tabla 7. Iones monitorizados con el modo SIM por impacto de electrones (EI)

Oximas	Masa molecular (g/mol)	Tiempo de retención (min)	Iones <i>m/z</i>
2-metil-propanal	267	12,75	181,195, 250
2-metil-butanal	281	14,70	181, 239
3-metil-butanal	281	15,05	181, 239
3-metil-2-butenal (IS)	279	17,50	181, 264, 279
Furfural	291	18,50	248, 291
Metional	299	20,44	252, 299
Benzaldehído <i>d-6</i> (IS)	307	21,85	277, 307
Fenilacetaldehído	315	22,90	181, 297, 315
(E)-2-nonenal	335	24,40	181, 250

I.S estándar interno (por sus siglas en inglés, internal standard)

6.1.2 Estudio de los factores involucrados en el proceso de cargado del recubrimiento con PFBHA

En primer lugar, se determinó la concentración del derivatizante a ser empleada en el proceso de cargado del recubrimiento. El criterio utilizado para la selección fue la concentración correspondiente a una respuesta alta de derivatizante (área del PFBHA). Lo importante en este caso es obtener una cantidad grande de PFBHA sobre el recubrimiento para garantizar que el derivatizante se mantiene sobre la fibra de manera constante durante el proceso de extracción/derivatización y que todos los sitios del recubrimiento están siendo ocupados por PFBHA antes de llevarse a cabo dicho proceso. En la Figura 8 se muestra la respuesta del derivatizante en función de la concentración del mismo. Se observó un aumento rápido de la respuesta a las concentraciones más bajas y luego a partir de 1 g/L el incremento fue más lento. Fue seleccionada una concentración de 6 g/L ya que permite un cargado de PFBHA importante sobre el recubrimiento y está acorde a las concentraciones usualmente empleadas (1–6 g/L) en este tipo de derivatización [21,26].

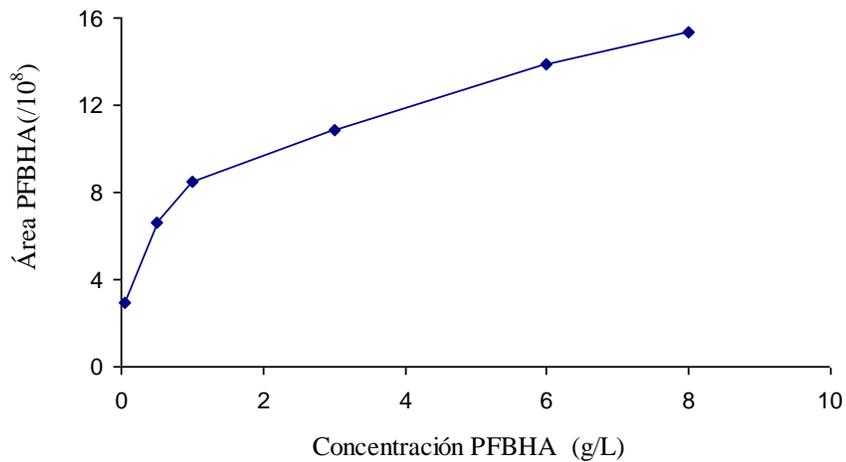


Figura 8. Efecto de la concentración de derivatizante sobre la respuesta del PFBHA. Temperatura: 40 °C, tiempo de cargado: 5 min.

Posteriormente, se estudió el efecto del tiempo y de la temperatura en el proceso de saturación de la fibra por medio de un diseño factorial 2^2 . Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 8. Fueron comprobados los supuestos del análisis de varianza. Los resultados demostraron que solo la temperatura tuvo un efecto significativo ($P < 0,05$) (Tabla 9) y positivo sobre el área del PFBHA (Figura 9). Esto indicó que un incremento en la temperatura produce una mayor cantidad de derivatizante sobre la fibra. Dado que el tiempo no fue un factor significativo, fue seleccionado el menor tiempo (5 min). Consecuentemente, las mejores condiciones seleccionadas para el proceso de cargado de una fibra de PDMS-DVB con PFBHA fueron: una temperatura de 40 °C y un tiempo de 5 minutos, empleando una solución de PFBHA de 6 g/L.

Tabla 8. Matriz del diseño factorial 2², niveles y valores de la respuesta

Corrida	Temperatura	Tiempo	Área PFBHA (/10 ⁷)
1	-1	1	201,0
2	1	-1	209,2
3	-1	-1	172,8
4	-1	1	191,5
5	1	1	217,2
6	1	1	219,6
7	1	-1	210,2
8	-1	-1	192,4
-1	30 °C	5 min	
1	40 °C	10 min	

Matriz generada con el software estadístico Minitab, 2 réplicas

Tabla 9. Análisis de varianza para diseño de saturación de la fibra

Analysis of Variance for Y, using Adjusted SS for Tests							
Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P	
Temperature	1	1,21763E+17	1,21763E+17	1,21763E+17	20,09	0,011	
Time	1	2,48299E+16	2,48299E+16	2,48299E+16	4,10	0,113	
Temperature*Time	1	1,24121E+15	1,24121E+15	1,24121E+15	0,20	0,674	
Error	4	2,42488E+16	2,42488E+16	6,06221E+15			
Total	7	1,72083E+17					

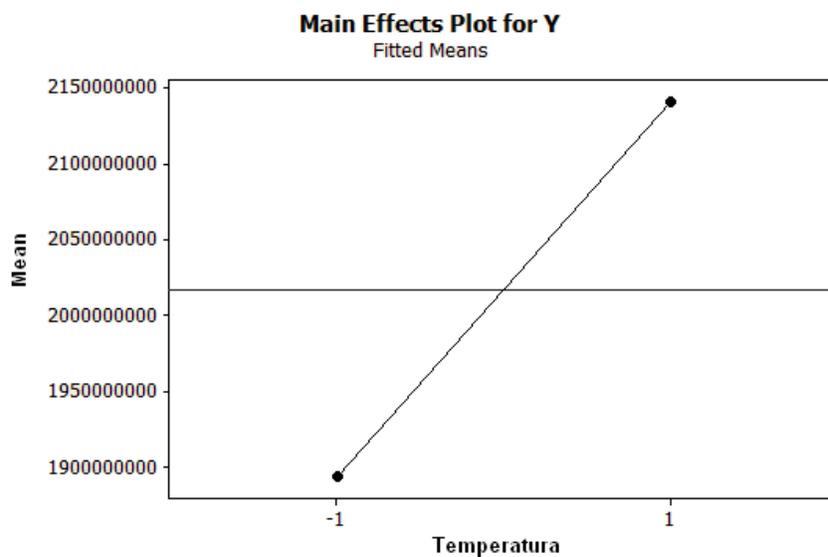


Figura 9. Efecto de la temperatura sobre la respuesta del PFBHA

6.1.3 Estudio del efecto de los factores en el proceso de derivatización sobre la fibra

La validez del modelo fue confirmada por medio de los supuestos del análisis de varianza (ANOVA, por sus siglas en inglés, *analysis of variance*) para cada una de las oximas de los aldehídos (Apéndice B), tal como fue realizado en la optimización del cargado con PFBHA. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 10. El diseño aplicado tanto en cerveza como en soluciones de estándares de aldehídos (etanol 5%), permitió conocer el comportamiento del analito en la solución estándar con un porcentaje de alcohol similar al de la cerveza y por ende con una constante de distribución del analito entre las fases lo más similar al de la matriz de una cerveza.

El diseño ejecutado permitió estimar los efectos principales, interacciones entre factores y el efecto del bloque (día), tal como se puede apreciar en la Tabla 10. Los resultados mostraron que la temperatura, tiempo y la adición de NaCl fueron significativos para la mayoría de los analitos. Las interacciones entre factores también fueron significativas.

La temperatura mostró un efecto negativo para los aldehídos más volátiles y un efecto positivo para los menos volátiles. Esto fue confirmado a través de las interacciones entre el tiempo y la temperatura. En la Figura 10-a se observa que un incremento del tiempo causa un aumento significativo en la respuesta de la oxima del 2-metil-butanal a temperatura baja. Este mismo comportamiento fue observado para 2-metil-propanal, 3-metil-2-butanal y furfural. Por el contrario, para el fenilacetaldehído (Figura 10-b), la respuesta de la oxima se incrementó significativamente a temperatura alta. Este último comportamiento también fue observado para metional y (E)-2-nonenal.

El efecto de la temperatura sobre la respuesta de la oxima del 3-metil-butanal fue positivo solo en la solución estándar, pero no fue significativo en la matriz de cerveza. Sin embargo, el gráfico de interacción temperatura-tiempo (Figuras 10-c,d) reveló una fuerte interacción entre estos factores, indicando que la respuesta del 3-metil-butanal se incrementa a temperaturas bajas y al mayor tiempo de extracción.

Tabla 10. Efectos principales, interacciones entre factores y efecto del bloque para cada analito en cerveza y soluciones estándares de aldehídos (etanol 5 %)

Compuesto	Matriz	Efectos principales			Interacciones				Efecto del bloque
		T	t	sal	sal T	t T	t sal	T t sal	
2-metil-propanal	1	-	+	+		-	+		si
	2	-	+	+	-	-	+		si
2-metil-butanal	1	-	+	+		-			si
	2	-	+	+	-	-	+	-	si
3-metil-butanal	1	+	+	+		+	+		no
	2		+	+		-	+	-	si
3-metil-2-butanal	1	-	+	+		-	+		si
	2	-	+	+		-			no
Furfural	1	-	+	+		-	+		si
	2	-	+	+		-			no
Metional	1	+	+	+	+	+	+	+	no
	2	+	+	+	+	+	+	+	no
Fenilacetaldehído	1	+	+	+	+	+	+	+	no
	2	+	+	+	+	+	+	+	no
(E)-2-nonenal	1	+	+	+	+	+	+		si
	2	+	+	+	+	+	+		si

Factores (T: temperatura, t: tiempo, sal: adición NaCl); estándares internos: 3-metil-2-butanal; matriz: solución estándar de aldehído (1), cerveza (2); efectos significativos al 95% de confianza: efecto positivo (+), efecto negativo (-).

En cuanto al tiempo y la adición de NaCl se observó un efecto positivo sobre la respuesta de la oxima para todos los analitos tanto en solución estándar como en cerveza. En el caso de la adición de NaCl, los resultados indicaron que un incremento en la fuerza iónica de la matriz aumenta la constante de distribución de los aldehídos hacia el espacio de cabeza, esto es conocido como efecto salting-out. Además, la adición de NaCl tuvo una interacción positiva con el tiempo lo cual indica que la respuesta de la oxima se incrementa de manera significativa a mayor tiempo de extracción cuando el NaCl está presente en la matriz. Con relación al efecto del tiempo, se observó un aumento en la respuesta de todas las oximas al incrementar este factor. Esto indica que el proceso de derivatización/extracción no se ha completado bajo las condiciones estudiadas, sugiriendo velocidades de

derivatización/extracción relativamente lentas. Este resultado justifica la realización de un estudio de los perfiles de tiempo de extracción de los aldehídos.

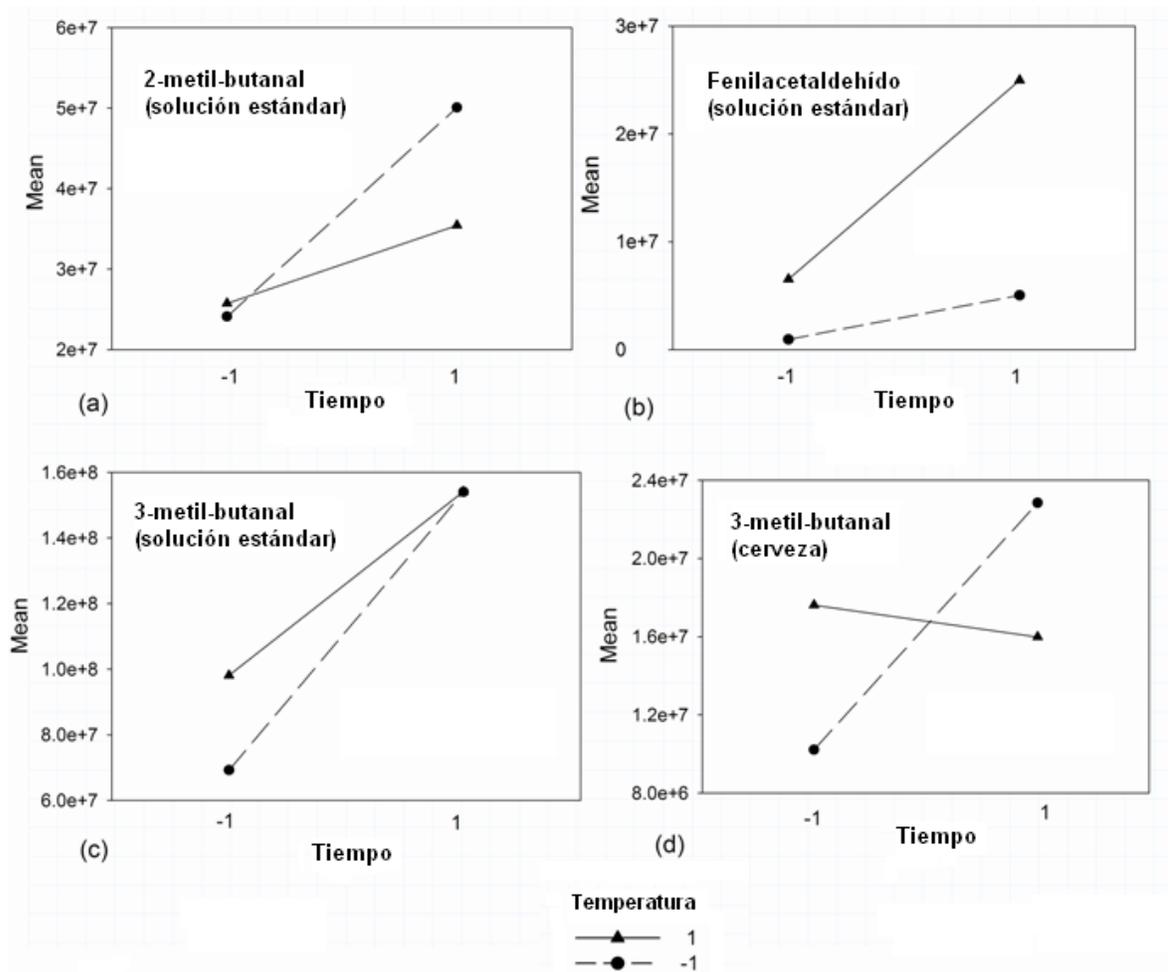


Figura 10. Gráficos de interacción tiempo-temperatura en la solución estándar de aldehídos (a-c) y en cerveza (d).

Adicionalmente, se observó una interacción entre la adición de sal y la temperatura con efectos distintos de acuerdo a la volatilidad del aldehído. Para los aldehídos más volátiles se observó una interacción negativa en cerveza, mientras que la interacción fue positiva para los menos volátiles tanto en cerveza como en la solución estándar. Este comportamiento corroboró el efecto mencionado de la temperatura sobre la respuesta de la oxima, así como el efecto de las interacciones entre la temperatura y otros factores.

El efecto de la temperatura y su interacción con otros factores sugiere que los analitos pueden ser separados en dos grupos de acuerdo a la significancia de los efectos. El primer grupo, con significancia negativa, consiste en los aldehídos más volátiles: 2-metil-propanal, 2-metil-butanal, 3-metil-2-butenal y furfural. El segundo grupo, con significancia positiva, comprende los aldehídos menos volátiles: metional, fenilacetaldehído y (E)-2-nonenal. La presión de vapor de los aldehídos del primer grupo es de uno a dos órdenes de magnitud superior a la de los aldehídos del segundo grupo [47] y se espera que la misma tendencia ocurra para las oximas de estos aldehídos. La disminución de la respuesta de las oximas del primer grupo a altas temperaturas puede estar asociada a la desorción de las oximas desde la fibra (reacción 3, Figura 11), dado que las presiones de vapor de estas oximas son las más altas. Por otro lado, para el segundo grupo, las presiones de vapor más bajas parecieran favorecer el equilibrio de distribución de los aldehídos hacia el espacio de cabeza al incrementarse la temperatura sin tener lugar la desorción de las oximas de estos aldehídos, resultando en un incremento en la respuesta de estas oximas.

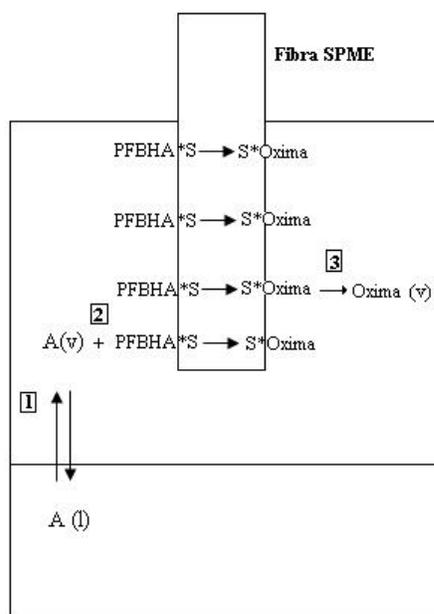


Figura 11. Diagrama esquemático de las reacciones involucradas en el proceso de derivatización y extracción simultánea sobre una fibra. Equilibrio entre los aldehídos en solución y el espacio de cabeza de la muestra (reacción 1), reacción del aldehído gaseoso con el derivatizante sobre el recubrimiento (reacción 2), desorción de la oxima retenida en el recubrimiento (reacción 3).

En cuanto al efecto del día se observó que este fue significativo para la mayoría de los analitos, indicando la relevancia del tipo de diseño aplicado para contrarrestar la variabilidad producida por el día. Adicionalmente, la selección del número apropiado de repeticiones asegura la precisión del estudio de los factores y sus interacciones en el proceso de derivatización y extracción simultánea de los aldehídos.

A pesar de que el estudio realizado sugiere el uso de dos temperaturas diferentes para la determinación de los dos grupos de aldehídos, esto podría incrementar de manera significativa el tiempo de análisis y el consumo de reactivos. Por lo tanto, fue propuesto el uso de una condición única para la determinación de todos los aldehídos, ejecutando la derivatización/extracción a 30 °C (menor temperatura) durante 30 minutos (mayor tiempo) en presencia de NaCl. Esta condición favorece la respuesta de los aldehídos más volátiles, incluyendo el estándar interno, pero reduce la eficiencia de extracción del fenilacetaldehído, metional y (E)-2-nonenal. Es importante destacar que el objetivo en éste apartado no era optimizar las condiciones del proceso pero sí conocer el comportamiento de cada analito y seleccionar una condición que favoreciera a la mayor parte de ellos.

6.1.4 Perfiles de tiempo de extracción

La velocidad de formación de los derivados de cada aldehído tanto en cerveza como en soluciones estándar pudo ser observada mediante los perfiles de tiempo de extracción. El interés estuvo centrado en determinar si durante la extracción, la concentración de las oximas alcanza un “plato”, el cual indicaría un estado en el cual la velocidad de formación de las oximas disminuye significativamente y que se agotó el aldehído. Este estado en el cual la velocidad de formación de las oximas disminuye es el óptimo para seleccionar el tiempo de extracción. En la Figura 12 se muestran dichos perfiles y se puede observar que para ninguno de los aldehídos fue alcanzado este estado. Para 2-metil-propanal, 2-metil-butanal, 3-metil-butanal y furfural la velocidad de formación fue rápida durante los primeros 10 min y fue disminuyendo hacia los 40 min de extracción en la matriz de cerveza, mientras que en la solución estándar la velocidad de formación fue más lenta que en cerveza. Para los demás analitos, fenilacetaldehído, metional y (E)-2-nonenal fue observado un comportamiento diferente, ya que la velocidad de formación fue prácticamente constante durante los 50 min de extracción.

Al comparar las velocidades de formación entre analitos se observó que las oximas de los aldehídos más volátiles se forman a velocidades mayores que la de los menos volátiles, tanto en cerveza como en soluciones estándar. Esto también fue observado por otros autores [26]. Este comportamiento puede ser atribuido a las diversas afinidades de los aldehídos hacia la solución acuosa. De hecho, se espera que para metional y fenilacetaldehído la afinidad por la solución acuosa sea muy grande dado que la constante de Henry de estos aldehídos es baja. Por otro lado, los aldehídos más volátiles, cuyas presiones de vapor son las más altas, se distribuyen de manera rápida hacia el espacio de cabeza durante los primeros minutos y luego la velocidad de formación disminuye, probablemente como resultado de la reducción de los aldehídos en el espacio de cabeza debido a la reacción con PFBHA.

Dado que los analitos no alcanzaron una condición constante durante el tiempo de extracción estudiado (50 min) es importante controlar de manera precisa el tiempo de extracción, ya que pequeñas variaciones en el mismo pueden modificar substancialmente la cantidad extraída del analito. Para los aldehídos más volátiles este factor es menos crítico dado que la velocidad de formación tiende a ser más lenta en la condición de tiempo seleccionado en este trabajo (30 min).

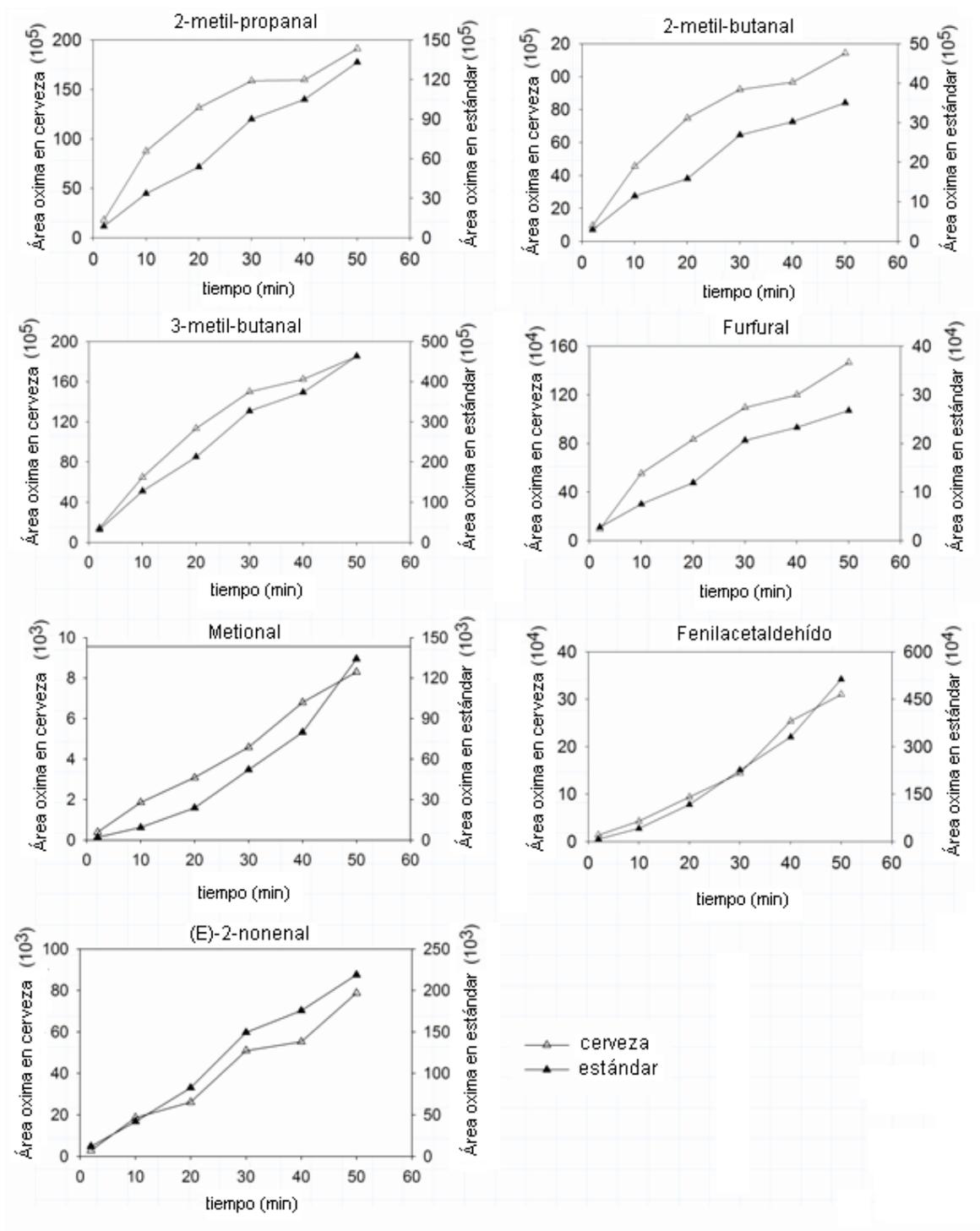


Figura 12. Perfiles de tiempo de extracción para las oximas de los aldehídos en cerveza y soluciones estándar. Temperatura de extracción: 30 °C, 3 g (2,6 M) NaCl.

6.1.5 Validación del método

La validación del método fue ejecutada bajo las condiciones mencionadas en la sección 6.1.3. La Tabla 11 muestra los parámetros de calidad determinados con el método de estandarización interna. El rango dinámico lineal se determinó para todos los analitos excepto para metional, fenilacetaldehído y (E)-2-nonenal, para los cuales fueron considerados sus rangos dinámicos. Esto fue establecido de esta manera por ser el rango dinámico de estos aldehídos lo suficientemente extenso como para abarcar las concentraciones de estos aldehídos en cervezas frescas y envejecidas.

El empleo de 3-metil-2-butenal como estándar interno permitió obtener buenos coeficientes de correlación para todos los aldehídos y compensó la pérdida de linealidad observada para 2-metil-propanal, 2-metil-butanal y 3-metil-butanal con el método de estandarización externa (resultados no mostrados). Además, se incorporó un estándar interno aromático (benzaldehído *d-6*) para compensar las variaciones sufridas durante la extracción y derivatización del fenilacetaldehído. El benzaldehído *d-6* no fue considerado en los experimentos de optimización ya que este estuvo disponible para la fase final de la validación. El uso del benzaldehído *d-6* permitió obtener buena linealidad para el fenilacetaldehído (Tabla 11).

En la Tabla 11 también se puede apreciar las figuras de mérito para cada aldehído y se puede observar que los límites de detección y de cuantificación son bajos para todos ellos, en relación con la concentración de estos analitos encontrados en cerveza fresca. Para el fenilacetaldehído el límite de detección fue 28 % más bajo cuando se realizó la corrección con benzaldehído *d-6*. Los límites de detección obtenidos fueron comparables con aquellos reportados en la bibliografía [15,25,26,48].

Se estimó la precisión del método por medio de la repetibilidad, la cual fue determinada a dos niveles de concentración (Tabla 11). Los coeficientes de variación (CV) obtenidos estuvieron entre 1,1-12,2 %, lo cual indicó que la precisión del método es buena, comparada con métodos SPME similares [15,24,26]. El valor de CV más alto (12,2 %) fue obtenido para el fenilacetaldehído con el nivel de concentración bajo y el uso del 3-metil-2-butenal como estándar interno. El uso de benzaldehído *d-6* mejoró el valor de CV a 9,5 %.

Tabla 11. Linealidad, límite de detección, límite de cuantificación y repetibilidad del método optimizado utilizando como estándar interno el 3-metil-2-butenal

Aldehídos	Linealidad		LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Repetibilidad CV (%) (n =5)	
	Rango ($\mu\text{g L}^{-1}$)	R ²			Nivel bajo	Nivel alto
2-Metil-propanal	0,4-75	0,9978	0,11	0,40	2,7 (0,3)	1,1 (75)
2-Metil-butanal	0,1-50	0,9987	0,03	0,11	3,9 (0,1)	3,6 (50)
3-Metil-butanal	0,3-50	0,9972	0,09	0,30	3,0 (0,5)	7,4 (50)
Furfural	5-300	0,9993	1,60	5,20	5,4 (5)	9,1 (300)
Metional	1-20	0,9941	0,30	1,00	7,6 (3)	8,0 (20)
Fenilacetaldehído	0,6-20	0,9975	0,23	0,76	12,2 (0,8)	6,3 (20)
		0,9982 ^a	0,17 ^a	0,55 ^a	9,5 (0,8) ^a	7,8 (20) ^a
(E)-2-nonenal	0,05-0,25	0,9967	0,015	0,05	5,6 (0,04)	8,9 (0,25)

Los valores en paréntesis indican la concentración del aldehído ($\mu\text{g L}^{-1}$) en cada nivel. ^aValores corregidos con benzaldehído *d-6*.

Para evaluar el método propuesto en términos de las interferencias de matriz se realizaron ensayos de recuperación. En la Tabla 12 se observan las recuperaciones obtenidas con dos niveles de concentración y con dos métodos de estandarización: externa e interna. Esto permitió evaluar la efectividad de los estándares internos empleados. Pudo ser observado que el uso de los estándares internos mejoró significativamente la recuperación de los analitos. El porcentaje de recuperación obtenido por calibración externa estuvo entre 24 y 210 %, mientras que con la calibración interna el rango obtenido estuvo entre 73 y 117 %. Esto es un indicativo de que el estándar interno actúa como un surrogate permitiendo compensar cualquier pérdida durante el proceso de extracción/derivatización y efectos de matriz. Con este último método, las recuperaciones de 2-metil-propanal, 3-metil-butanal, fenilacetaldehído (corregido con benzaldehído *d-6*) y (E)-2-nonenal fueron menores a 85 % para el nivel de concentración más bajo. De los estudios realizados se dedujo que la determinación del fenilacetaldehído puede ser realizada usando 3-metil-2-butenal ó benzaldehído *d-6* y que el 3-metil-2-butenal es efectivo tanto para aldehídos alifáticos como aromáticos. La efectividad de éste último estándar pudiese estar asociada al hecho de que las condiciones de extracción seleccionadas también favorecen la derivatización/extracción de este compuesto.

En la Tabla 12 también se aprecian las concentraciones determinadas en una cerveza fresca. Se puede observar que únicamente para metional el límite de cuantificación fue ligeramente

superior a la concentración en cerveza fresca. El coeficiente de variación más alto fue obtenido para fenilacetaldehído cuando se corrigió con benzaldehído *d-6* (14,5 %).

Tabla 12. Porcentaje de recuperación de aldehídos en muestras de cerveza empleando como estándar interno 3-metil-2-butanal

Aldehídos	Método de estandarización	% Recuperación		Concentración del analito en cerveza ($\mu\text{g L}^{-1}$)*
		nivel bajo	nivel alto	
2-metil-propanal	interna	79 (5)	104 (20)	$1,9 \pm 0,1$ [6,1]
	externa	24 (5)	57 (20)	
2-metil-butanal	interna	88 (5)	85 (10)	$0,58 \pm 0,03$ [5,6]
	externa	88 (5)	74 (10)	
3-metil-butanal	interna	78 (5)	80 (20)	$0,58 \pm 0,04$ [7,4]
	externa	89 (5)	72 (20)	
Furfural	interna	97 (50)	102 (100)	$25,7 \pm 1,4$ [5,6]
	externa	92 (50)	97 (100)	
Metional	interna	87 (6)	90 (15)	$0,87 \pm 0,03$ [3,1] NC
	externa	77 (6)	210(15)	
Fenilacetaldehído	interna	80 (5) ^a	90 (15) ^a	$1,5 \pm 0,2$ [14,5]
		87 (5)	100 (15)	$1,1 \pm 0,1$ [9]
	externa	80 (5)	75 (15)	
(E)-2-nonenal	interna	73 (0,05)	117 (0,15)	$0,055 \pm 0,003$ [6,8]
	externa	74 (0,05)	99 (0,15)	

Los valores entre paréntesis corresponden a la concentración del aldehído añadida ($\mu\text{g L}^{-1}$).^a Valores corregidos con benzaldehído *d-6*.

* cerveza tipo Ice, n=4, las concentraciones son reportadas como el promedio \pm desviación estándar. Los valores en corchete corresponden al CV

6.1.6 Empleo de la ionización química negativa

Además del uso de la fuente de impacto de electrones se planteó la determinación de los aldehídos mediante el empleo de una fuente de ionización blanda, tal como la ionización química. En la ionización química negativa (NCI) los electrones térmicos, generados al impactar un haz de electrones de 230 eV con el gas reactivo (metano), son los que ionizan la muestra. Se caracterizan por ser electrones de baja energía (0-5 eV), por lo que al reaccionar con derivados con capacidad de capturar electrones generan aniones y puede ser alcanzada una mejor sensibilidad en la determinación. Al reaccionar los electrones con la muestra M se generan aniones radicales $[\text{M}]^-$, $[\text{M-X}]^-$ y $[\text{X}]^-$ [49]. En la Tabla 13 se muestran los iones resultantes al aplicar este modo de ionización, en la cual fueron

identificados el ión $[M]^-$ y el fragmento $[M-20]^-$, resultantes de la pérdida de un electrón y de HF, respectivamente. Se seleccionaron iones característicos de cada oxima para el monitoreo selectivo de los iones (SIM). Los espectros de las oximas se muestran en el Apéndice C.

Tabla 13. Iones monitorizados con el modo SIM por NCI

Oximas	PM (uma)	PM-20 (uma)	Iones m/z
2-metil-propanal	267	247	247, 267
2-metil-butanal	281	261	261
3-metil-butanal	281	261	261
3-metil-2-butenal (IS)	279	259	229, 259
Furfural	291	271	240,9, 270,9
Metional	299	279	279
Benzaldehído <i>d-6</i> (IS)	307	287	257, 287
Fenilacetaldehído	315	295	267,9, 294,5
(E)-2-nonenal	335	315	315

IS estándar interno

Al aplicar este modo de ionización empleando las mismas condiciones cromatográficas de impacto de electrones se observaron picos ensanchados (con saturación) para los aldehídos más volátiles. Se ajustaron las condiciones cambiando el inyector al modo split y se ajustó finalmente de modo que permitiera alcanzar el mayor rango dinámico posible para todos los aldehídos. Esto se realizó con base en los cromatogramas de un patrón multicomponente a concentración baja y otro a concentración alta. La relación de división elegida finalmente fue de 25:1, esto significa que de 25 partes de la mezcla total (muestra+gas portador) solo 1 parte entra a la columna cromatográfica.

En la Tabla 14 puede apreciarse el rango dinámico lineal, figuras de mérito y porcentaje de recuperación del método. Para los aldehídos más volátiles, 2-metil-propanal, 2-metil-butanal, 3-metil-butanal, el límite superior del rango fue menor al obtenido por impacto de electrones. Los límites de detección y de cuantificación fueron comparables a los obtenidos por impacto de electrones con excepción de metional y fenilacetaldehído, cuyos LD disminuyeron en un 67 y 47 %, respectivamente. También pudieron observarse muy buenas recuperaciones para todos los analitos, excepto para 3-metil-butanal (aprox. 60 %). En algunos casos dichas recuperaciones fueron ligeramente menores a 85 %, solo para el dopaje de concentración más alta.

El método con este modo de ionización puede ser especialmente útil para los aldehídos menos volátiles en su determinación en cervezas muy frescas. En el caso de cervezas envejecidas es preferible el empleo del modo de impacto de electrones, pues las concentraciones de 2-metil-propanal pueden llegar a ser superiores a los 40 ppb. En la Tabla 15 se presentan las concentraciones obtenidas en una cerveza envejecida, ya que para el momento de la validación del método no estaba disponible una cerveza fresca. Los resultados muestran concentraciones muy similares con ambos modos de ionización, solo para el caso de 3-metil-butanal se observa que el valor reportado es poco confiable, dado la baja recuperación obtenida. A pesar de que con NCI el límite superior del rango establecido para 2-metil-propanal fue 25 ppb, la concentración obtenida (superior a dicho rango) dio igual a aquella obtenida por impacto de electrones, lo que sugiere que para este aldehído pudiera extenderse un poco más el rango de trabajo. Los coeficientes de variación obtenidos por NCI estuvieron acordes a la reproducibilidad observada con estos métodos analíticos.

Tabla 14. Linealidad, límite de detección, límite de cuantificación y repetibilidad del método optimizado utilizando como estándar interno el 3-metil-2-butenal

Aldehídos	Linealidad		LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	% Recuperación	
	Rango ($\mu\text{g L}^{-1}$)	R^2			Nivel bajo	Nivel alto
2-Metil-propanal	0,6-25	0,9944	0,18	0,63	114 (2)	-
2-Metil-butanal	0,1-25	0,9924	0,04	0,12	84 (2)	80 (10)
3-Metil-butanal	0,2-25	0,9901	0,05	0,17	58 (2)	58 (5)
Furfural	7-300	0,9995	2	7	105 (50)	86 (100)
Metional	0,3-20	0,9970	0,10	0,34	95 (5)	80 (10)
Fenilacetaldehído	0,3-20	0,9987	0,15	0,50	113 (5)	70 (10)
		0,9983 ^a	0,09 ^a	0,3 ^a	97 (5) ^a	87 (10) ^a
(E)-2-nonenal	0,05-0,25	0,9979	0,013	0,05	99 (0,04)	107 (0,10)

Los valores entre paréntesis corresponden a la concentración del aldehído añadida ($\mu\text{g L}^{-1}$).^aValores corregidos con benzaldehído *d-6*.

Tabla 15. Comparación de las concentraciones encontradas en cerveza con impacto de electrones e ionización química negativa utilizando como estándar interno el 3-metil-2-butanal

Aldehídos	Concentración ($\mu\text{g L}^{-1}$)	
	EI	NCI
2-metil-propanal	$39,4 \pm 1,6$ [4]	39 ± 2 [5,7]
2-metil-butanal	$7,9 \pm 0,2$ [2,5]	$6,8 \pm 0,2$ [3]
3-metil-butanal	$23,5 \pm 0,8$ [3,4]	17 ± 1 [6]
Furfural	$62,2 \pm 0,2$ [0,3]	62 ± 3 [4]
Metional	$11,0 \pm 0,2$ [1,8]	$10,2 \pm 1,2$ [11]
Fenilacetaldehído ^a	$9,41 \pm 0,06$ [0,7]	$11,7 \pm 0,1$ [1]
(E)-2-nonenal	$0,024 \pm 0,002$ [8,3]	$0,022 \pm 0,003$ [13,6]

^a empleando benzaldehído *d*-6

cerveza tipo Ice, n=3, las concentraciones son reportadas como el promedio \pm desviación estándar

Los valores en corchete corresponden al CV

Para ejecutar el seguimiento de los aldehídos de Strecker durante el almacenamiento se seleccionó el modo de ionización por impacto de electrones, ya que generó un rango lineal más amplio para todos los aldehídos, lo cual puede permitir la determinación de las concentraciones de aldehídos usualmente encontradas en cervezas envejecidas. En términos de ejecución esto es favorable, porque el modo de impacto de electrones es el modo de ionización comúnmente empleado para la mayor parte de los análisis en el laboratorio, implicando que no sea necesario un cambio de la fuente de ionización y de las condiciones térmicas del MS.

6.2 Optimización de la separación cromatográfica de iso- α -ácidos, rho-iso- α -ácidos, tetrahidro-iso- α -ácidos y hexahidro-iso- α -ácidos en diferentes tipos de lúpulo y cerveza por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

La separación de los diversos iso- α -ácidos del lúpulo requiere que sea considerado el uso de un par iónico o el ajuste de pH, bien sea para aportar el contraión al analito y generar la especie neutra a ser retenida por la fase estacionaria ó desplazar el equilibrio iónico hacia el predominio de la especie neutra, respectivamente. En esta investigación se hizo uso del H_3PO_4 , el cual fue seleccionado de acuerdo a trabajos anteriores [36,37].

Para optimizar la separación de cada tipo de iso- α -ácido se utilizaron estándares comerciales que permitieron identificar de manera parcial algunas de las especies presentes en cada extracto de ácido amargo. Cada extracto consiste en una mezcla de isómeros *cis* y *trans*, mientras que cada estándar no necesariamente contiene todas las especies. La asignación de los picos fue realizada por comparación con cromatogramas reportados bajo las mismas condiciones en el método EBC 7.9, reportado en la ficha técnica del estándar (Apéndice D).

En el caso de un extracto isomerizado, que contuvo 6 especies mayoritarias, tres *cis* y tres *trans*, se empleó un estándar de *trans*-iso- α -ácidos para identificar las especies *trans* del extracto. Se observaron tres especies en lugar de seis, lo cual sugirió que las otras tres debían estar coeluyendo con las observadas (Figura 13-a). Esto fue corroborado al disminuir la fuerza del solvente. En fase reversa esto se realiza reduciendo la hidrofobicidad del solvente, lo cual permite que los solutos interaccionen más con la fase estacionaria. La fuerza del solvente fue disminuida reduciendo la proporción de metanol. Esto generó la separación mostrada en la Figura 13-b. Como puede notarse se logró separar una especie más pero con una baja resolución ($R_s \approx 0,8$). El factor de capacidad ($k' > 20$) sugirió la necesidad de un cambio en la selectividad del solvente, lo cual fue logrado por medio del cambio de metanol por acetonitrilo, lo cual generó un cambio substancial de las interacciones entre el solvente, la muestra y la fase estacionaria.

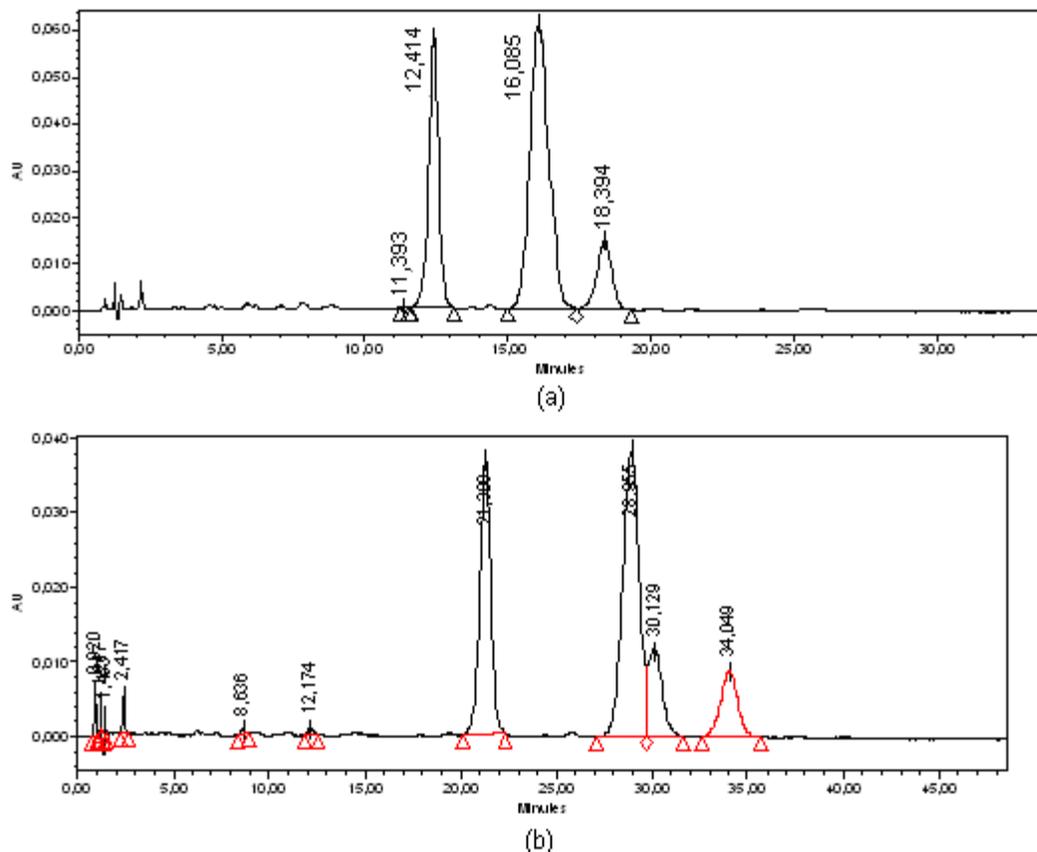


Figura 13. Separación de iso- α -ácidos de un extracto isomerizado empleando (a) $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}:\text{H}_3\text{PO}_4$ (69,5:29,5:1, v/v/v) y (b) $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}:\text{H}_3\text{PO}_4$ (64,5:34,5:1,v/v/v). Columna Atlantis dC18 150 x 4,6 mm x 5 μm , T:35°C, flujo: 1,2 mLmin⁻¹. Extracto en metanol acidificado (0,04 % ac. fosfórico), diluido 750 veces

Algunos autores [30] han indicado que los iso- α -ácidos tienen un valor de pKa de 3, sugiriendo que lo adecuado es el uso de pHs muy bajos para garantizar el predominio de las especies ácidas. Inicialmente se probó con 0,3 % H_3PO_4 en la mezcla 66 % CH_3CN : 34 % H_2O , lo cual generó un pH de 2, valor permitido para garantizar la estabilidad hidrolítica de las fases de siloxanos. En la Figura 14-a, se observa la separación lograda con esta mezcla y que al disminuir la fuerza del solvente se logra una mejor separación cromatográfica de las especies (Figura 14-b). También se muestra en la Figura 14-c la separación de los *trans*-iso- α -ácidos de un estándar, lo cual permitió identificar las especies *trans* del extracto isomerizado. Se concluye que la mezcla $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ cambia significativamente la selectividad de la separación cromatográfica, por lo cual se logra la separación de los iso- α -ácidos.

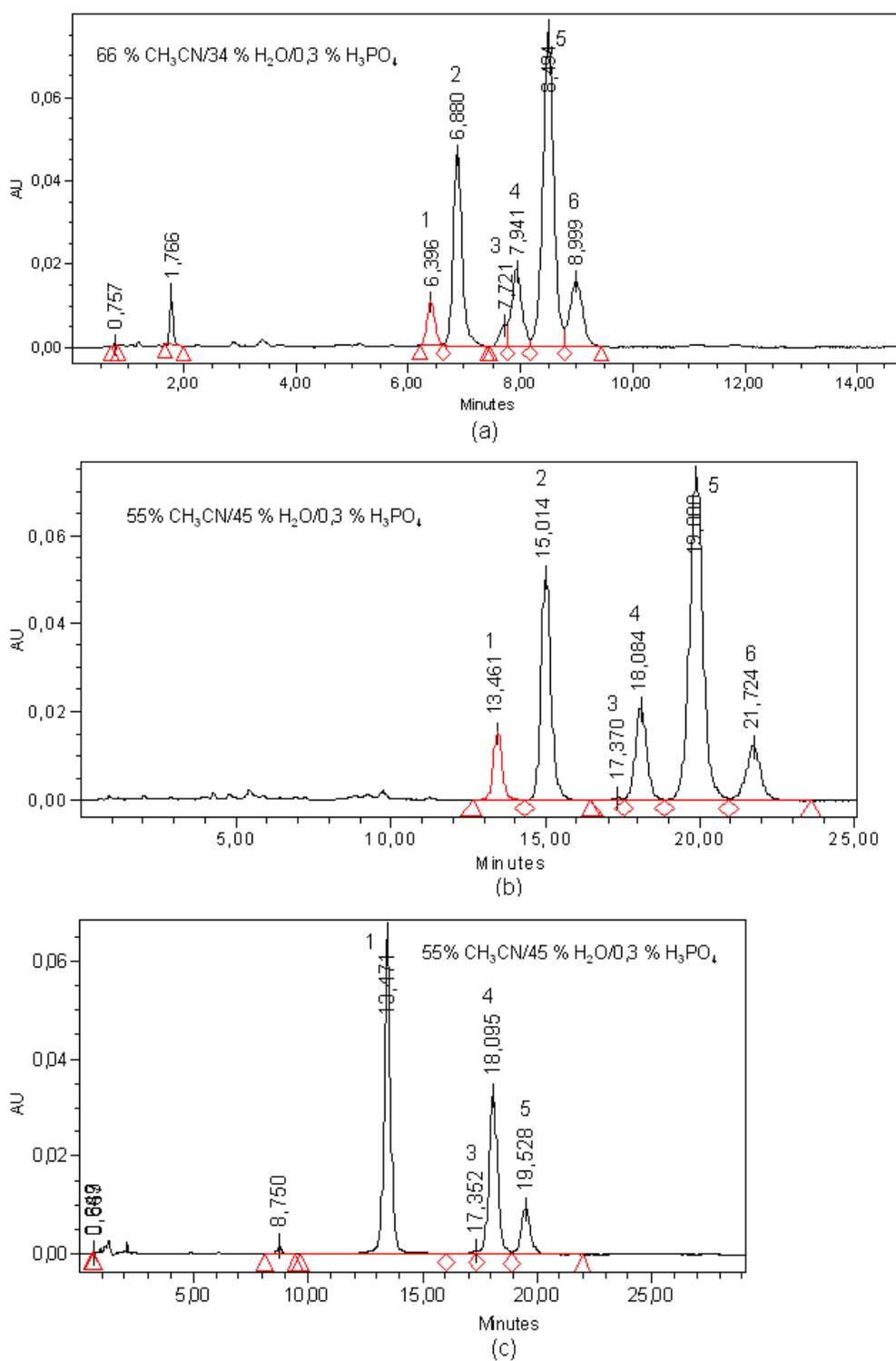
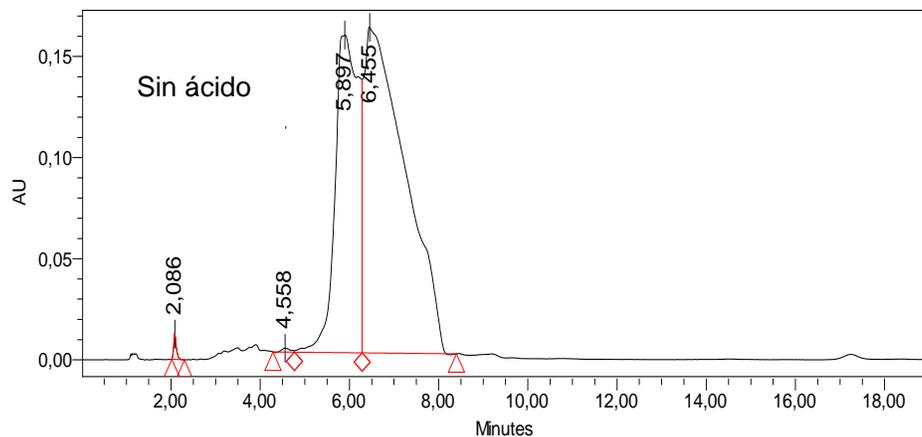


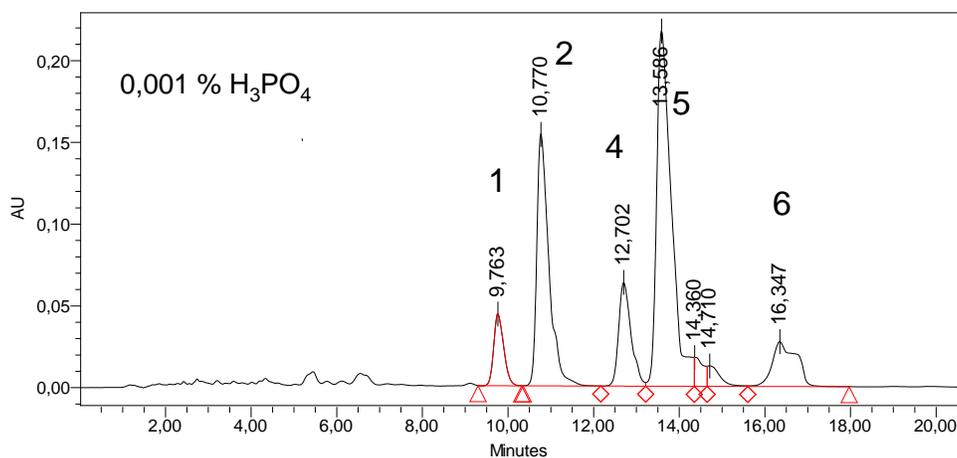
Figura 14. Cromatograma de un extracto isomerizado empleando $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}:\text{H}_3\text{PO}_4$ en diferentes proporciones (a, b) y separación de *trans*-iso- α -ácidos del estándar DCHA-iso (c). Picos: *trans*-isocohumulona (1), *trans*-isohumulona (4), *trans*-isoadhumulona (5).

En la separación obtenida llama la atención que solo se observan 5 especies mayoritarias cuando se esperan 6 compuestos en este extracto. Investigaciones realizadas por Khatib y col. [37] indicaron que la resolución entre la *cis*-isohumulona y la *trans*-isoadhumulona depende fuertemente del porcentaje de ácido fosfórico, encontrando una separación adecuada con el uso de 0,01 % de H_3PO_4 . Considerando este hecho, fue estudiado el efecto de la cantidad de ácido fosfórico, manteniendo constante la fuerza del solvente. Se encontró que la concentración de ácido fosfórico es un factor crítico para lograr la separación de los iso- α -ácidos, tal como puede apreciarse en la Figura 15. Cuando la fase móvil no contiene H_3PO_4 , los iso- α -ácidos interaccionan preferentemente con la fase móvil y la retención es baja, por lo que no es posible la separación de estos ácidos (Figura 15-a). El aumento del ácido fosfórico genera una mayor afinidad de los compuestos con la fase estacionaria por lo que el tiempo de elución se incrementa (Figura 15 b,c). También se observó que la cantidad de ácido tiene un efecto importante sobre la forma de los picos 5 y 6. Además, parecen detectarse otros componentes después de la elución del pico 5 (Figura 15-b).

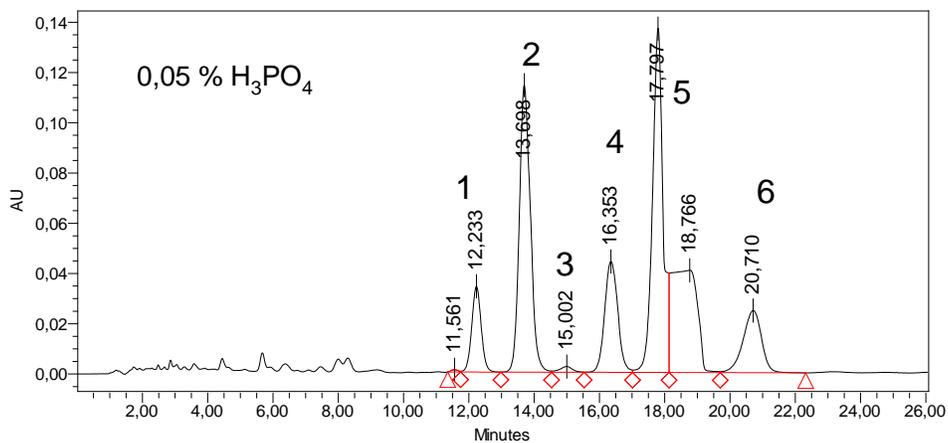
Se disminuyó la fuerza del solvente con el fin de corroborar la presencia del iso- α -ácido “faltante” utilizando un porcentaje de ácido fosfórico de 0,05 % (Figura 16). La proporción $CH_3CN:H_2O:H_3PO_4$ (45:55:0,05,v/v/v) permitió la separación de otro iso- α -ácido, así como también la identificación correcta de los *trans*-iso- α -ácidos, ya que el pico 5 en los cromatogramas anteriores había sido identificado como la *trans*-isoadhumulona. La última separación permitió confirmar que la especie faltante se encontraba coeluyendo con otro iso- α -ácido. Dado que el tiempo de elución obtenido con la proporción anterior fue muy grande se disminuyó por medio del incremento de la fuerza del solvente, sustituyendo parte del agua por metanol, en este caso la selectividad de la fase móvil también se vio modificada.



(a)



(b)



(c)

Figura 15. Efecto del porcentaje de ácido fosfórico en la separación de iso- α -ácidos empleando CH₃CN:H₂O (55:45,v/v). Picos: *trans*-isocohumulona (1), *trans*-isohumulona (4), *trans*-isoadhumulona (5).

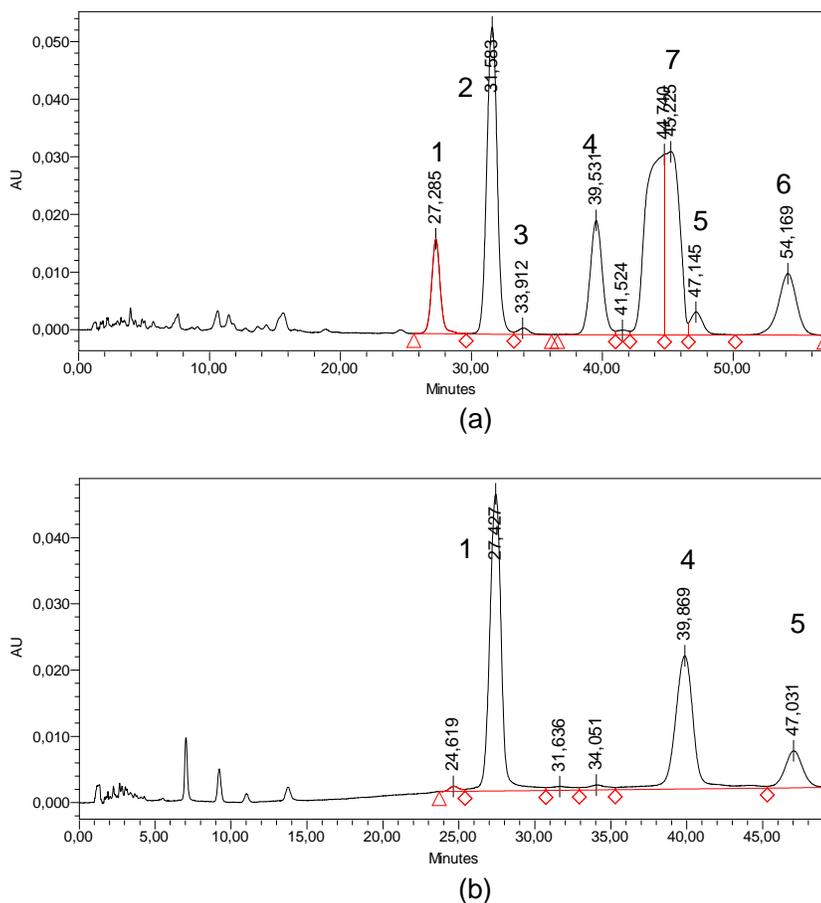
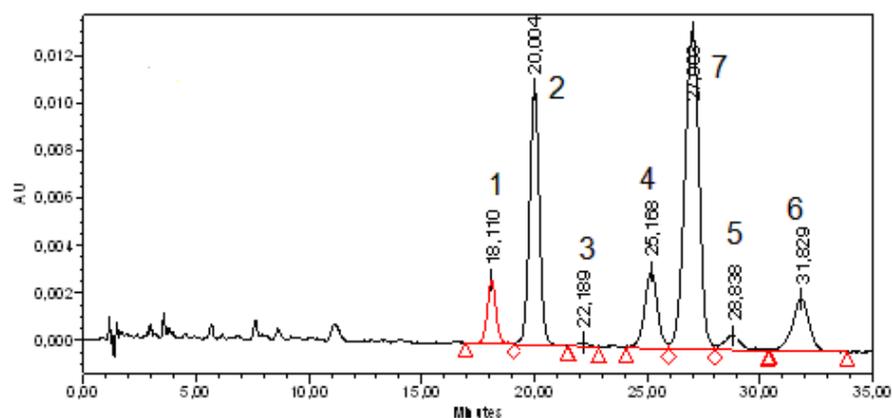
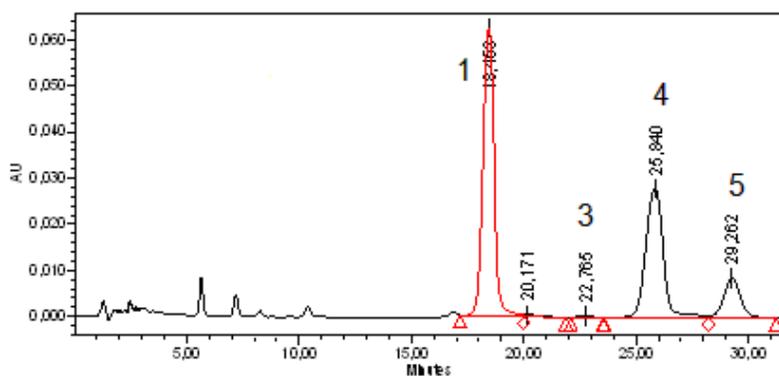


Figura 16. Separación cromatográfica de iso- α -ácidos empleando $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}:\text{H}_3\text{PO}_4$ (45:55:0,05, v/v/v). Extracto isomerizado (a) y estándar de *trans*-iso- α -ácidos (b). Picos: *trans*-isocohumulona (1), *trans*-isohumulona (4), *trans*-isoadhumulona (5).

Pudo observarse que con el incremento de metanol, el tiempo de elución disminuye y mejora la separación entre los compuestos 5 y 7, sin embargo a mayor cantidad de metanol se observó una deformación del pico 7 y una pérdida de resolución entre las especies 4 y 7 (datos no mostrados). La optimización de esta separación viene a ser un compromiso entre el porcentaje de metanol, agua y ácido fosfórico. Un aumento en el porcentaje de ácido permitió mejorar la separación cromatográfica (Figura 17), quedando finalmente seleccionado una proporción $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_3\text{PO}_4$ (45:46:9:0,08, v/v/v/v).



(a)



(b)

Figura 17. Separación cromatográfica de iso- α -ácidos empleando 45%CH₃CN:46%H₂O:9% CH₃OH (0,08 % H₃PO₄). Extracto isomerizado de lúpulo (a) y estándar de *trans*-iso- α -ácidos (b). Picos: *trans*-isocohumulona (1), *trans*-isohumulona (4), *trans*-isoadhumulona (5). Columna Atlantis dC18 150 x 4,6 mm x 5 μ m, T:35°C, flujo: 1,2 mL min⁻¹.

En la Figura 18 puede observarse el cromatograma resultante del extracto isomerizado enriquecido con una solución de *trans*-iso-alfa-ácidos. Se aprecia claramente el crecimiento en las especies identificadas como *trans* y se corroboró que efectivamente la especie 5 es la *trans*-isoadhumulona.

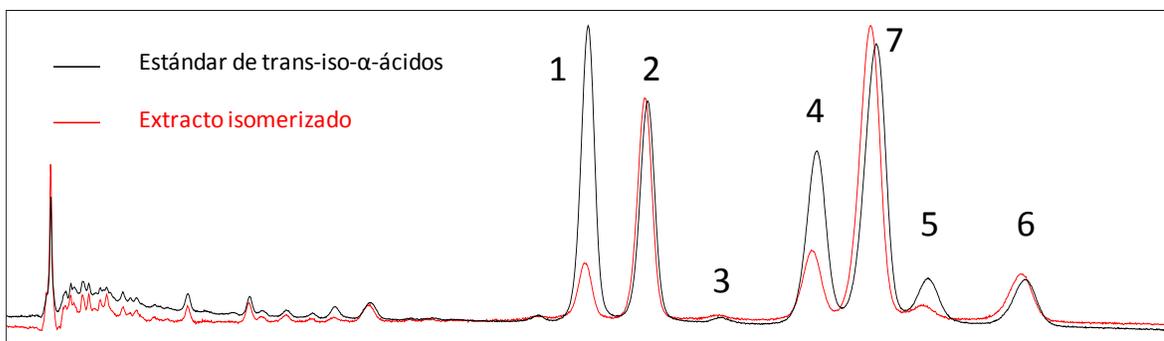


Figura 18. Enriquecimiento del extracto isomerizado con una solución estándar de *trans-iso-α-ácidos*. Extracto de 40 ppm de iso-alfa-ácidos con un spike de 25 ppm de *trans-iso-α-ácidos*. Picos: *trans-isocohumulona* (1), *trans-isohumulona* (4), *trans-isoadhumulona* (5).

En cuanto a la separación de los tetrahidro-iso- α -ácidos, uno de los tipos de iso- α -ácidos modificados estables a la luz, inicialmente se empleó el método EBC y para su identificación se utilizó un estándar comercial que contenía los isómeros *cis* y *trans* (Apéndice D.2). Sin embargo, no se pudo diferenciar cuales eran los isómeros *cis* y *trans* ya que en el reporte dado por el fabricante, los isómeros no se encuentran resueltos. Con este método no se separan todas las especies, tal como se observa en la Figura 19. Incluso al disminuir la fuerza del solvente reduciendo levemente el porcentaje de metanol, el tiempo de elución aumenta sin ningún cambio en la separación entre las especies (Figura 19-b).

Al igual que con los iso- α -ácidos se realizó un cambio en la selectividad del solvente para la separación de los tetrahidro-iso- α -ácidos, comenzando con $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}:\text{H}_3\text{PO}_4$ (64:36:0,3,v/v/v). Con esta proporción se obtuvo la separación de cinco compuestos (Figura 20). Dado que se esperaban seis especies mayoritarias, se disminuyó la fuerza del solvente y no se observó la presencia de otro tetrahidro-iso- α -ácido (Figura 20 b-c), por lo tanto se eligió la mezcla $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}:\text{H}_3\text{PO}_4$ (64:36:0,3,v/v/v) ya que proporcionó factores de capacidad ($9 < k' < 16$) y de selectividad ($1,08 < \alpha < 1,11$) apropiados. Por otro lado, se observó que un cambio en el porcentaje de ácido no altera ninguno de los parámetros cromatográficos, indicando que la separación de las especies tetra no depende del porcentaje de ácido en la fase móvil.

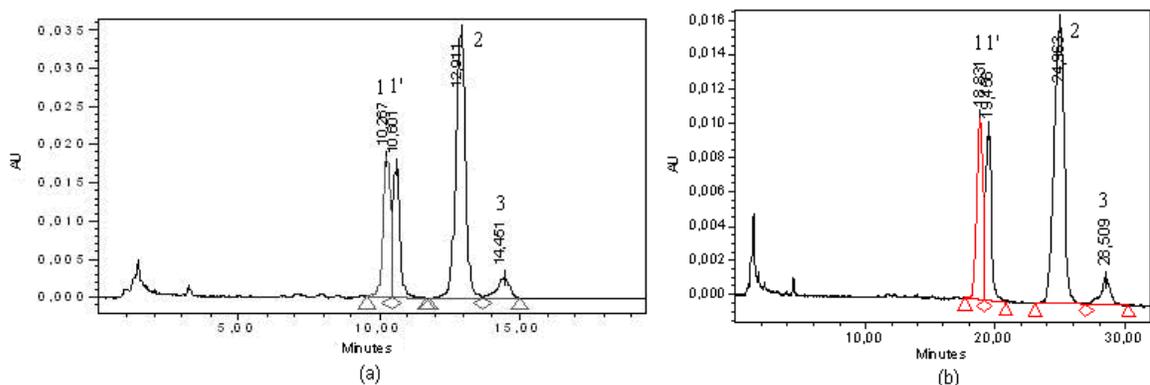


Figura 19. Separación de tetrahydro-iso- α -ácidos de un estándar comercial. Asignación de picos: tetrahydro-isocohumulona (1,1'), tetrahydro-isohumulona (2), tetrahydro-isoadhumulona (3). Condiciones del método aplicado: (a) CH₃OH:H₂O:H₃PO₄ (75:24:1, v/v/v), (b) CH₃OH:H₂O:H₃PO₄ (70:30:1,v/v/v), columna Atlantis dC18 150 x 4,6 mm x 5 μ m, T:35°C, flujo: 1,2 mL min⁻¹

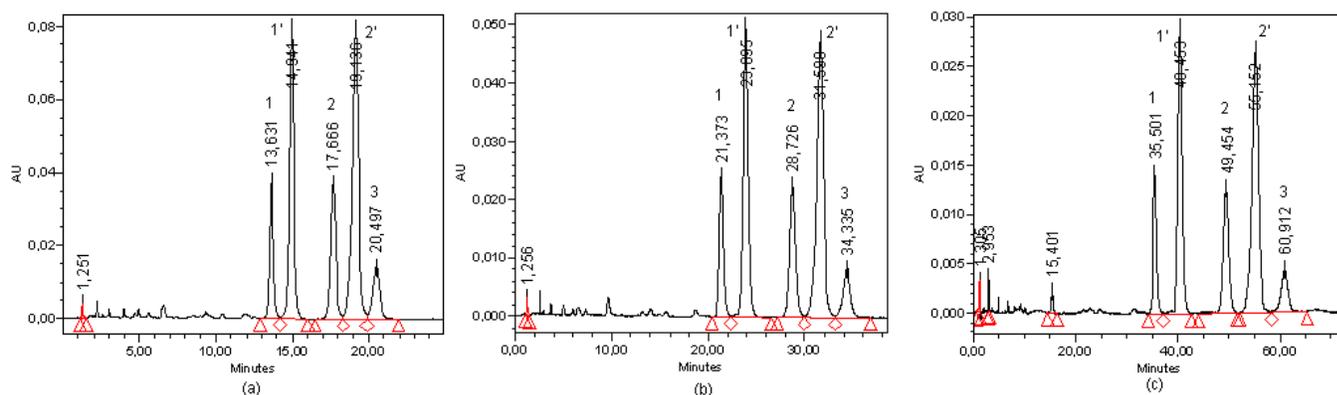


Figura 20. Separación de tetrahydro-iso- α -ácidos de un extracto de lúpulo empleando CH₃CN:H₂O:H₃PO₄ (64:36:0,3,v/v/v) (a), 55:45:0,3,v/v/v (b) y 50:50:0,3,v/v/v (c).Picos: tetrahydro-isocohumulona (1,1'), tetrahydro-isohumulona (2,2') y tetrahydro-isoadhumulona (3).

Otros de los iso- α -ácidos modificados lo constituyen los rho-iso- α -ácidos y los hexahidro-iso- α -ácidos. Los extractos de estas especies se caracterizan por ser mezclas más complejas que los otros extractos debido a que cada isómero *cis* y *trans* posee dos estereoisómeros, es decir, que se espera que tanto el extracto rho como el hexa posean 12 especies mayoritarias. En la optimización de la separación de rho-iso- α -ácidos se utilizó un estándar comercial de *cis*- ρ -iso- α -ácidos para identificar las especies *cis* de un extracto rho; para ello se empleó el método EBC 7.9 (Apéndice D.3). La separación de las especies *cis* usando el método anterior puede observarse en la Figura 21. Al disminuir la fuerza del solvente, reduciendo el porcentaje de metanol, se observó una mejora de la resolución cromatográfica (Figura 22).

En el cromatograma la forma del pico 2 indica que posiblemente esté coeluyendo alguna especie *cis*.

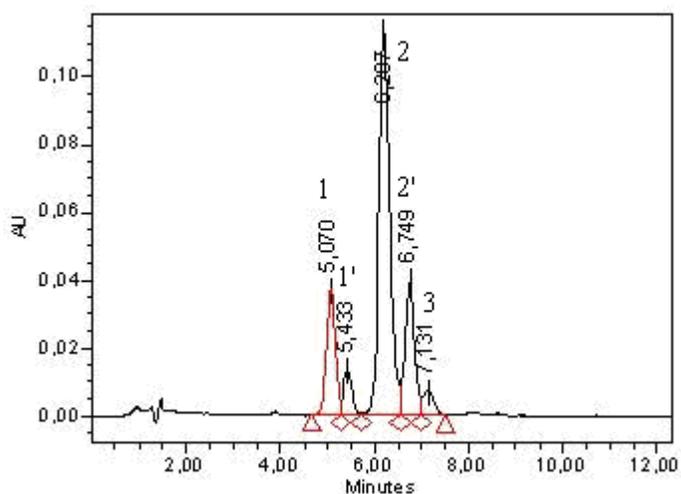


Figura 21. Separación de *cis-p-iso-α-ácidos* de un estándar comercial empleando $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}:\text{H}_3\text{PO}_4$ (75:24:1, v/v/v). Picos: *cis-p-isocohumulonas* (1,1'), *cis-p-isohumulonas* (2,2'), *cis-p-isoadhumulona* (3).

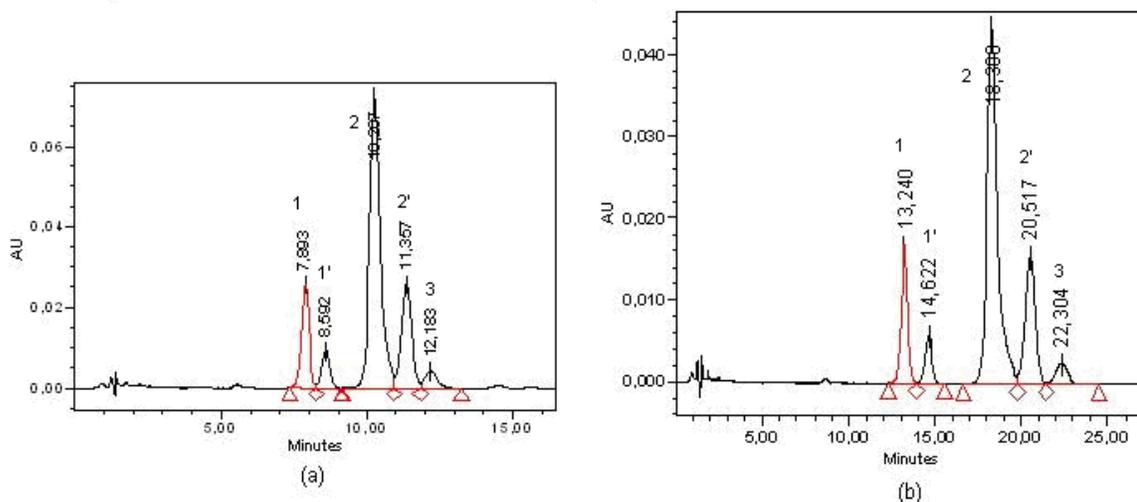


Figura 22. Disminución de la fuerza de solvente para la separación de *cis-p-iso-α-ácidos* con una proporción $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}:\text{H}_3\text{PO}_4$ (70:30:1, v/v/v) (a) y (65:35:1, v/v/v) (b)
Picos: *cis-p-isocohumulonas* (1,1'), *cis-p-isohumulonas* (2,2'), *cis-p-isoadhumulona* (3)

Al separar el extracto Rho bajo las mismas condiciones de la Figura 22-b se obtuvo el cromatograma de la Figura 23. Fue posible identificar las especies *cis*, y además se observaron otros compuestos; se presume que estos corresponden a los isómeros *trans*. Con esta proporción aún no se logró una resolución adecuada entre ciertos compuestos (2 y 4).

Un cambio en la selectividad del solvente con CH₃CN/H₂O no mejoró la resolución y el orden de elución de cada par de estereoisómeros se invirtió, es decir, sale primero 1' y luego 1 (datos no mostrados). Por lo tanto, se consideró la combinación de metanol, agua y ácido fosfórico para optimizar la separación de estas especies.

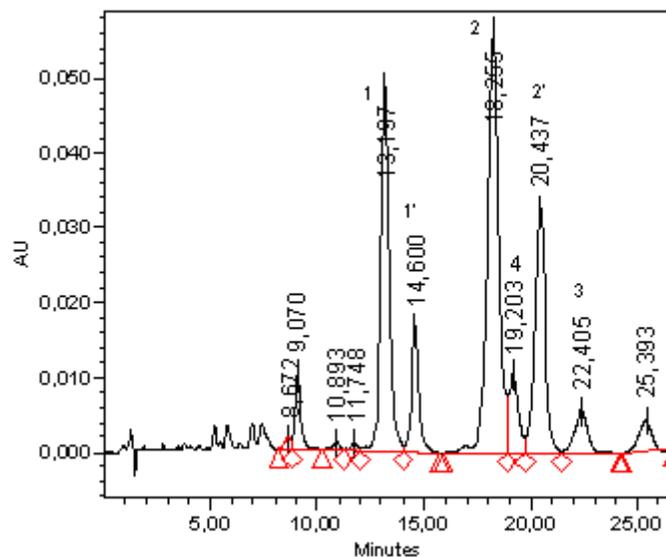


Figura 23. Separación de Rho-iso- α -ácidos de un extracto de lúpulo Rho con una proporción CH₃OH:H₂O:H₃PO₄ (65:35:1, v/v/v)
 Columna Atlantis dC18 150 x 4,6 mm x 5 μ m, T:35°C, flujo: 1,2 mL min⁻¹
 Picos: *cis*- ρ -isocohumulonas (1,1'), *cis*- ρ -isohumulonas (2,2'), *cis*- ρ -isoadhumulona (3)

En la búsqueda de mejorar la separación de los rho-iso- α -ácidos se evaluaron los cambios generados al disminuir el porcentaje de ácido fosfórico. Dicha disminución trajo consigo una reducción en el tiempo de elución, similar a lo observado con los iso- α -ácidos, es decir, disminuyó la afinidad de los compuestos por la fase estacionaria. Por lo tanto, tuvo lugar una pérdida de la resolución cromatográfica (datos no mostrados). Finalmente fue seleccionado 0,8 % de ácido fosfórico y fue disminuida la fuerza del solvente para mejorar la separación cromatográfica (Figura 24). Pequeñas variaciones en la proporción metanol/agua modifican significativamente el factor de capacidad y generan un cambio de resolución entre las especies 2 y 7, sin llegar a la resolución completa entre las mismas. Fue seleccionado finalmente la proporción CH₃OH:H₂O (65:35, v/v) porque generó una mejor resolución cromatográfica entre las especies.

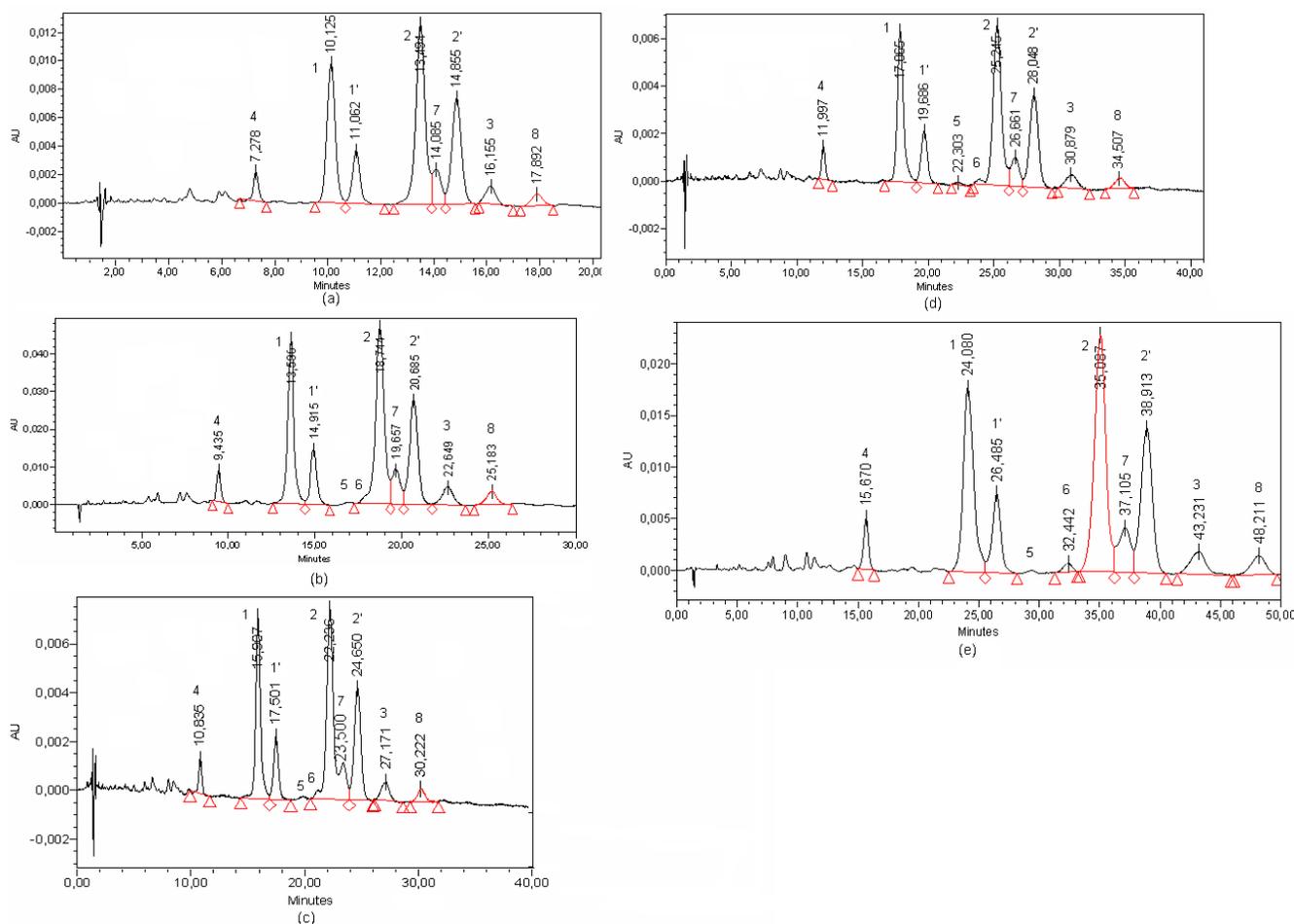


Figura 24. Disminución de la fuerza del solvente empleando 0,8 % en H_3PO_4 (a) $CH_3OH:H_2O$ (70:30, v/v), (b) (68:32, v/v), (c) (66:34, v/v), (d) (65:35, v/v), (e) (63:37, v/v). Picos: *cis*- ρ -isocohumulonas (1,1'), *cis*- ρ -isohumulonas (2,2'), *cis*- ρ -isoadhumulona (3)

Por último, fue optimizada la separación de los hexahidro-iso- α -ácidos, cuyo comportamiento fue muy similar a lo observado en los rho-iso- α -ácidos. Las especies *cis* se identificaron por medio del estándar comercial, el cual contenía solo estos isómeros (Figura 25, Apéndice D.4). Pudo notarse que debía mejorarse la resolución entre las especies *cis* y *trans*, por lo que fue considerado el cambio en el porcentaje de ácido fosfórico y de la fuerza del solvente, ya que al igual que en las especies rho, un cambio en la selectividad de la fase móvil no mejora la separación cromatográfica. Un cambio en el porcentaje de ácido fosfórico generó la separación mostrada en la Figura 26. La mejor separación fue lograda con un porcentaje de 0,8 % de H_3PO_4 . Tomando este porcentaje como punto de partida fue disminuida la fuerza del solvente, reduciendo el porcentaje de metanol y pudo observarse

que un pequeño cambio en el mismo modifica la separación de las especies 5-11 (Figura 27). La mejor separación fue lograda con el porcentaje: CH₃OH:H₂O:H₃PO₄ (76:24:0,8, v/v/v) (Figura 27-b).

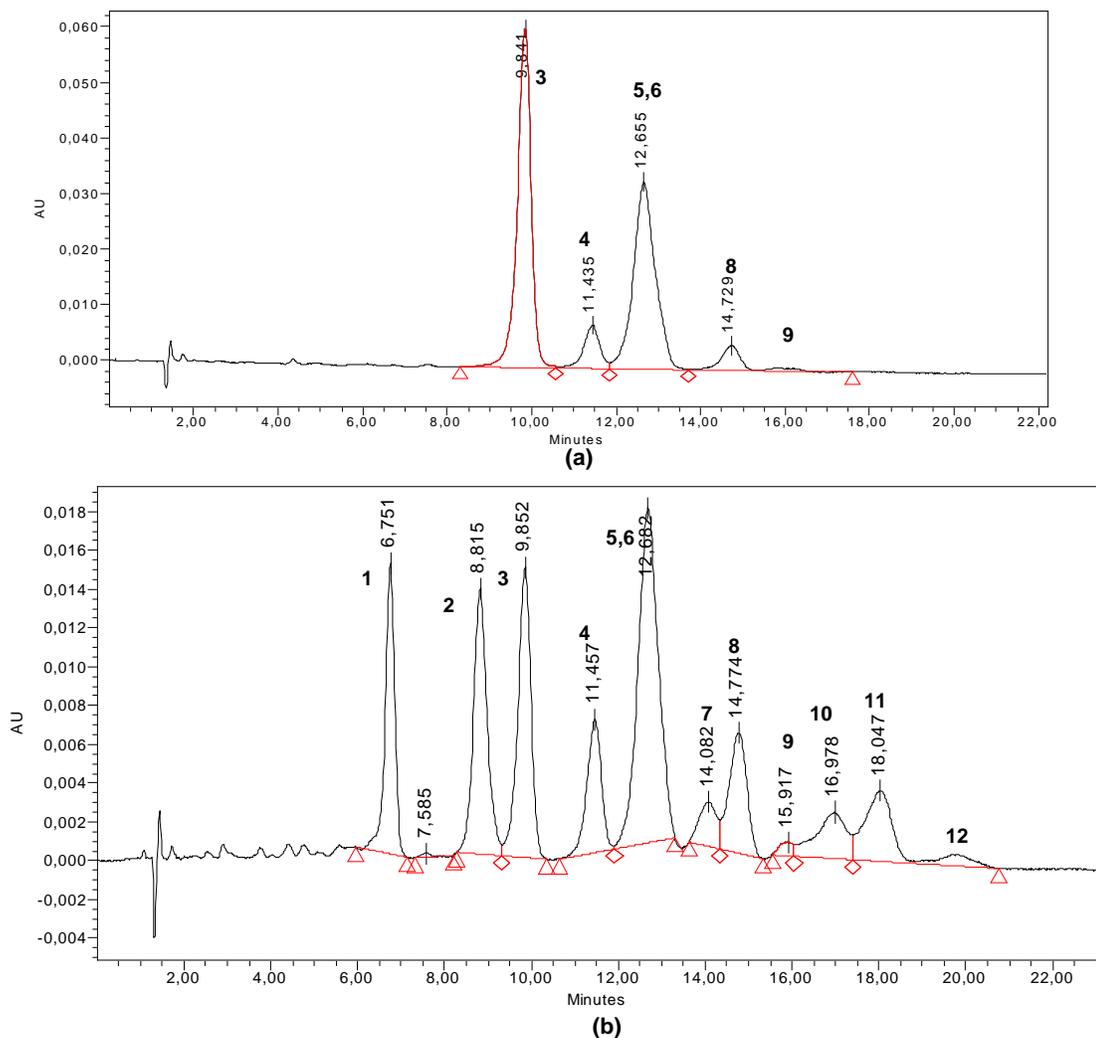


Figura 25. Separación de los hexahidro-iso- α -ácidos de un estándar comercial (a) y de un extracto de lúpulo hexa (b) empleando el método EBC 7.9: CH₃OH:H₂O:H₃PO₄ (74,5:24,5:1, v/v/v). Picos: (3) *cis*-hexahidroisocohumulona 1, (4) *cis*-hexahidroisocohumulona 2, (5,6) *cis*-hexahidroisohumulona (1+2), (8) *cis*-hexahidroisoadhumulona 1, (9) *cis*-hexahidroisoadhumulona 2.

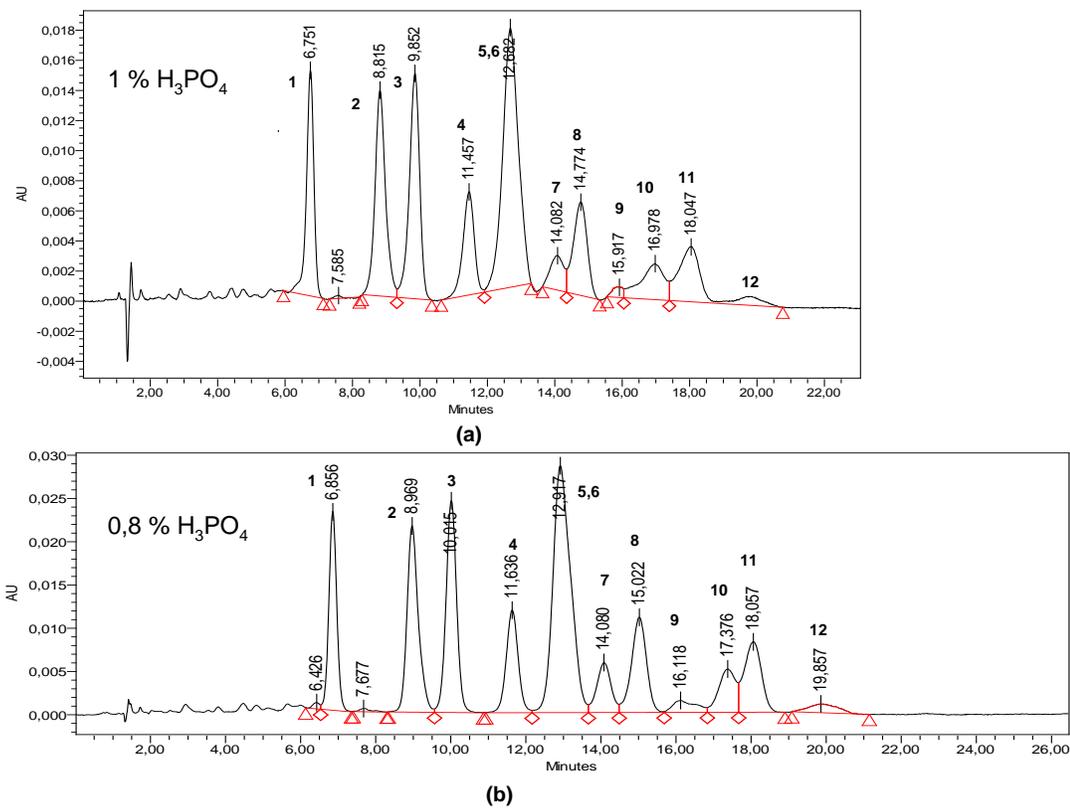


Figura 26. Efecto del ácido fosfórico en la separación de los hexahidro-iso- α -ácidos de un extracto de lúpulo hexa (a) CH₃OH:H₂O:H₃PO₄ (74,5:24,5:1, v/v/v) y (b) CH₃OH:H₂O:H₃PO₄ (74,5:24,5:0,8, v/v/v). Picos: (3) *cis*-hexahidroisocohumulona 1, (4) *cis*-hexahidroisocohumulona 2, (5,6) *cis*-hexahidroisohumulona (1+2), (8) *cis*-hexahidroisoadhumulona 1, (9) *cis*-hexahidroisoadhumulona.

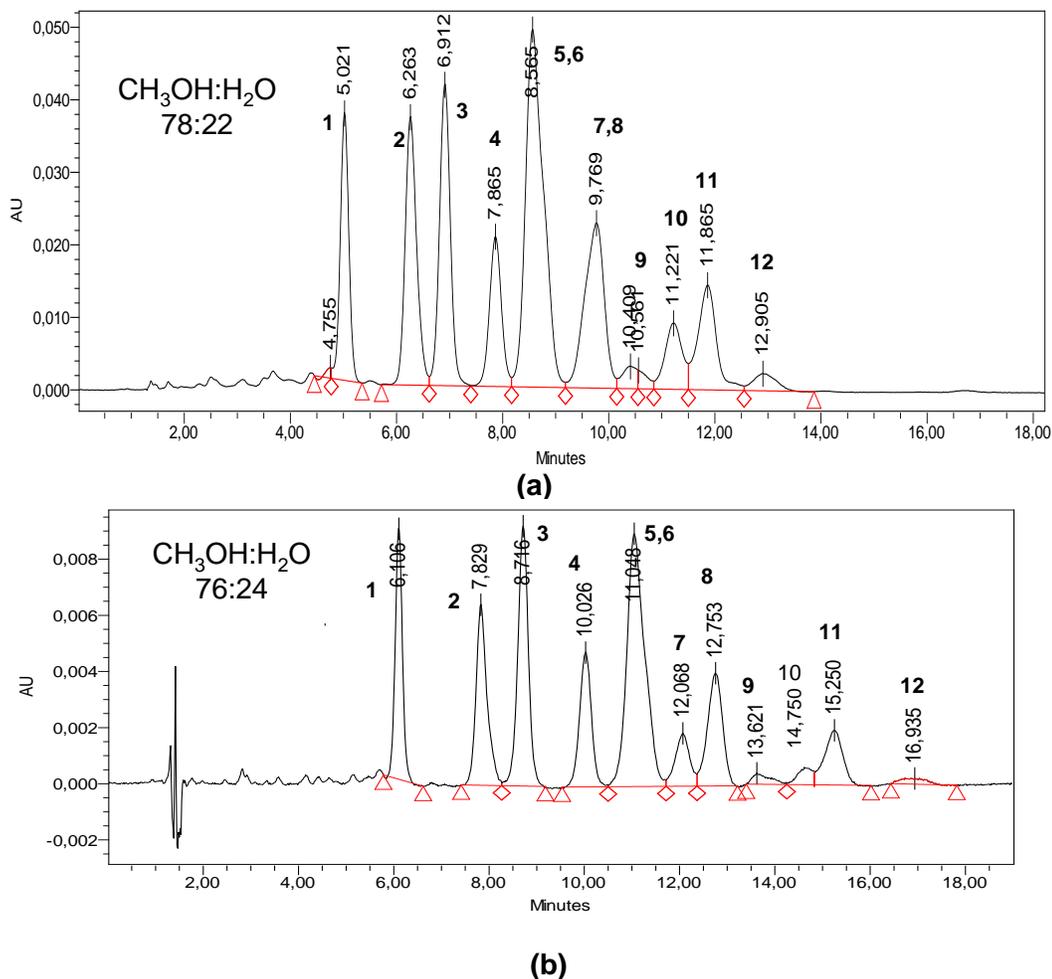


Figura 27. Disminución de la fuerza del solvente en la separación de hexahidro-iso- α -ácidos (a) $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}:\text{H}_3\text{PO}_4$ (78:22:0,8, v/v/v), (b) $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}:\text{H}_3\text{PO}_4$ (76:24:0,8, v/v/v), (c) $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}:\text{H}_3\text{PO}_4$ (74:26:0,8, v/v/v), (d) $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}:\text{H}_3\text{PO}_4$ (72:28:0,8, v/v/v). Picos: (3) *cis*-hexahidroisocohumulona 1, (4) *cis*-hexahidroisocohumulona 2, (5,6) *cis*-hexahidroisohumulona (1+2), (8) *cis*-hexahidroisoadhumulona 1, (9) *cis*-hexahidro-isoadhumulona.

6.2.1 Extracción de iso- α -ácidos y tetrahidro-iso- α -ácidos en cerveza por sorción con barras magnéticas agitadoras (SBSE)

Para la determinación de los iso- α -ácidos en cerveza fue necesaria la extracción de estos compuestos previo a la inyección en el sistema cromatográfico. Dado que las respuestas obtenidas utilizando 1 mL de cerveza fueron muy bajas fue necesario emplear un mayor volumen de cerveza. Se varió el volumen entre 1 y 20 mL de cerveza. Se observó un aumento en la cantidad de las especies extraídas, por lo que se eligió como volumen de muestra 20 mL de cerveza (Figura 28).

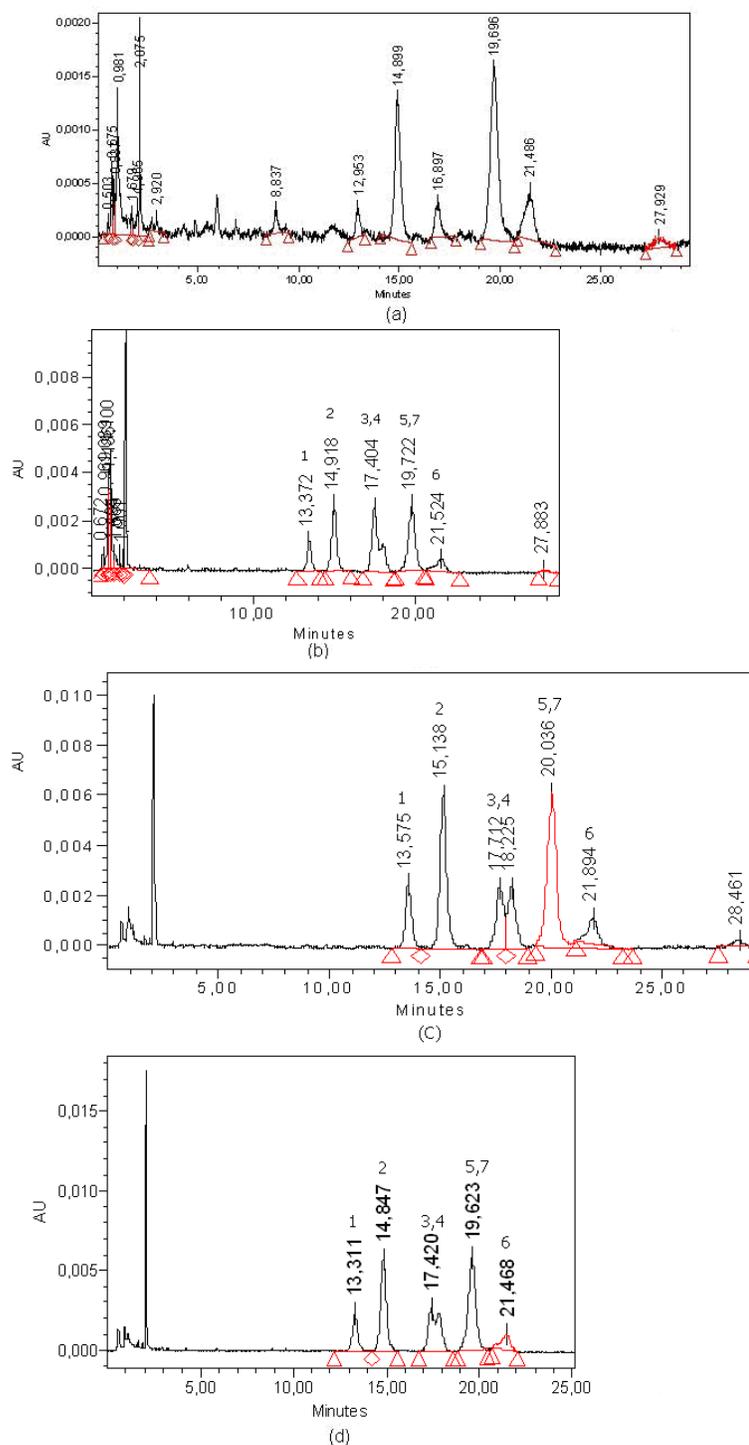


Figura 28. Extracción de iso- α -ácidos de la cerveza A mediante SBSE empleando diferentes volúmenes: 1 mL+100 μ L H_3PO_4 (a), 2 mL +200 μ L H_3PO_4 (b), 10 mL+1 mL H_3PO_4 (c) y 20 mL +2 mL H_3PO_4 (d)

Extracción: agitación por 30 min, desorción por 15 min con 2 mL de fase móvil. Inyección de 20 μ L del eluato. Separación: CH_3CN : H_2O : H_3PO_4 (55:45:0,3, v/v/v), T:35 $^{\circ}C$, flujo: 1,2 mL min^{-1}
 Picos: *trans*-isocohumulona (1), *trans*-isohumulona (4), *trans*-isoadhumulona (7).

Se estudiaron los efectos de dos factores sobre la eficiencia de la extracción: el tiempo y la velocidad de agitación. Se varió el tiempo en 5, 15 y 30 min a una velocidad de agitación fija. Este experimento se ejecutó a dos velocidades de agitación diferentes. Los resultados se muestran en la Figura 29. Se observa que la eficiencia de la extracción de las especies aumenta significativamente con el tiempo, mientras que la agitación también tiene un efecto positivo pero en menor grado que el tiempo de extracción. Una velocidad de agitación de 1000 rpm y un tiempo de extracción de 30 minutos fueron elegidos para llevar a cabo la extracción.

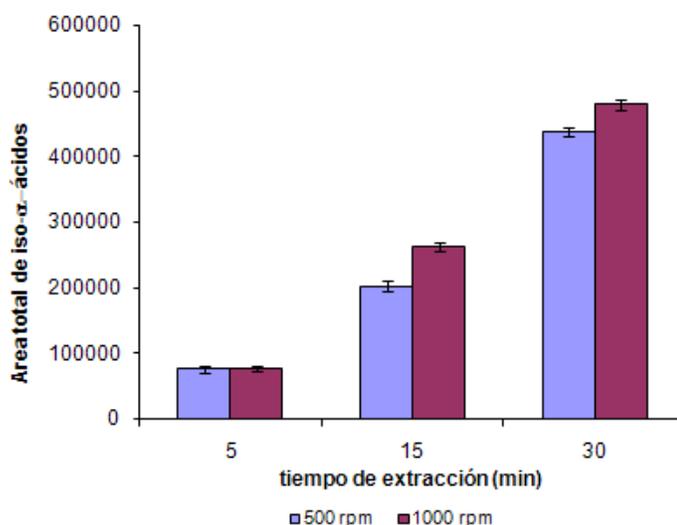


Figura 29. Efecto del tiempo de extracción y la velocidad de agitación en la extracción de iso- α -ácidos de la cerveza A por sorción con barras agitadoras. Desorción líquida por 15 min con 2 mL de fase móvil (500 rpm). Inyección de 20 μ L del eluato.

El cromatograma correspondiente a la separación de los iso- α -ácidos de la cerveza A empleando la proporción optimizada: $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_3\text{PO}_4$ (45:46:9:0,08, v/v/v/v) se muestra en la Figura 30.

También se probó la eficacia de la desorción, agitando por segunda vez la misma barra con la mezcla desorbente. El resultado indicó una muy buena eficacia de la desorción, aproximadamente 96 %. Este valor fue calculado por medio de las áreas obtenidas en la primera y segunda desorción (datos no mostrados).

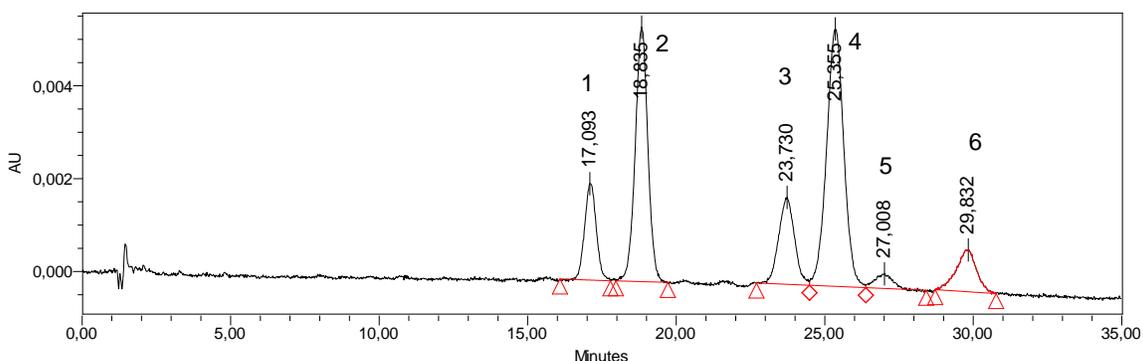


Figura 30. Separación de iso- α -ácidos de la cerveza A. Extracción por SBSE: agitación por 30 min, desorción por 15 min con 2 mL de fase móvil. Inyección de 20 μ L del eluato. Separación: CH₃CN:H₂O:CH₃OH:H₃PO₄ (45:46:9:0,08, v/v/v/v), T:35°C, flujo: 1,2 mL min⁻¹. Picos: *trans*-isocohumulona (1), *trans*-isohumulona (3), *trans*-isoadhumulona (5)

En cuanto a la extracción de los tetrahidro-iso- α -ácidos se partió del mismo volumen seleccionado con los iso- α -ácidos y se observó el efecto del tiempo y de la velocidad de agitación (Figura 31). El comportamiento fue muy similar a lo observado con los iso- α -ácidos, sólo que para los 30 minutos la diferencia entre una velocidad de agitación y otra es muy marcada. Se seleccionó una velocidad de agitación de 1000 rpm y un tiempo de 30 minutos para realizar la extracción de tetrahidro-iso- α -ácidos en la cerveza B, ya que permitió extraer la mayor cantidad de tetrahidro-iso- α -ácidos en el rango estudiado.

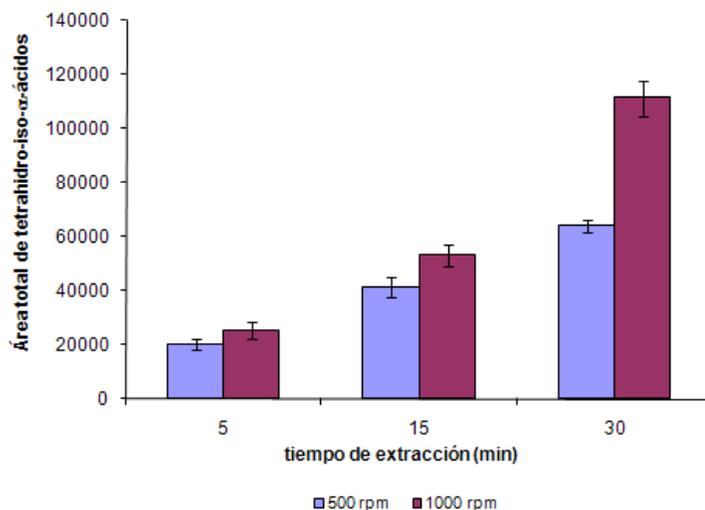
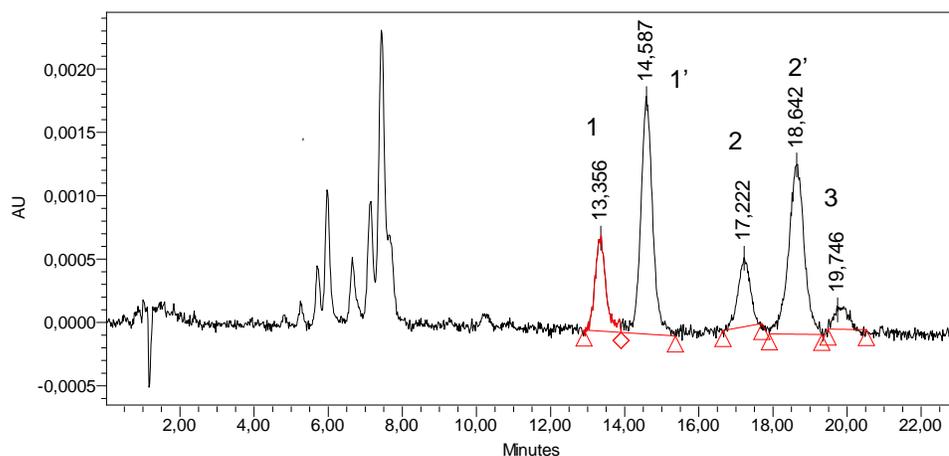
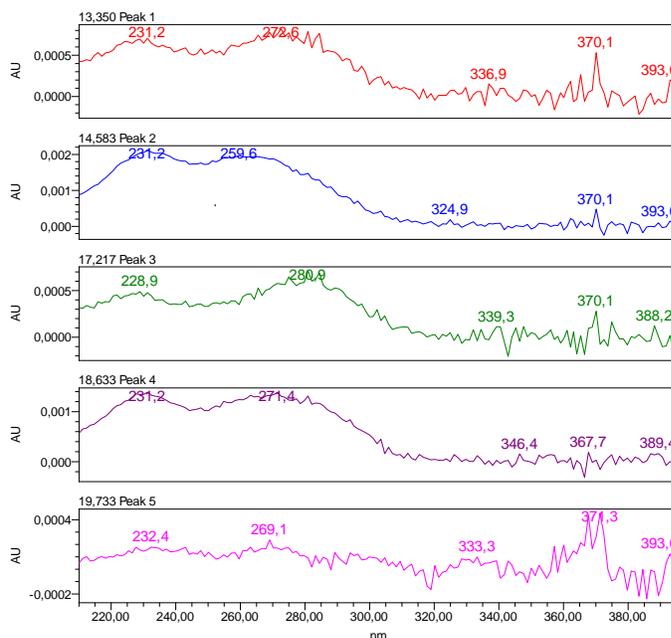


Figura 31. Efecto del tiempo de extracción y la velocidad de agitación en la extracción de tetrahidro-iso- α -ácidos de la cerveza B por sorción con barras agitadoras. Desorción líquida por 15 min con 2 mL de fase móvil (500 rpm). Inyección de 20 μ L del eluato.

La separación cromatográfica de las especies tetra de la cerveza se muestra en la Figura 32. Otras especies son observadas en los primeros minutos de la corrida, se presume que se trata de los rho-iso- α -ácidos, los cuales proceden de las otras especies de lúpulo que contiene este tipo de cerveza. Sin embargo, el enfoque estuvo en los tetrahydro-iso- α -ácidos presentes en este tipo de cerveza.



(a)



(b)

Figura 32. Separación de tetrahydro-iso- α -ácidos de la cerveza B con 64% CH_3CN /36% H_2O /0,3% H_3PO_4 (a) y espectros UV de estas especies (b). Extracción por SBSE: agitación por 30 min, desorción por 15 min con 2 mL de fase móvil. Inyección de 20 μL del eluato. Picos: tetrahydro-isocohumulona (1,1'), tetrahydro-isohumulona (2,2') y tetrahydro-isoadhumulona (3).

6.3 Seguimiento de la formación de los aldehídos de Strecker y de la degradación de ácidos amargos en sistemas modelo y cervezas

6.3.1 Formación de aldehídos de Strecker en sistemas modelo

El seguimiento de la formación de los aldehídos de Strecker fue realizado con la finalidad de determinar si la degradación de los ácidos amargos y/o su reacción con aminoácidos pueden conducir a la formación de estos aldehídos durante el almacenamiento. Los aldehídos de Strecker fueron determinados empleando el método desarrollado en la sección 6.1, haciendo uso del impacto de electrones como fuente de ionización. Este método fue publicado y se encuentra anexo en la parte final de esta tesis. El seguimiento de la formación de los aldehídos en los diferentes sistemas modelo se realizó por tiempo prolongado (160 días). Se estudiaron dos temperaturas de almacenamiento, 28 °C y 38 °C, con la finalidad de evaluar la dependencia de las velocidades de formación de los aldehídos con este parámetro.

En la Figura 33 se observa la formación del 2-metil-butanal en los cuatro sistemas de extractos de lúpulos considerados (iso, tetra, rho y hexa), sometidos a las tres condiciones de reacción: 1) extractos de lúpulo solos, 2) extractos de lúpulo más aminoácidos y 3) solución de aminoácidos. Los sistemas de reacción 1 y 3 permiten evaluar la formación de los aldehídos de Strecker a través de la degradación de los ácidos amargos del lúpulo o de la oxidación de los aminoácidos, mientras que el sistema 2 permite conocer la formación de los aldehídos provenientes de la reacción entre aminoácidos y ácidos amargos. Es importante indicar que los sistemas de reacción 2 contienen todos los aminoácidos.

En el panel A de la Figura 33, sistema iso, se puede observar un incremento de 5 veces en la formación de 2-metil-butanal en presencia de lúpulo y aminoácidos (línea fucsia) a 38 °C, en comparación con la solución de aminoácidos solos y de extracto solo. Esto indica que ambos sustratos, aminoácidos e iso- α -ácidos, están participando en la generación de dicho aldehído. En el caso del sistema tetra (panel B), la velocidad de formación del 2-metil-butanal en la solución de aminoácidos y tetrahidro-iso- α -ácidos fue 3 veces menor que en el sistema iso, pero se mantuvo la tendencia de una mayor velocidad de formación en presencia de ambos sustratos. Por otro lado, los sistemas rho y hexa (paneles C y D)

mostraron un comportamiento muy diferente, ya que una relativa alta concentración inicial de 2-metil-butanal estaba presente en ambos sistemas, tanto en el caso de las soluciones de extractos solos (línea azul) como las soluciones de aminoácidos y extractos de lúpulo (línea fucsia). Esto sugiere que la formación del 2-metil-butanal pudo provenir principalmente de una degradación de las especies ácidas del lúpulo aún antes del inicio de la prueba, probablemente durante el almacenamiento del extracto de lúpulo. Las concentraciones de 2-metil-butanal en los sistemas rho y hexa fueron de 2-10 veces mayores que en los otros sistemas.

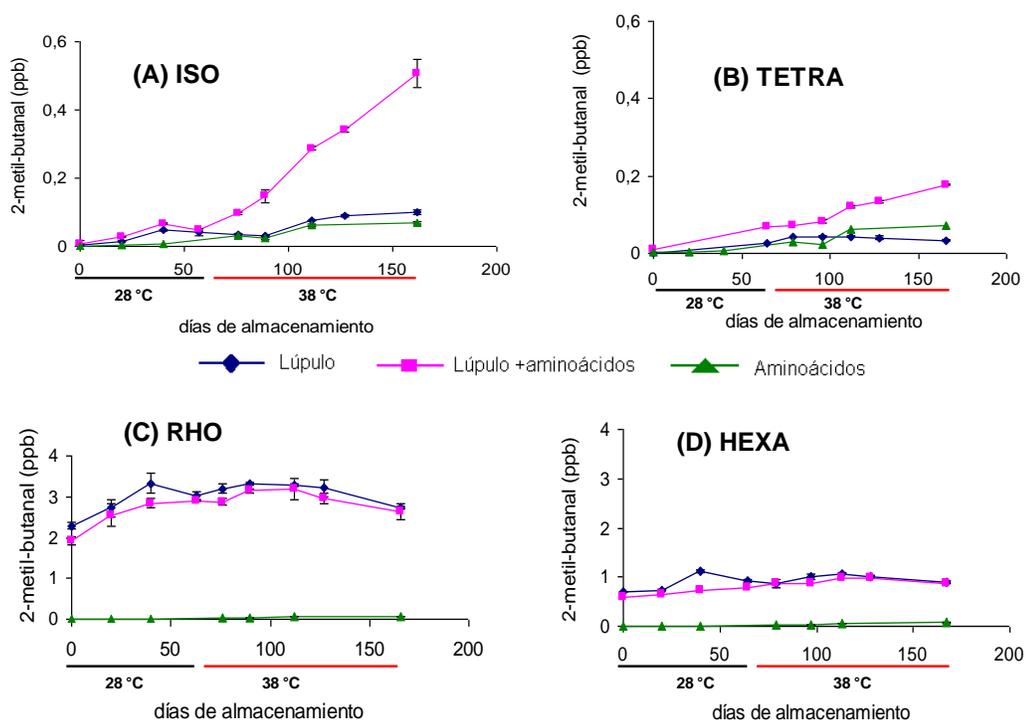


Figura 33. Formación de 2-metil-butanal en sistemas modelo. Panel A: iso- α -ácidos; panel B: tetrahidro-iso- α -ácidos; panel C: rho-iso- α -ácidos; panel D: hexahidro-iso- α -ácidos

En cuanto a la formación de 3-metil-butanal (Figura 34) se observó para los sistemas iso y tetra (paneles A y B) que a 38 °C la velocidad de formación del analito aumentó en presencia de aminoácidos y lúpulo, comportamiento similar al observado para el 2-metil-butanal, aunque las concentraciones del 3-metil-butanal fueron muy superiores a las del 2-metil-butanal. Resalta la formación de 3-metil-butanal en el sistema tetra (línea fucsia), en el cual se formaron casi 8 ppb después de 160 días de almacenamiento. En este sistema también se observó cierta formación de 3-metil-butanal en la solución del extracto solo. En

el sistema rho (panel C) se observó igualmente la formación de 3-metil-butanal tanto en la solución de extracto solo como en presencia de aminoácidos, siendo ligeramente superior en este último caso. El sistema hexa (panel D) generó una cantidad de 3-metil-butanal comparable al sistema tetra, pero a diferencia de éste, se puede observar que la principal reacción que tiene lugar es la degradación de los hexahidro-iso- α -ácidos (línea azul).

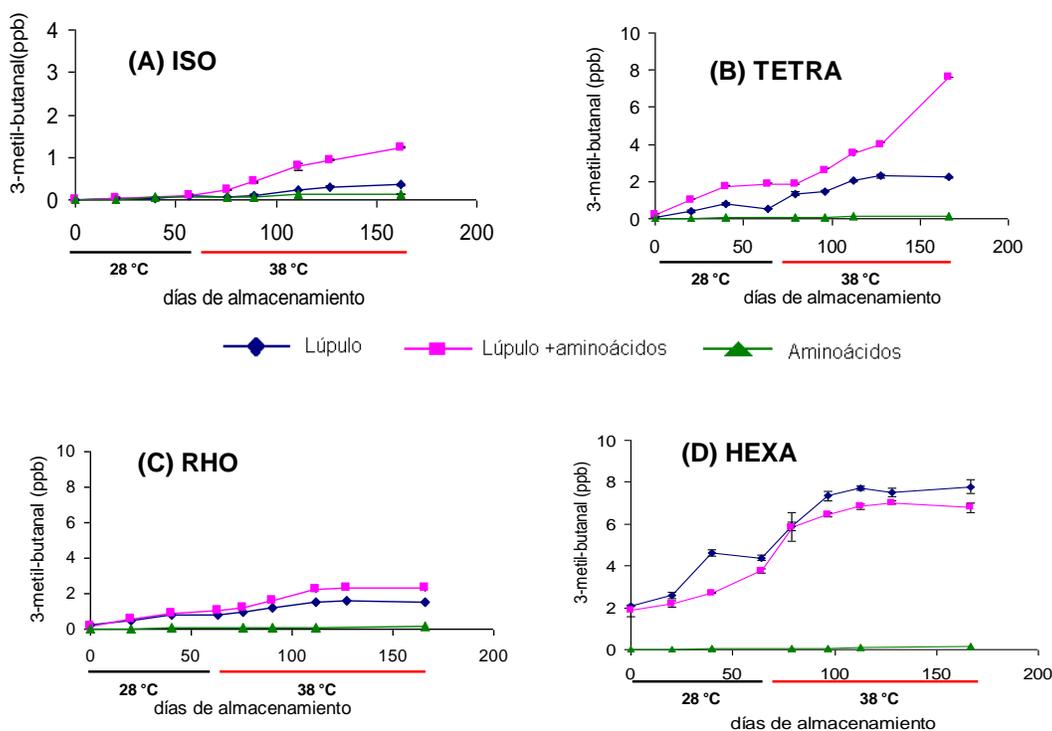


Figura 34. Formación de 3-metil-butanal en sistemas modelo. Panel A: iso- α -ácidos; panel B: tetrahidro-iso- α -ácidos; panel C: rho-iso- α -ácidos; panel D: hexahidro-iso- α -ácidos

La formación de los dos analitos anteriores permitió identificar que dos rutas de formación de los aldehídos parecen tener lugar en los sistemas de reacción: una que involucra la participación de dos sustratos (aminoácidos y ácidos del lúpulo) y otra que implica la degradación de los ácidos del lúpulo. En aquellos casos en donde la degradación de los ácidos es importante, no es posible identificar claramente si la otra ruta está ocurriendo, ya que el producto de ambas reacciones es el mismo. El empleo de un aminoácido deuterado permite conocer con certeza, si la reacción entre el aminoácido y los diversos tipos de iso- α -ácidos tiene lugar, al generarse el correspondiente aldehído deuterado. Con esta finalidad, en esta investigación se utilizó valina deuterada (valina *d*-8) en lugar de valina, lo que permite identificar la ruta que involucra la reacción de los dos sustratos, a través de la

detección de la formación de 2-metil-propanal-*d*-8 durante el almacenamiento. La ruta de la degradación del ácido amargo se detecta en el mismo sistema a través de la formación de 2-metil-propanal.

El 2-metil-propanal-*d*-8 fue identificado por la aparición del pico con ión molecular *m/z* 275, cercano al pico del 2-metil-propanal y con 8 uma más que el ión molecular de la oxima del 2-metil-propanal. Para confirmar esto se comparó el cromatograma de un sistema con lúpulo y valina con el de lúpulo y valina *d*-8. En el primero no se detectó la presencia del aldehído deuterado. El seguimiento en la formación del 2-metil-propanal-*d*-8 se muestra en la Figura 35 (paneles A-D). La respuesta está expresada en áreas relativas, es decir, el área de la oxima del aldehído deuterado respecto al área de la oxima del estándar interno (3-metil-2-butenal). No fue posible realizar una curva de calibración por no disponer del respectivo aldehído deuterado. El seguimiento del 2-metil-propanal-*d*-8 reveló que la reacción entre aminoácidos y ácidos del lúpulo ocurre en los 4 extractos. Los sistemas que más generaron la especie deuterada fueron el rho y el iso, siendo su formación muy significativa en el sistema rho tanto a 28 como a 38 °C.

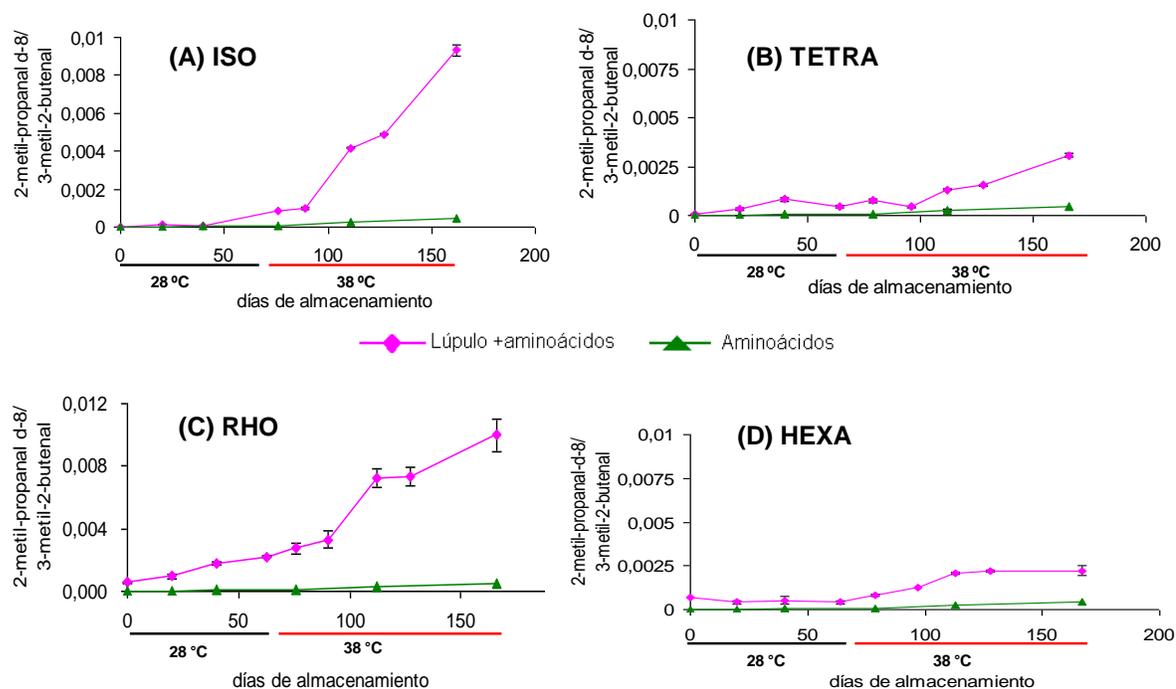


Figura 35. Formación de 2-metil-propanal *d*-8 en sistemas modelo. Panel A: iso- α -ácidos; panel B: tetrahidro-iso- α -ácidos; panel C: rho-iso- α -ácidos; panel D: hexahidro-iso- α -ácidos

Como se explicó, también se realizó el seguimiento de la formación del 2-metil-propanal (Figura 36). Se debe mencionar que la interpretación de este gráfico debe realizarse de una manera diferente respecto a los demás, ya que en este caso los sistemas estudiados no contenían valina, la cual es el aminoácido precursor del 2-metil-propanal. Puede visualizarse en el panel A, que los iso- α -ácidos se degradan generando el 2-metil-propanal hasta 20 ppb (línea azul). También pudo notarse que en los sistemas de lúpulo y aminoácidos (línea fucsia), la formación del 2-metil-propanal es inhibida, probablemente como consecuencia de la ocurrencia de otras reacciones en las cuales participan los ácidos derivados del lúpulo con los diversos aminoácidos. En cuanto al sistema tetra, éste prácticamente no generó 2-metil-propanal. Por otro lado, los rho-iso- α -ácidos y hexahidro-iso- α -ácidos (paneles C y D) se degradaron para generar este aldehído, con la diferencia de que una concentración del aldehído estaba presente en el punto inicial del seguimiento y se incrementó levemente durante el almacenamiento. En estos dos casos, las líneas del extracto solo y del extracto en presencia de aminoácidos se superponen.

De manera general, se concluye que los aldehídos: 2-metil-propanal, 2-metil-butanal y 3-metil-butanal, pueden generarse a través de la degradación de los diferentes iso- α -ácidos o de reacciones en las que participan los aminoácidos e iso- α -ácidos. La degradación de los iso- α -ácidos ha sido reportada en diversos estudios [14,38,39]. Sin embargo, aun hoy se desconocen los mecanismos de degradación que tienen lugar. Se ha propuesto que pueden ocurrir reacciones en las que participan radicales libres [8], degradación del grupo carbonilo o de la insaturación de la cadena isohexenoil (cadena lateral a (C)4 de la molécula) [14] y deacilación de la cadena lateral a (C)2 [50], ver Figura 37. Para este último caso, estos autores sugirieron la formación de los tres aldehídos mencionados arriba y lo consideran como marcadores importantes en la degradación de los iso- α -ácidos (Figura 38).

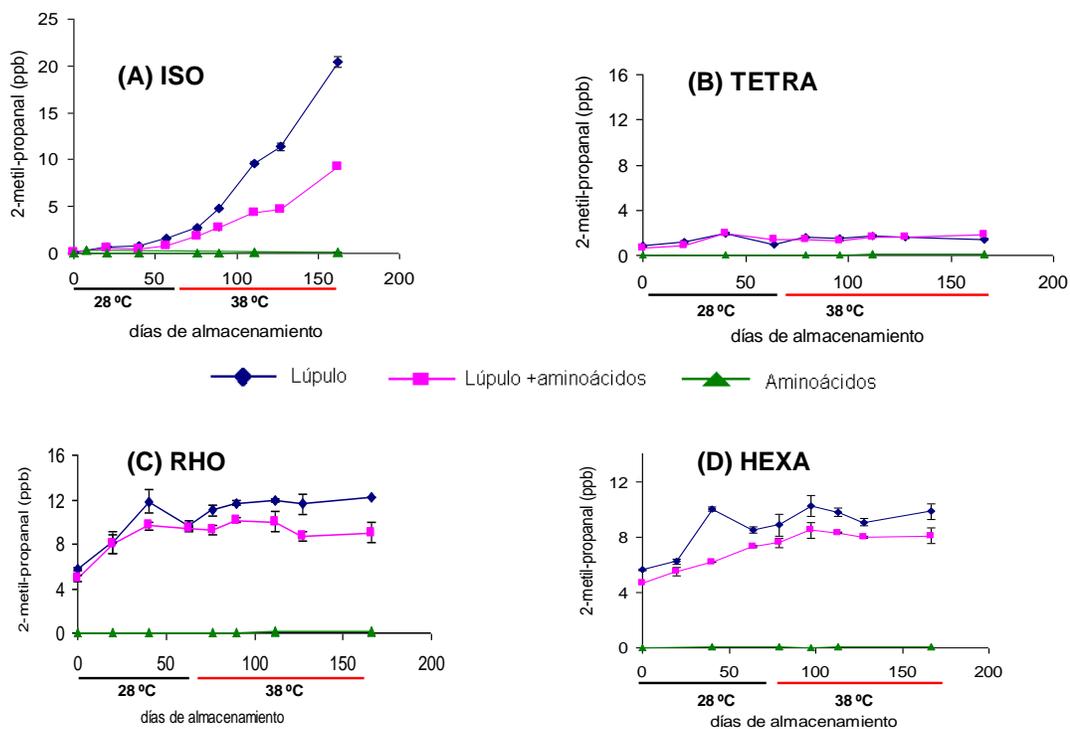


Figura 36. Formación de 2-metil-propanal en sistemas modelo. Panel A: iso- α -ácidos; panel B: tetrahidro-iso- α -ácidos; panel C: rho-iso- α -ácidos; panel D: hexahidro-iso- α -ácidos

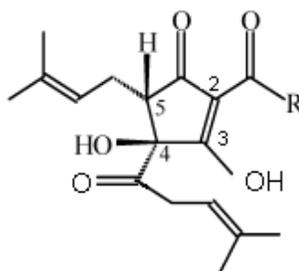


Figura 37. Estructura de los *trans*-iso-alfa ácidos

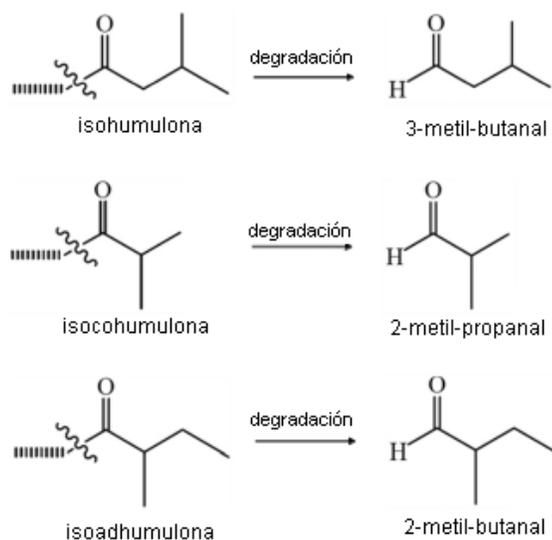


Figura 38. Ruta hipotética de la formación de aldehídos a partir de isohumulonas [50]

En el caso de los otros aldehídos de Strecker, metional y fenilacetaldehído, estos son claves para estudiar la reacción entre aminoácidos y lúpulo, ya que no pueden formarse a través de la degradación de los ácidos del lúpulo. En las Figuras 39 y 40 puede observarse la formación de estos analitos durante el almacenamiento. Tanto el metional como el fenilacetaldehído se incrementaron de manera significativa a 38 °C en presencia de aminoácidos y lúpulo (línea fucsia). Los extractos que generaron más fenilacetaldehído fueron el iso y el rho (paneles A y C, Figura 40), mientras que los que generaron más metional fueron el rho y el hexa (paneles C y D, Figura 39), donde la formación en rho es más del doble de la de hexa. Adicionalmente, se observó que el sistema de aminoácidos generó metional, probablemente debido a la oxidación de la metionina, en cantidades comparables para los cuatro sistemas (ver línea verde, Figura 39).

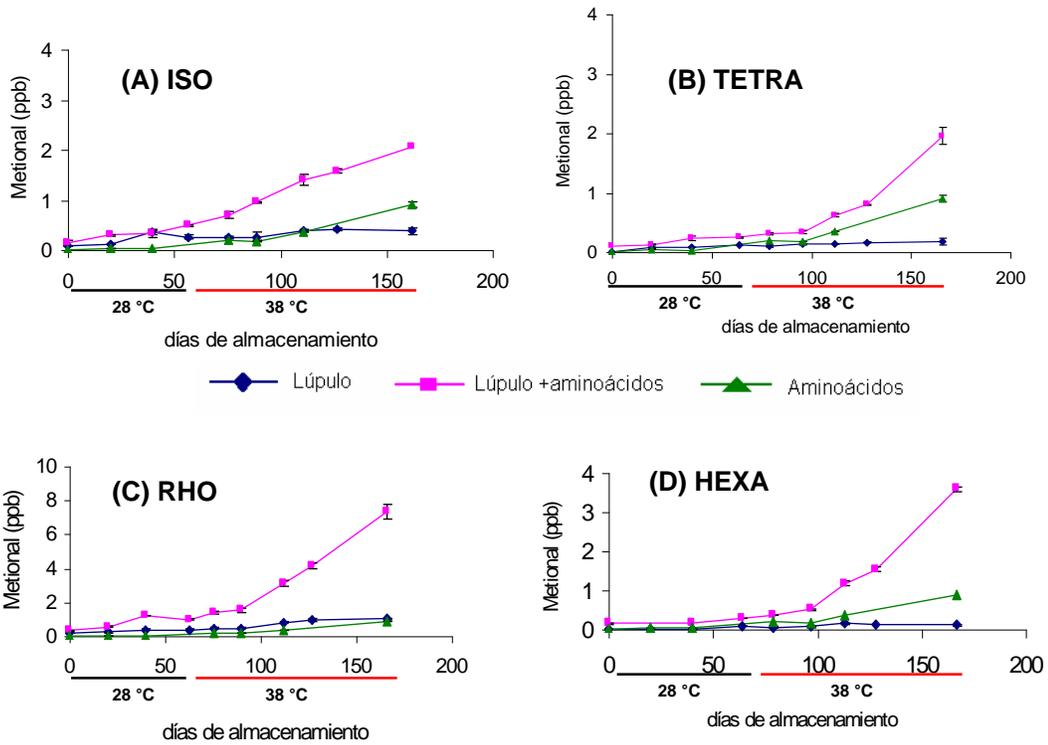


Figura 39. Formación de metional en sistemas modelo. Panel A: iso- α -ácidos; panel B: tetrahydro-iso- α -ácidos; panel C: rho-iso- α -ácidos; panel D: hexahidro-iso- α -ácidos

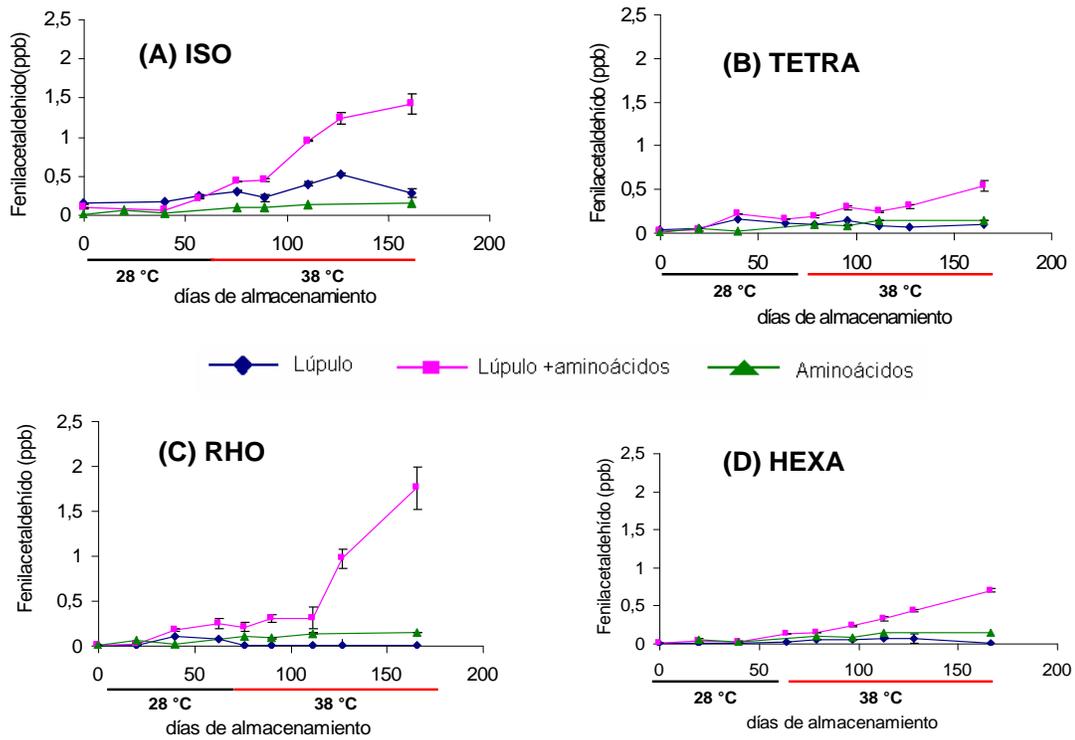


Figura 40. Formación de fenilacetaldehído en sistemas modelo. Panel A: iso- α -ácidos; panel B: tetrahydro-iso- α -ácidos; panel C: rho-iso- α -ácidos; panel D: hexahidro-iso- α -ácidos

El seguimiento de la formación de valina *d*-8, metional y fenilacetaldehído permitió conocer que la reacción entre aminoácidos y los diferentes ácidos del lúpulo tiene lugar a las concentraciones y condiciones estudiadas, las cuales simulan las condiciones de almacenamiento de la cerveza. Esta reacción se podría denominar reacción “*tipo-Strecker*”, ya que se piensa que ocurre una degradación similar a la de Strecker (Figura 1). En la reacción “*tipo-Strecker*” se presume que una especie dicarbonílica sería generada por el rearrreglo de la molécula de iso- α -ácido (Figura 41). Dicha especie actuaría como la especie oxidante que descarboxila al aminoácido correspondiente. Esta reacción también conduciría a la generación de los aldehídos 2-metil-propanal, 2-metil-butanal y 3-metil-butanal. Esta hipótesis es consistente con la observación de algunos investigadores [50] quienes reportaron que la formación de estos tres analitos vía degradación oxidativa de la isohumulona es una reacción menor y que otras reacciones deben tener lugar en la formación de estos aldehídos. Efectivamente, dentro de un sistema complejo como el de la cerveza muchas reacciones tienen lugar. El estudio en sistemas modelos es clave para conocer la participación de diversos substratos en una ruta desconocida.

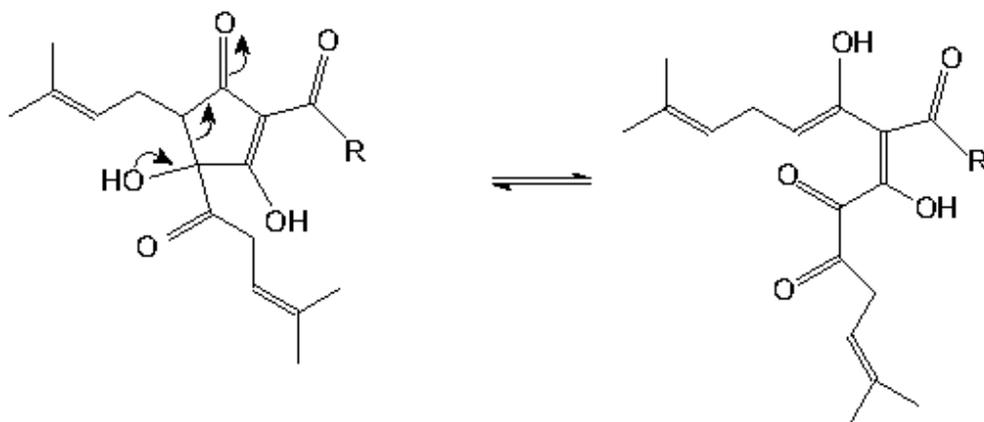


Figura 41. Rearreglo hipotético de la molécula de iso- α -ácido

Se calculó la concentración total de aldehídos de Strecker generada en cada sistema modelo (lúpulo + aminoácidos) al final del seguimiento. Este valor indica el potencial que tiene el extracto de lúpulo de formar aldehídos de Strecker. El orden de magnitud para los cuatro sistemas fue similar, aunque el extracto que generó la concentración más alta de aldehídos de Strecker fue el rho (Tabla 16), indicando que este extracto es el que posee la mayor

susceptibilidad al deterioro durante el almacenamiento. Esto quiere decir que en cervezas preparadas con la misma materia (cebada malteada y adjuntos) y una dosificación equivalente de extracto de ácidos amargos, se espera un mayor deterioro sensorial en la cerveza preparada con el extracto rho. Por otro lado, el extracto que generó menos aldehídos de Strecker fue el tetra, indicando una menor susceptibilidad a la degradación, lo que sugiere que un producto preparado con este tipo de lúpulo podría ser más estable sensorialmente.

Tabla 16. Concentración de aldehídos generados al final del seguimiento de los sistemas modelo

Extracto	Concentración _{total} ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Iso	$14,4 \pm 0,5$
Tetra	$12,1 \pm 0,3$
Rho	$23,0 \pm 2$
Hexa	$20,0 \pm 1$

0,1 mM de cada tipo de iso- α -ácido

6.3.2 Degradación de los ácidos derivados del lúpulo durante el almacenamiento

Este estudio tuvo como finalidad conocer cuales especies se degradaban más rápidamente y cual extracto poseía mayor estabilidad química. De esta manera se puede correlacionar la estabilidad del extracto con la generación de los aldehídos de Strecker. Para poder estudiar la degradación de los ácidos derivados del lúpulo se realizó un seguimiento en el tiempo de la respuesta de cada tipo de ácido. Esto fue realizado de esta manera por no contar con los ácidos puros que permitiera preparar las respectivas curvas de calibración. Sin embargo, se ha indicado que en cada grupo de iso- α -ácidos (modificados y no modificados) el cromóforo es el mismo y que además cada especie posee coeficientes de extinción molar muy similares a 270 nm, por lo que las respuestas de estas especies al detector son muy similares [33,51]. Esto permite asegurar que cuando dos especies tienen comportamientos diferentes, esto se puede atribuir a una degradación distinta de la molécula durante el almacenamiento.

Fueron graficadas solo las respuestas de aquellos isómeros que pudieron identificarse en cada extracto. En la Figura 42 se observa la degradación de los *trans*-iso- α -ácidos durante el almacenamiento, en la cual puede notarse que la *trans*-isohumulona es la especie más

reactiva. El área de las señales de todos los iso- α -ácidos decrece con el tiempo, con los cambios más importantes observados a 38°C para la isohumulona. Al final de los 160 días de almacenamiento a 38 °C quedan niveles casi despreciables de los trans-iso- α -ácidos. No se observan diferencias en la velocidad de degradación en ausencia o presencia de aminoácidos.

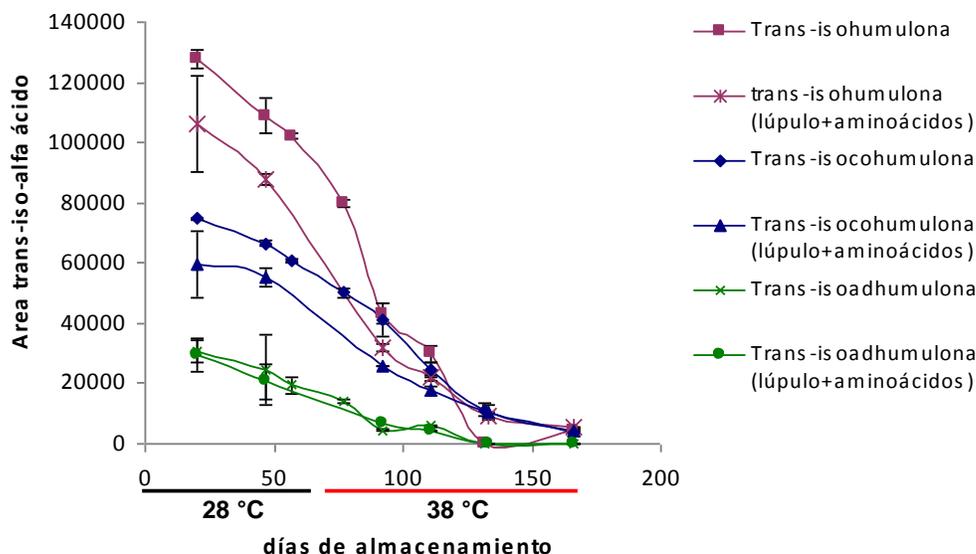
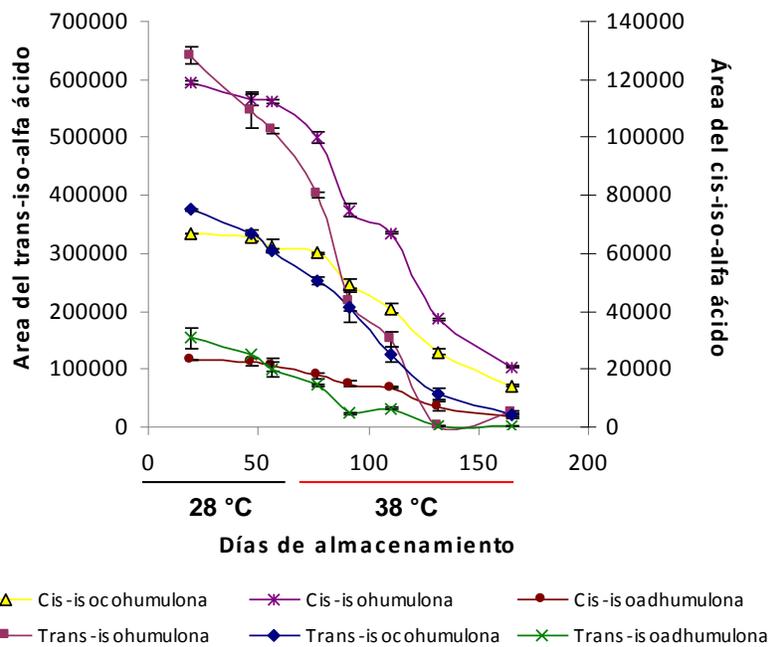
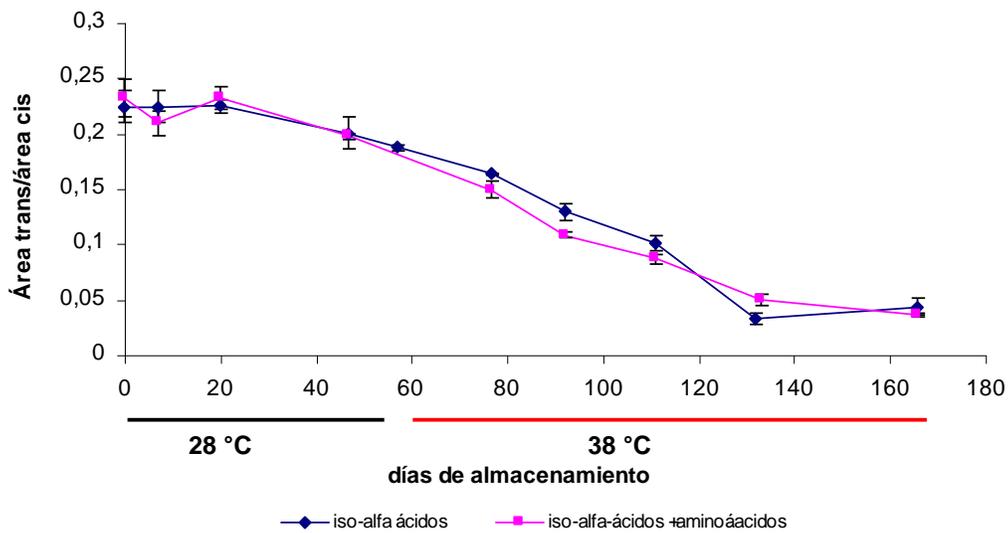


Figura 42. Degradación de *trans*-iso- α -ácidos durante el almacenamiento en presencia y ausencia de aminoácidos

También pudo notarse que los isómeros *cis* y *trans* se degradan a una velocidad distinta. Las especies *trans* se degradan más rápidamente que las *cis* (Figura 43-a), especialmente para los isómeros de la isohumulona. Se propone que la relación *trans/cis* es un buen indicador del grado de deterioro de una cerveza que contenga éste tipo de lúpulo (Figura 43-b). Este comportamiento fue señalado en la literatura por Araki y col.[38]. En el gráfico se observa una disminución del 77 % en la relación *trans/cis* a los 130 días de almacenamiento del sistema modelo. Es de hacer notar que el nombre asignado a las especies *cis* fue basado en una literatura en la cual se emplearon las mismas fase móviles y por ende el orden de elución debe ser el mismo [37].



(a)



(b)

Figura 43. Degradación de *cis* y *trans*-iso- α -ácidos durante el almacenamiento (a) y relación *trans/cis* (b)

De manera adicional, fue graficado el cambio en el porcentaje de los *trans*-iso- α -ácidos (área *trans*-iso- α -ácidos/área total iso- α -ácidos) durante el almacenamiento; esto permitió independizar la respuesta de las variaciones debidas al detector y observar la estabilidad del extracto durante el almacenamiento. En la Figura 44 se observa el cambio en el porcentaje de cada especie durante el almacenamiento, encontrándose que hubo una disminución de la especie *trans*-isohumulona en el orden del 80% (en presencia y ausencia de aminoácidos), y para la especie *trans*-isocohumulona en el orden del 72%. Por otro lado, para *trans*-isoadhumulona la degradación fue completa en presencia y ausencia de aminoácidos.

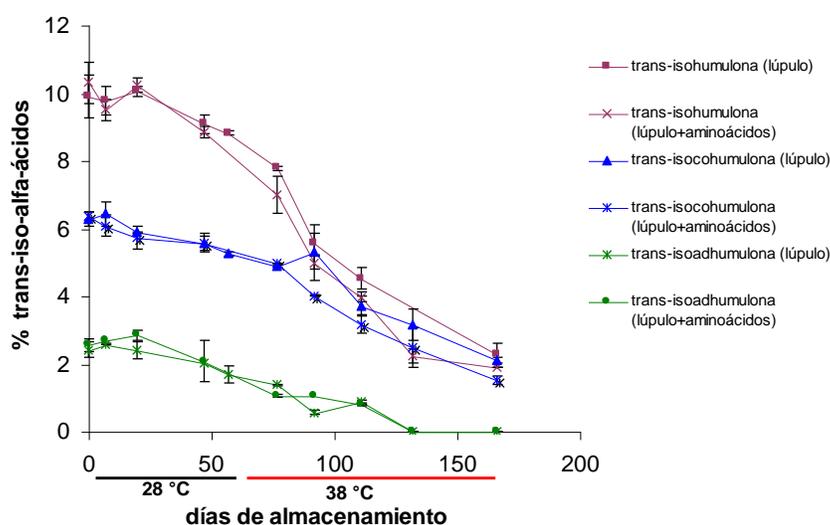


Figura 44. Disminución en el porcentaje de *trans*-iso- α -ácidos durante el almacenamiento en presencia y ausencia de aminoácidos

En cuanto a los otros extractos (iso- α -ácidos modificados), el comportamiento es muy diferente, ya que la degradación de sus especies es más lenta. En el caso de los tetrahydro-iso- α -ácidos (lúpulo tetra), las especies son bastante estables durante el almacenamiento, siendo la más reactiva la tetrahydro-isohumulona', uno de los isómeros de la tetrahydro-isohumulona (Figura 45). El comportamiento en presencia y ausencia de aminoácidos fue el mismo.

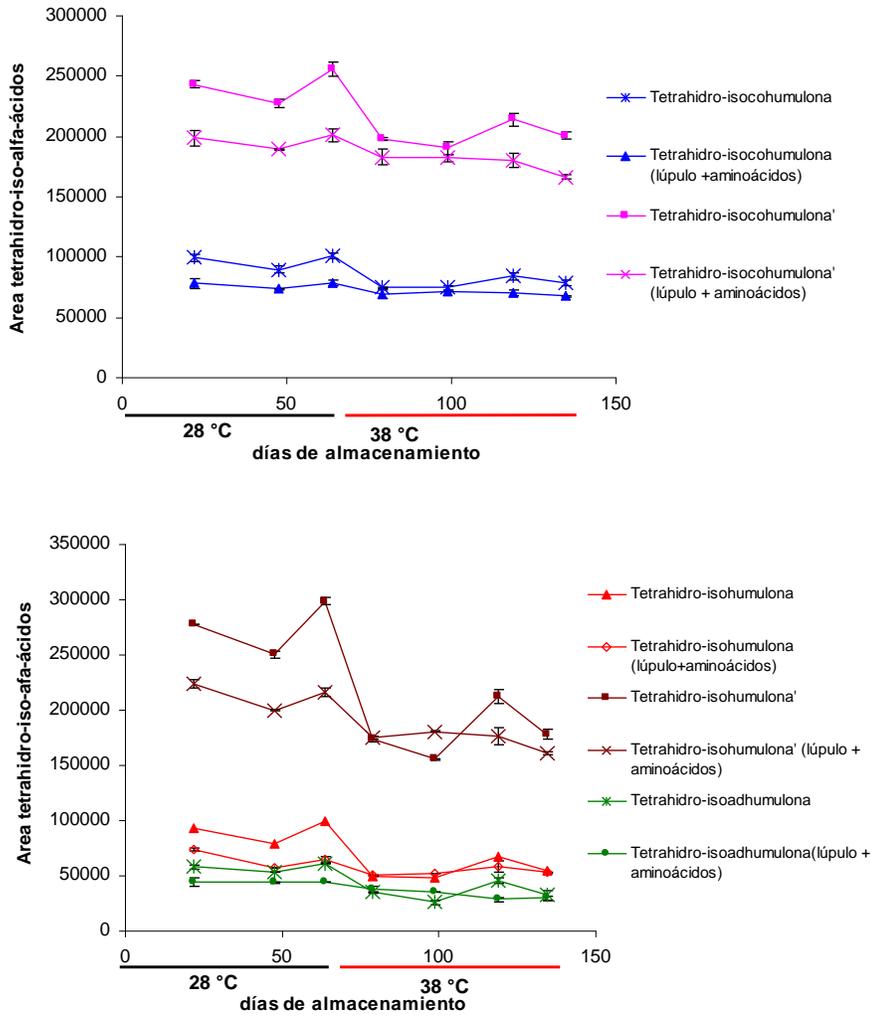


Figura 45. Degradación de tetrahydro-iso- α -ácidos durante el almacenamiento en presencia y ausencia de aminoácidos

Adicionalmente, al graficar los porcentajes en área de especies tetra (Figura 46) se observó que estas especies son bastantes estables durante el almacenamiento en comparación al lúpulo iso. Los ligeros aumentos observados en la tetrahydro-isocohumulona se deben al hecho de que otra (s) especie (s) esta (n) disminuyendo durante el almacenamiento.

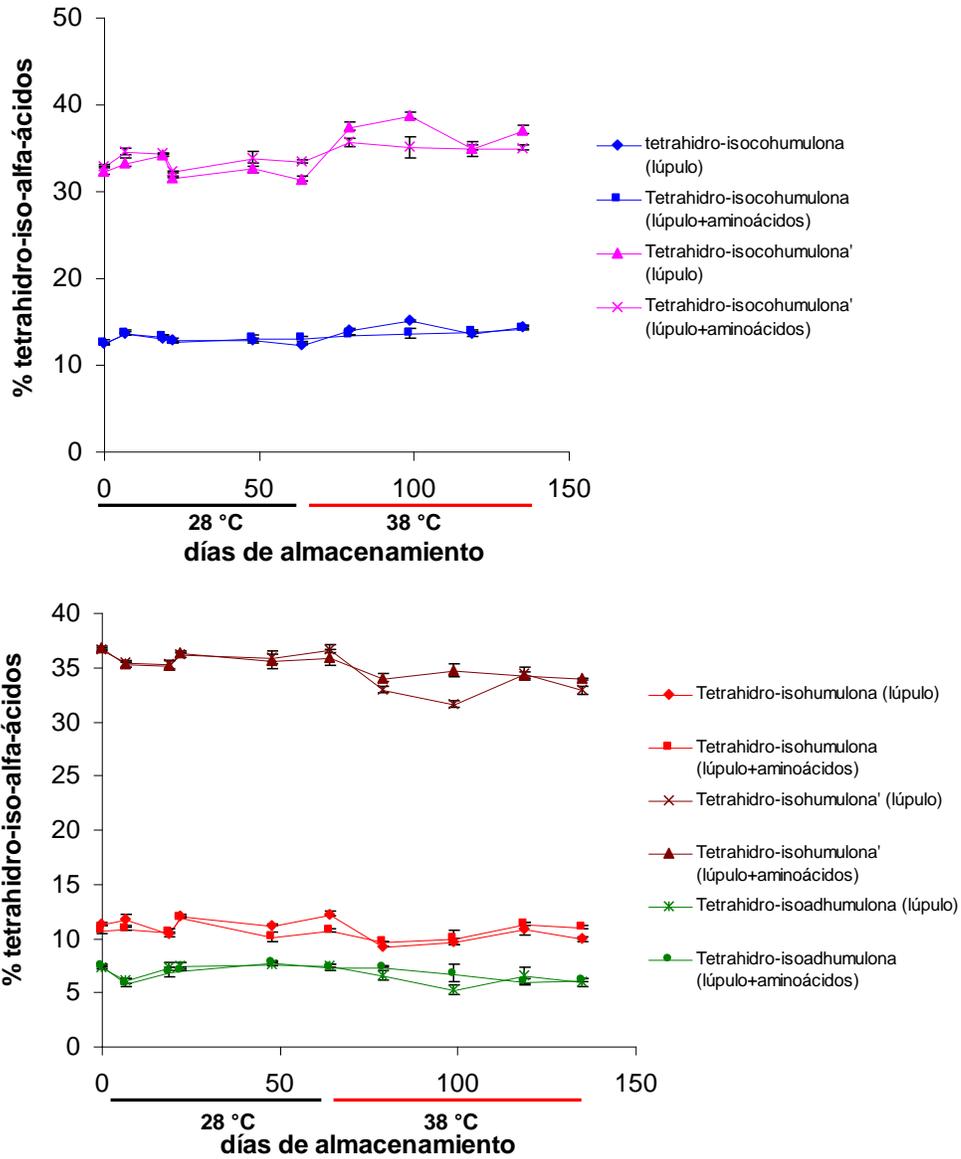


Figura 46. Disminución en el porcentaje de tetrahydro-iso- α -ácidos durante el almacenamiento en presencia y ausencia de aminoácidos

Para conocer como se degradan las especies del extracto rho, fueron graficadas las respuestas de los *cis*-rho-iso- α -ácidos (Figura 47), donde pudo observarse una velocidad de degradación distinta entre los esteroisómeros de la *cis*-rho-isocohumulona (curvas azul y fucsia) y la *cis*-rho-isohumulona (curvas verde y naranja). Este hecho es interesante porque las especies que más se degradan podrían considerarse indicadores del deterioro de sistemas que contengan este tipo de lúpulo. Además, fue graficada la relación *trans/cis* y se encontró que estos isómeros se degradan a la misma velocidad, por lo que la relación es constante en el tiempo (Figura 48). Los gráficos de porcentajes de especies rho no mostraron un resultado adicional por lo que no son presentados.

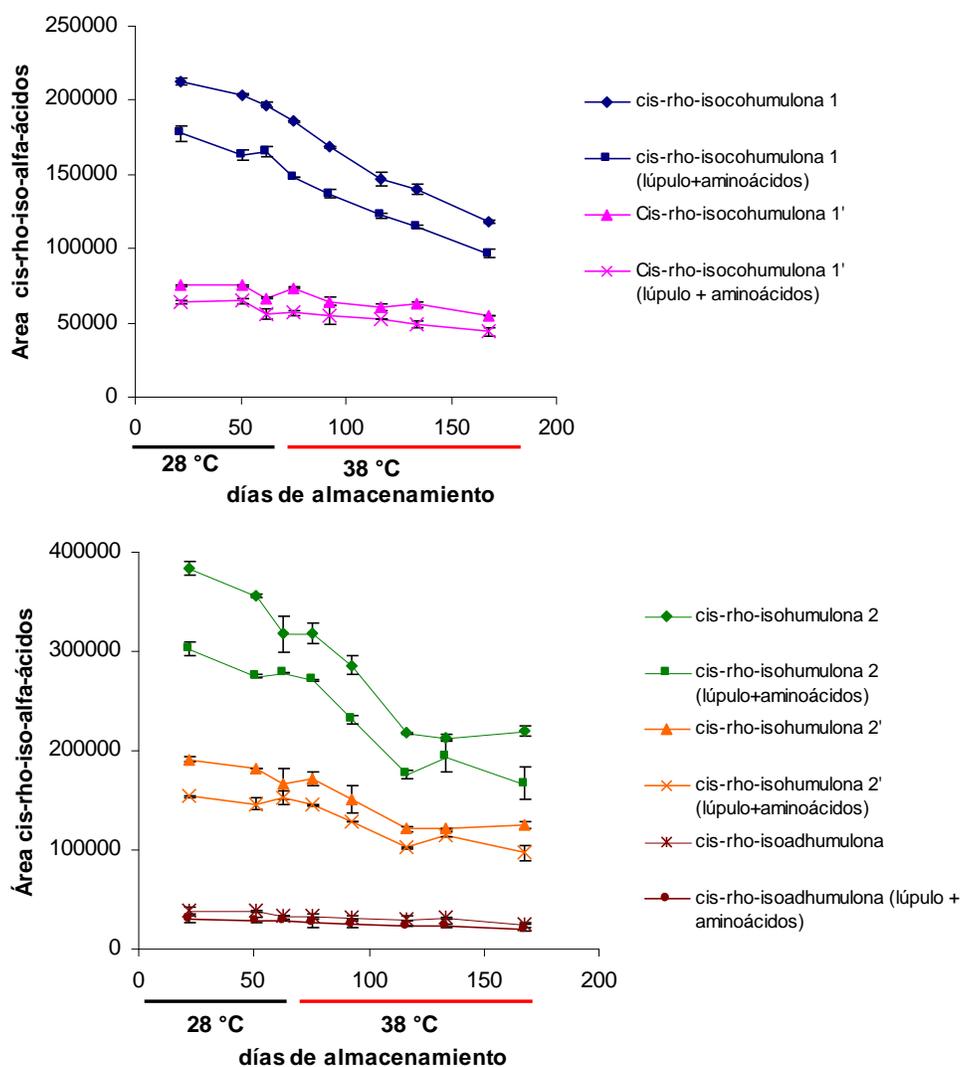


Figura 47. Degradación de *cis*-rho-iso- α -ácidos durante el almacenamiento en presencia y ausencia de aminoácidos

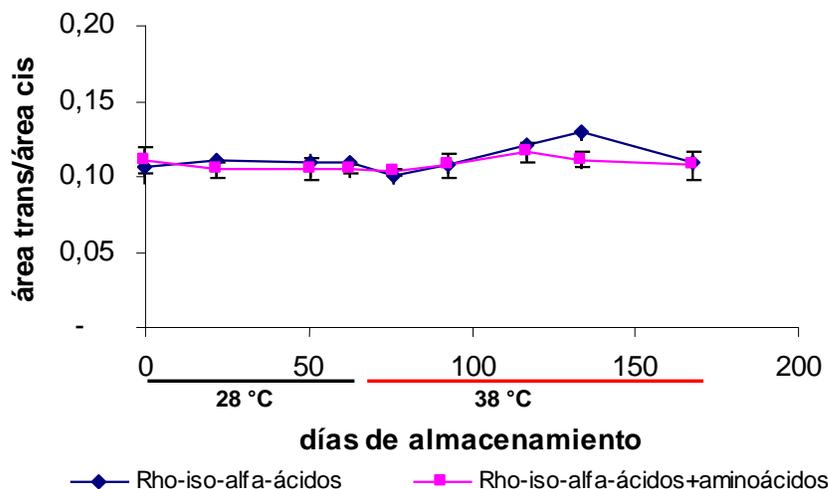


Figura 48. Relación *trans/cis* en sistemas modelo con lúpulo rho

En cuanto al lúpulo hexa fueron graficados las respuestas de los *cis*-hexahidro-iso- α -ácidos y se observó que las especies son estables durante el almacenamiento; la *cis*-hexahidro-isohumulona parece ser la única especie reactiva (Figura 49). La velocidad de degradación de las especies *cis* y *trans* son similares, notándose así una disminución muy leve durante el almacenamiento (Figura 50). El gráfico del porcentaje de *cis*-hexahidro-iso- α -ácidos no reveló información adicional por lo que no fue presentado.

El estudio realizado sugirió que de todos los extractos el más estable es el tetra. Esto va en conformidad con la literatura, en la cual se menciona que los tetrahidro-iso- α -ácidos son más resistentes al deterioro oxidativo [52]. De manera general, se observó que las especies derivadas de la humulona y cohumulona son más reactivas. Estas especies podrían estar correlacionadas con la formación de aldehídos como el 2-metil-propanal, 2-metil-butanal y 3-metil-butanal, vía degradación del ácido amargo, tal como se mencionó en la sección 6.3.1. Estas son las especies mayoritarias en cualquier forma comercial del lúpulo [30]. Por otro lado, el estudio no permitió observar una diferencia entre los sistemas con aminoácidos y sin aminoácidos.

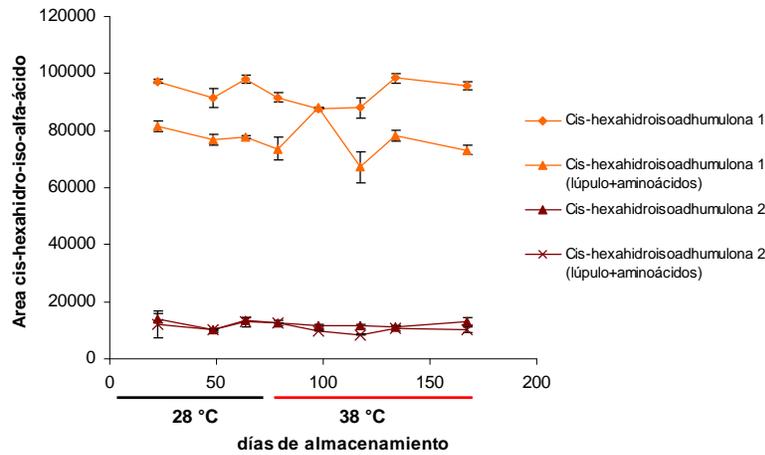
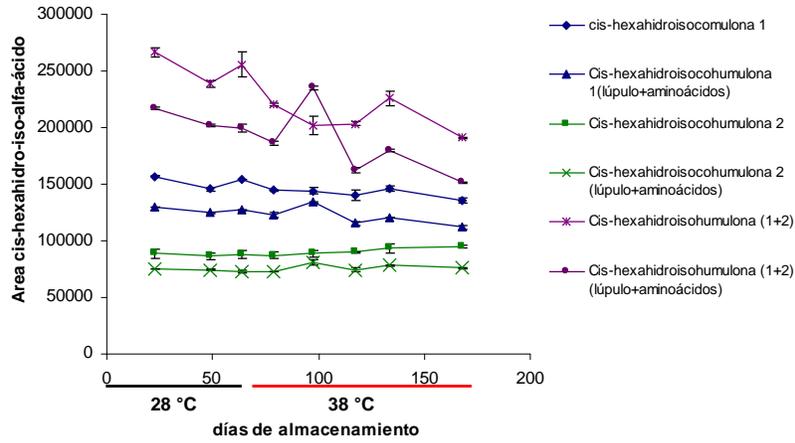


Figura 49. Degradación de *cis*-hexahidro-iso- α -ácidos durante el almacenamiento en presencia y ausencia de aminoácidos

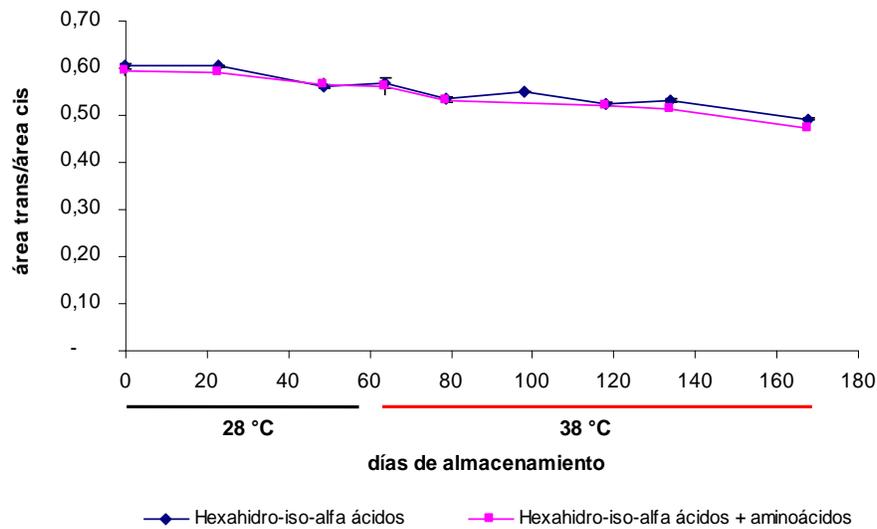


Figura 50. Relación *trans/cis* en sistemas modelo con lúpulo hexa

Se observó que entre los hexahidro-iso- α -ácidos y los rho-iso- α -ácidos, los hexa presentan una mayor estabilidad. Además, comparando ambos extractos, se observó que el extracto que posee una menor susceptibilidad al envejecimiento es el hexa (Tabla 16). La diferencia entre el extracto hexa y rho viene dada por el proceso de hidrogenación. El mismo comportamiento fue observado al comparar los iso- α -ácidos y tetrahidro-iso- α -ácidos, siendo el extracto tetra el de mayor estabilidad y menor susceptibilidad al envejecimiento. La ausencia de las insaturaciones en las cadenas isoprenílicas son claves en la generación de sistemas más estables.

6.3.3 Formación de aldehídos de Strecker en cerveza

Hasta los momentos se han propuesto dos posibles rutas para la formación de los aldehídos de Strecker en los sistemas modelo: 1) degradación del ácido amargo y 2) reacción entre aminoácidos e iso- α -ácidos. Sin embargo, se debe recordar que en la cerveza ocurre además la degradación de Strecker de los aminoácidos, es decir, la descarboxilación y desaminación de los aminoácidos por su reacción con los α -dicarbonilos provenientes de los azúcares reductores.

La confirmación de que los aldehídos de Strecker se pueden formar en sistemas modelo de ácidos amargos y aminoácidos a través de dos rutas alternativas, plantea varias interrogantes, tales como, si estas dos rutas ocurren también en la cerveza y cuál de todas las que podrían ocurrir, las dependientes de los ácidos amargos o de los α -dicarbonilos, contribuye en mayor grado con la formación de los aldehídos de Strecker durante el envejecimiento de la cerveza. Las respuestas a estas preguntas son muy importantes desde el punto de vista tecnológico, pues cualquier medida para mejorar la estabilidad sensorial de la cerveza debería estar dirigida a inhibir o retardar la reacción que más contribuya con la generación de aldehídos de Strecker.

Diferenciar la contribución de cada reacción es difícil pues comparten substratos comunes, dos de ellas los aminoácidos, y otras dos los ácidos amargos. El experimento que pudiera dar luces sobre la contribución de cada ruta sería la preparación de cervezas, a partir de un mismo mosto, pero con las siguientes variantes: 1) una cerveza sin la adición de ácidos amargos, la cual permitiría evaluar la contribución de la degradación de Strecker vía α -

dicarbonilos, 2) una cerveza con extracto de CO₂ (iso- α -ácidos), para evaluar la contribución de la reacción *tipo-Strecker* de los ácidos amargos (utilizando como indicadores los aldehídos 2 y 3-metil-butanal, metional y fenilacetaldehído) y 3) una cerveza con extracto hexa, para evaluar la contribución de la degradación de ácidos amargos, utilizando como indicadores los aldehídos 2-metil-propanal y 3-metil-butanal. Sin embargo, este experimento estuvo fuera del alcance de esta tesis, por lo cual se decidió hacer el seguimiento de la formación de los aldehídos de Strecker en cervezas comerciales con dos tipos de ácidos amargos. Una cerveza A, la cual contiene mayoritariamente iso- α -ácidos y una cerveza B, conteniendo tetrahydro-iso- α -ácidos y rho-iso- α -ácidos.

Con este estudio se pudo observar que durante el almacenamiento, la concentración de aldehídos generados en la cerveza A fue mayor que la obtenida en la cerveza B (Figura 51). Este hecho es interesante considerando que la cerveza B contiene dos lúpulos con muy diferente susceptibilidad al envejecimiento, el lúpulo tetra con la menor susceptibilidad al envejecimiento y el rho con la mayor susceptibilidad al envejecimiento (ver Tabla 16). Posiblemente el lúpulo tetra le este confiriendo un mayor grado de estabilidad a esta cerveza a pesar de que posea también lúpulo rho. Sin embargo, aquí es importante indicar que ambas cervezas no son exactamente comparables, ya que el porcentaje de extracto (concentración de sustancia seca relacionada con azúcares fermentables) es mayor en la cerveza A que en la B, y la dosificación de lúpulo no es idéntica en ambas cervezas.

Es interesante además comparar la curva de formación de los diferentes aldehídos de Strecker en ambas cervezas, y la curva de formación del furfural, un aldehído furánico derivado de la degradación de los azúcares reductores a través de la reacción de Maillard (Figura 51-e). El furfural se genera constantemente durante todo el seguimiento, y muestra un incremento significativo (mayor al 100%) en la velocidad de formación al aumentar la temperatura de almacenamiento en 10°C. A diferencia de este comportamiento, se puede observar que la formación de 2-metil-propanal en las cervezas muestra un cambio de pendiente con la temperatura menor al observado para el furfural y un aplanamiento de la curva de formación a los 80 días, indicando que la reacción prácticamente se detiene. Este comportamiento, de alcanzar una concentración tope a partir de la cual los incrementos son muy pequeños, se observó para todos los aldehídos, y es completamente diferente a la

forma en la cual el furfural se forma en la cerveza. Estas diferencias podrían estar indicando que la formación de los aldehídos de Strecker en cerveza sigue una cinética diferente a la reacción de Maillard, lo que sugiere que la degradación de Strecker de los aminoácidos no sería la ruta principal de generación de estos aldehídos en la cerveza. Una confirmación de esta hipótesis se podría obtener si se hace el seguimiento de la formación de los aldehídos de Strecker en una cerveza sin lúpulo añadido.

Es importante destacar que se evidencia el incremento de aldehídos como 2-metil-propanal y 3-metil-butanal a 28 °C (Figura 51-a,b). Este efecto de la temperatura en la generación de éstos analitos es distinto al observado en sistemas modelos con lúpulo tetra e iso (Figuras 34 y 36), sugiriendo que otra ruta de reacción es importante a 28 °C. Probablemente esta otra ruta es la degradación de Strecker clásica, es decir, la degradación de los respectivos aminoácidos en presencia de compuestos α -dicarbonilos derivados de los azúcares reductores, tal como fue demostrado recientemente por la acumulación de estos intermediarios dicarbonílicos durante el envejecimiento de la cerveza a 28 °C [53].

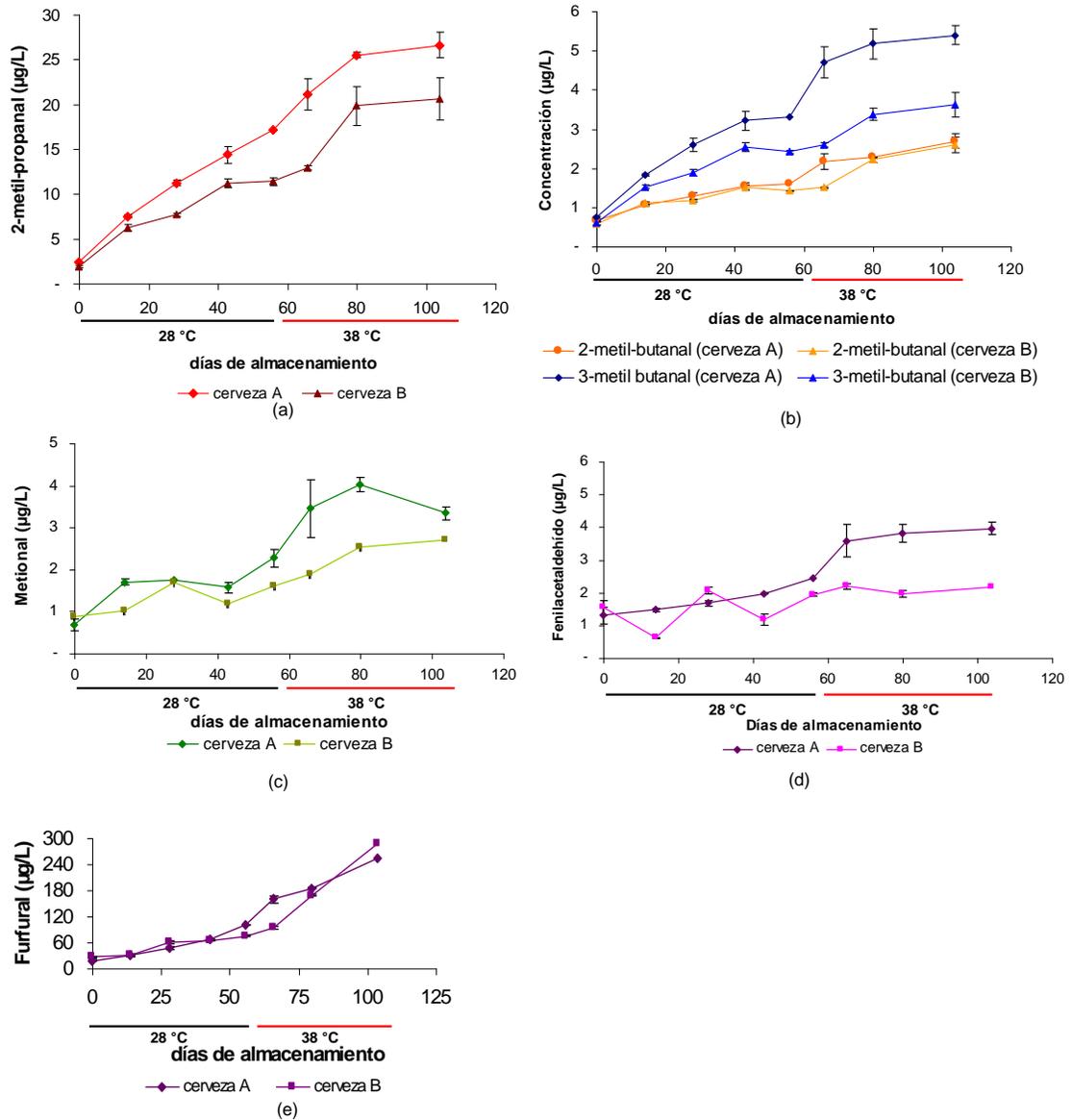


Figura 51. Generación de aldehídos de Strecker durante el almacenamiento de las cervezas comerciales A y B. A: iso- α -ácidos (18 mg/L); B: rho-iso- α -ácidos (7 mg/L) y tetrahidro-iso- α -ácidos (7,56 mg/L).

6.3.4 Degradación de los ácidos del lúpulo en cerveza

El seguimiento de los ácidos amargos en los sistemas modelo (sección 6.3.2) permitió la observación de la degradación que pueden sufrir los diferentes tipos de iso- α -ácidos. Por otro lado, en cerveza, se persiguió obtener información de la degradación de los iso- α -ácidos y tetrahidro-iso- α -ácidos en las cervezas A y B, respectivamente. Fueron graficados

los porcentajes de estas especies durante el almacenamiento (Figura 52) y se observó un comportamiento similar que en sistemas modelo. Las especies *trans*-isocohumulona y *trans*-isohumulona disminuyeron significativamente durante el almacenamiento. La especie *trans*-iso-adhumulona disminuyó levemente a 38 °C. También pudo notarse que las especies *trans* se degradan más rápidamente que las *cis*, obteniéndose un gráfico muy similar al observado en sistemas modelo (Figura 53). Esto confirma que la relación *trans/cis* puede ser utilizada como un parámetro adecuado para indicar el grado de deterioro de la cerveza A.

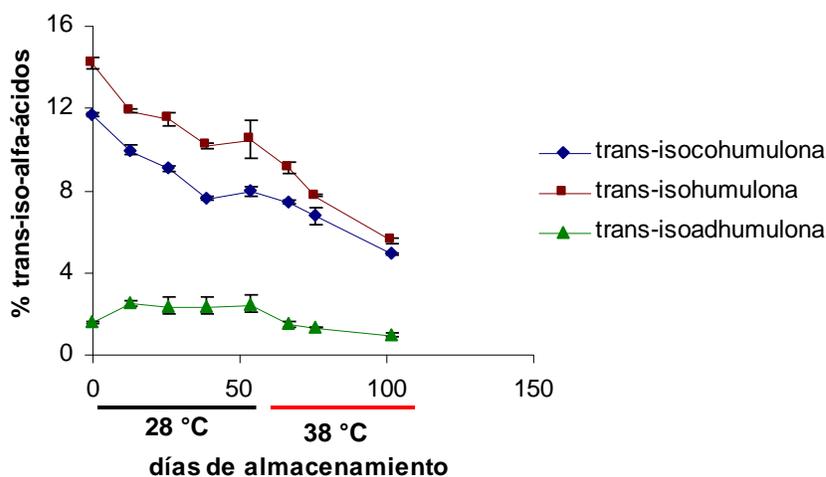


Figura 52. Porcentaje de *trans*-iso- α -ácidos durante el almacenamiento de la cerveza A Técnica de SBSE para la extracción de los ácidos amargos

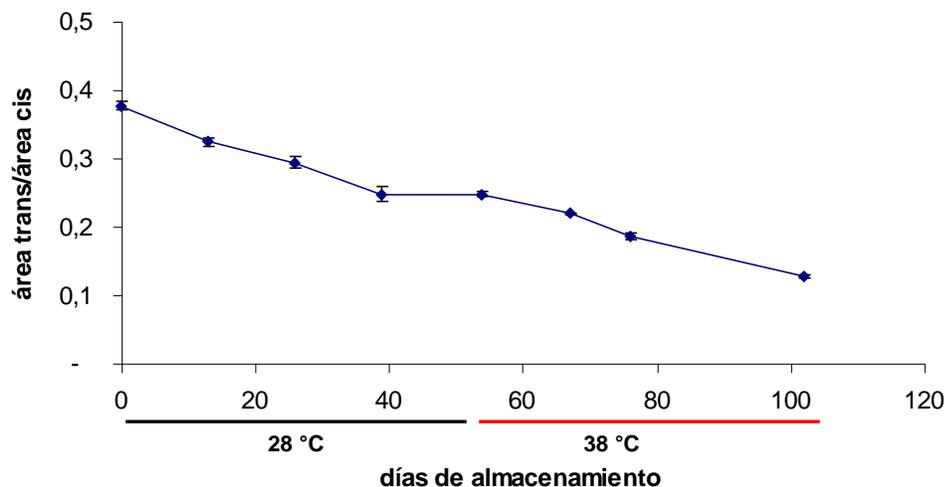


Figura 53. Relación *trans/cis* durante el almacenamiento de la cerveza A.

En cuanto a la degradación de los tetrahidro-iso- α -ácidos en la cerveza B (Figura 54) se observó el mismo comportamiento que en sistemas modelo, ya que el porcentaje de cada especie tetra no varía durante el almacenamiento, lo que sugiere que este extracto es bastante estable respecto al lúpulo iso.

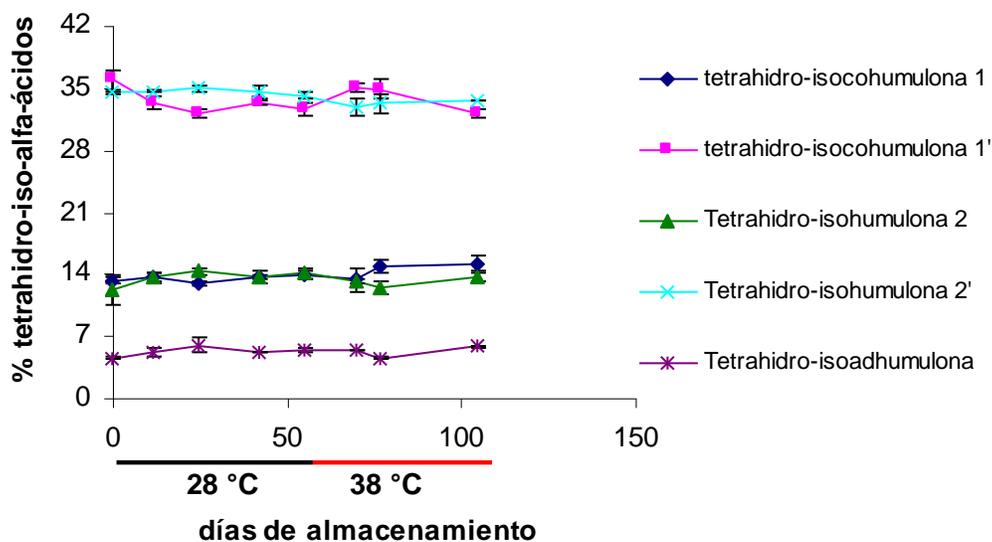


Figura 54. Porcentaje de tetrahidro-iso- α -ácidos durante el almacenamiento de la cerveza B Técnica de SBSE para la extracción de los ácidos amargos

En una matriz como la cerveza se evidenció una degradación similar a la observada en sistemas modelo. Esto indica que la reactividad de estas especies de lúpulo es similar en un sistema complejo como la cerveza. Sin embargo, a partir de los resultados obtenidos no puede concluirse que tipo de reacciones tienen lugar en la cerveza para generar aldehídos de Strecker.

VII. CONCLUSIONES

En la reacción de derivatización y extracción simultánea de los aldehídos con PFBHA los factores temperatura, tiempo y adición de NaCl fueron significativos. La adición de NaCl y el tiempo de extracción tuvieron un efecto positivo sobre la respuesta; mientras que la temperatura tuvo un efecto negativo sobre la respuesta de las oximas de los analitos más volátiles y positivo para los menos volátiles, metional y fenilacetaldehído.

Fue posible la determinación de los aldehídos de Strecker bajo una única condición de extracción, la cual permitió extraer y derivatizar los aldehídos de baja y alta volatilidad con una eficiencia aceptable para la mayor parte de estos, así como reducir el tiempo y costo del análisis.

El método de estandarización interna fue satisfactorio para la determinación de los aldehídos de Strecker, (E)-2-nonenal y furfural en cerveza, obteniéndose recuperaciones entre 73 y 117 %. El método proporcionó una buena precisión ($1,0 < CV < 13,6\%$) y límites de detección adecuados para todos los analitos ($0,013 < LD < 2\mu\text{g/L}$), con los dos modos de ionización estudiados: impacto de electrones e ionización química negativa.

El método de la derivatización sobre la fibra/GC/MS (EI/NCI) se caracterizó por ser rápido, fácil y útil para la cuantificación en cerveza frescas y en la fase temprana del envejecimiento del producto a temperaturas moderadas (28 °C). El método con impacto de electrones como modo de ionización es el recomendado para ejecutar seguimientos por tiempo prolongado o envejecimiento forzado (40 °C).

La separación de los diversos tipos de iso- α -ácidos por HPLC fue lograda mediante combinaciones de metanol y/o acetonitrilo, agua y ácido fosfórico para garantizar la mayor resolución cromatográfica entre los isómeros *cis* y *trans* y sus diastereoisómeros (en el caso que aplique), siendo el porcentaje de ácido fosfórico un factor crítico en la separación cromatográfica.

La adición de ácido fosfórico también fue un factor importante para la extracción de iso- α -ácidos y tetrahidro-iso- α -ácidos por SBSE en los dos tipos de cerveza empleados. La

técnica de SBSE resultó satisfactoria para la extracción de estos compuestos en estas matrices.

En todos los sistemas modelo combinados (lúpulo+aminoácidos) pueden generarse los aldehídos de Strecker vía una reacción en la cual participan los aminoácidos y cada tipo de ácido del lúpulo. Esta reacción es significativa a 38 °C.

La degradación de los iso- α -ácidos puede conducir a la formación de 2-metil-propanal. Por otro lado, la degradación de especies tetra, rho y hexa conducen a la formación de 3-metil-butanal.

Los sistemas hexa y rho se degradan durante el almacenamiento de los extractos a temperatura ambiente, generando 2-metil-propanal y 2-metil-butanal, confirmando lo indicado en la literatura que las especies rho no parecen ser estables durante el almacenamiento.

El lúpulo tetra fue el más estable frente a los demás extractos, es decir, los tetrahidro-iso- α -ácidos son los que sufren una menor degradación durante el almacenamiento a 28 °C y 38 °C.

El extracto que generó más aldehídos de Strecker en sistemas modelo fue el rho y el que generó menos fue el tetra, indicando que el lúpulo tetra posee una menor susceptibilidad al envejecimiento. Por lo tanto, se presume que una cerveza preparada con lúpulo tetra poseerá una mayor estabilidad en su sabor.

Las especies isohumulona e isocohumulona son las más reactivas, esto sugiere que estas podrían estar participando en las diferentes reacciones estudiadas.

La generación de aldehídos durante el almacenamiento a 28 °C en cerveza, indicó que a ésta temperatura alguna(s) reacción(es) puede(n) tener lugar en la misma, no evidenciadas en los sistemas modelo estudiados. Esto sugiere la ocurrencia de otras reacciones en las que no participan los ácidos del lúpulo. Además, una temperatura de 38 °C también es importante en la generación de aldehídos durante el almacenamiento de la cerveza. Se confirma que los cambios de la temperatura durante el almacenamiento y transporte del

producto conllevan a la formación de aldehídos de Strecker y que deberían ser controlados para mejorar la estabilidad sensorial del producto.

VIII. RECOMENDACIONES

Se recomienda el uso del lúpulo tetra para producir una cerveza más estable. Este lúpulo en combinación con lúpulo rho es empleado en la elaboración de la cerveza B. Esta cerveza podría servir de punto de partida, sugiriéndose experimentos que contemplen la reducción de la concentración de lúpulo rho, de manera de no comprometer la estabilidad de la espuma, los atributos sensoriales y al mismo tiempo generar un producto con una menor susceptibilidad al envejecimiento.

Para identificar la ruta principal que conduce a la formación de aldehídos de Strecker, así como determinar si la reacción *tipo-Strecker* ocurre en la cerveza, se requiere la elaboración de cervezas con un mismo extracto y con cada tipo de lúpulo. Además, una cerveza sin lúpulo sería clave para evaluar la degradación de Strecker clásica.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Bravo, C.A; Sanchez, B; Scherer, E; Herrera, J and Rangel-Aldao.R. α -dicarbonylic compounds as indicators and precursors of flavour deterioration during beer aging. *M.B.A.A.Techn.Quart*, 2002, 39 (1), 13-23.
- [2] Saison, D; De Schutter, D; Uyttenhove, B; Delvaux, F and Delvaux, F. R. Contribution of staling compounds to the aged flavour of lager beer by studying their flavour thresholds. *Food Chemistry*. 2009, 114, 1206-1215.
- [3] Herrmann, M; Klotzbücher, B; Wurzbacher, M; Hanke, S; Kattein, U; Back, W; Becker, T and Krottenthaler, M. A new validation of relevant substances for the evaluation of beer aging depending on the employed boiling system. *J.Inst.Brew*. 2010, 116, 41-48.
- [4] Guedes de Pinho, P and Silva Ferreira, A.C. Role of Strecker aldehydes on beer flavour stability. In *Flavour Science: Recent Advances and Trends*, first edition.; Bredie, W.L.P.; Petersen, M.A.; Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 2006, pp 529-532.
- [5] Hashimoto, N and Kuroiwa, Y. Pathways for the formation of volatile aldehydes during storage of bottled beer. Rept. Res. Lab.Kirin Brewery Co., Ltd., 1975, 18, 1-11.
- [6] Hashimoto, N. Flavour Stability of Packaged Beers. *Brewing Science*. Volume 2. Edited by J.R.A.Pollock (1981).
- [7] Briggs, D; Hough, J; Stevens, R and Young, T. *Malting and Brewing Science. Volume 1: Malt and Sweet Wort*. Kluwer Academic /Plenum Publishers, 2da ed, UK, 1981.
- [8] Vanderhaegen, B; Neven, H; Verachtert, H and Derdelinckx, G. The Chemistry of beer- a critical review. *Food Chemistry*, 2006, 95(3), 357-381.
- [9] Yaylayan, V. Recent advances in the chemistry of strecker degradation and amadori rearrangement: implications to aroma and color formation. *Food Sci. Technol. Res*, 2003, 9(1), 1-6.
- [10] Thum, B; Miedaner, H; Narziss, L and Back, W. Formation of staling carbonyls. European Brewery Convention Congress, Berlin, 1995, 491-498.
- [11] Hidalgo, F and Zamora, R. Strecker-type degradation produced by the lipid oxidation products 4,5-epoxy-2-alkenals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52, 7126-7131.
- [12] Hidalgo, F; Gallardo, E and Zamora, R. Strecker-type degradation of phenylalanine by 4-hydroxy-2-nonenal in model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53, 10254-10259.

- [13] Hofmann, T and Shieberle, P. Identification of potent aroma compounds in thermally treated mixtures of glucose/ cysteine and rhamnose/cysteine using aroma extract dilution techniques. *Journal of agricultural and food chemistry*, 1997, 45, 898-906.
- [14] Hashimoto, N and Eshisma, T. Oxidative degradation of isohumulones in relation to flavour stability of beer. *J.Inst.Brew.* 1978, 85, 136-140.
- [15] Vesely, P; Lusk, L; Basarova, G; Seabrooks, J and Ryder, D. Analysis of aldehydes in beer using solid-phase microextraction with on-fiber derivatization and gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51, 6941-6944.
- [16] Ojala, M; Kotiaho, T; Siirila, J and Sihvonen M-L. Analysis of aldehydes and ketones from beer as O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)Hydroxylamine derivatives. *Talanta*, 1994, 41(8), 1297-1309.
- [17] Gamero, A. Optimización de un método cuantitativo para la determinación de los aldehídos de Strecker en cerveza. TEG, Universidad Simón Bolívar, Caracas, Venezuela. (2005).
- [18] Ochiai, N; Sasamoto, K; Daishima, S; Heiden, A and Hoffmann A. Determination of stale-flavor carbonyl compounds in beer by stir bar sorptive extraction with in-situ derivatization and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2003, 986, 101-110.
- [19] Wardencki, W; Sowinski, P and Curylo, J. Evaluation of headspace solid-phase microextraction for the analysis of volatiles carbonyl compounds in spirits and alcoholic beverages. *Journal of Chromatography A*, 2003, 984, 89-96.
- [20] Devon, C; Chou, C; Barthel, R and Que Hee, S. Characterization of the O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)-hydroxylamine hydrochloride (PFBOA) derivatives of some aliphatic mono- and dialdehydes and quantitative water analysis of these aldehydes. *Journal of AOAC International*, 1992, vol 75, n° 5, 842-854.
- [21] Gabrio, T and Bertsch, A. Determination of carbonyl compounds in pool water with O-(2,3,4,5,6-pntafluorobenzyl) hydroxylamine hydrochloride and gas chromatography-tandem mass spectrometry analysis. *Journal of Chromatography A*, 2004, 1046, 293-296.
- [22] Pawliszyn, J. Solid phase microextraction, theory and practice, Wiley-VCH, New York, 1997.
- [23] Martos, P. A and Pawliszyn, J. Sampling and determination of formaldehyde using solid-phase microextraction with on fiber derivatization. *Anal.Chem*, 1998, 70, 2311-2320.

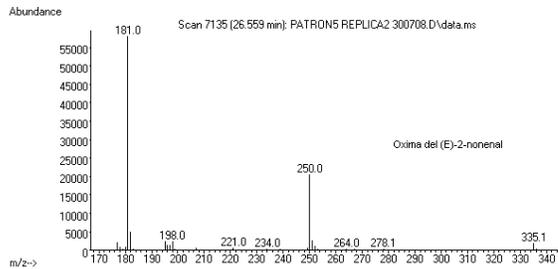
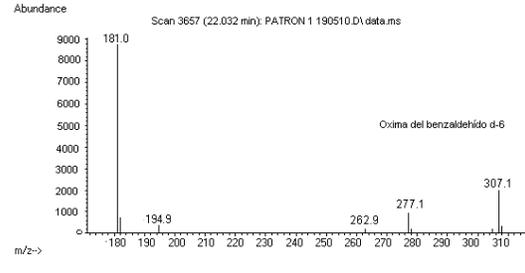
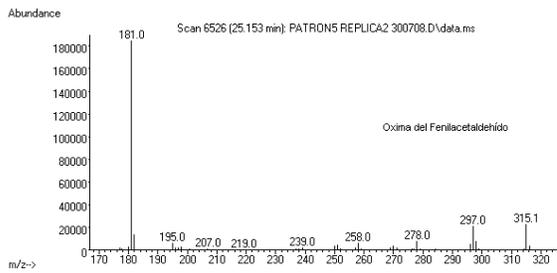
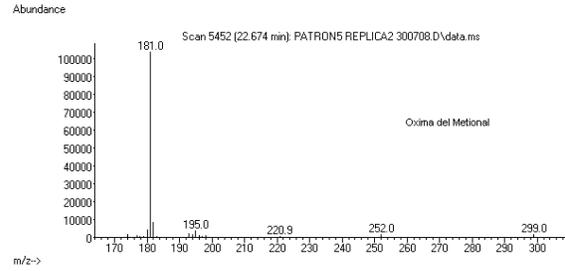
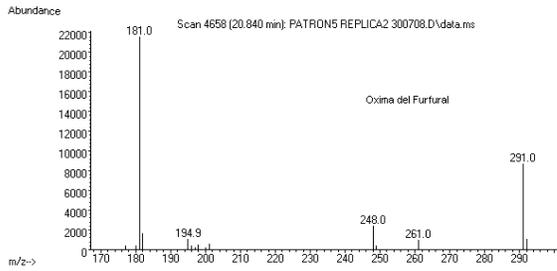
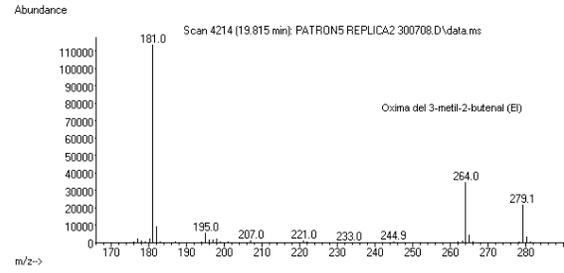
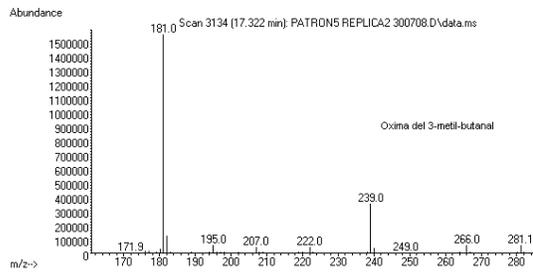
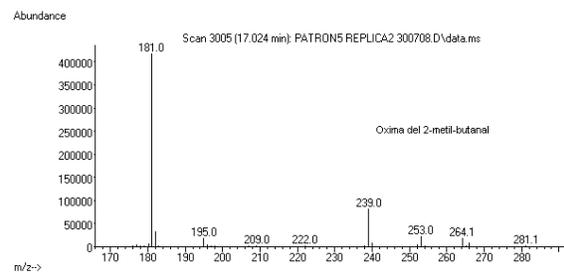
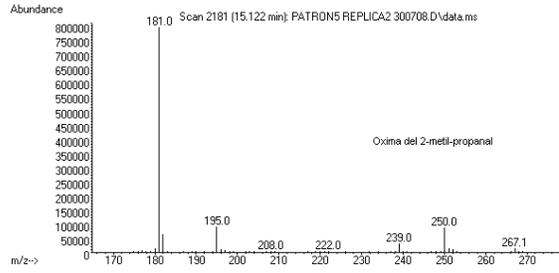
- [24] Cancho, B; Ventura, F and Galceran, M. Determination of aldehydes in drinking water using pentafluorobenzylhydroxylamine derivatization and solid-phase microextraction. *Journal of Chromatography A*, 2001, 943, 1-13.
- [25] Tsai S-W and Chang C-M. Analysis of aldehydes in water by solid-phase microextraction with on-fiber derivatization. *Journal of Chromatography A*, 2003, 1015, 143-150.
- [26] Saison, D; De Schutter, D; Delvaux, F and Delvaux, F.R. Optimisation of a complete method for the analysis of volatiles involved in the flavour stability of beer by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography and mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2008, 1190, 342-349.
- [27] Kataoka, H; Lord, H and Pawliszyn, J. Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *Journal of Chromatography A*, 2000, 880, 35-62.
- [28] Baltussen, E; Sandra, P; David, F and Cramers, C. Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: theory and principles. *J.Microcol.* 1999, 737-747.
- [29] Pawliszyn, J. Applications of solid microextraction. 1999. Royal Society of Chemistry. Chromatography Monographs.
- [30] Cortacero, S; Bermúdez de Castro, M; Segura-Carretero, A; Cruces-Blanco, C and Fernández, A. Analysis of beer components by capillary electrophoretic methods. *Trends in Analytical Chemistry*, Vol 22, Nos.7+8, 2003.
- [31] He, Guo-qing; Xiong, H; Chen, Qi-he; Ruan, H; Wang, Z and Traoré, L. Optimization of conditions for supercritical fluid extraction of flavonoids from hops (*Humulus lupulus* L.). *J Zhejiang Univ Sci B*, 2005, 6(10), 999-1004.
- [312] Verzele, M and De Keukeleire, D. Chemistry and analysis of hop and beer bitter acids. *Developments in food science 27*. 1991 Elsevier Science Publishers B.V
- [33] Wilson, R; Roberts, T; Smith, R and Biendl, M. Improving Hop utilization and flavor control through the use of pre-isomerized products in the brewery kettle. *MBAA TQ*, 2001, 38(1), 11-21.
- [34] De Keuleleire, D. Fundamentals of beer and hop chemistry. *Quimica Nova*, 23 (1) 2000.
- [35] Donley, J. Solid-Phase extraction of hop acids from beer or wort for subsequent analysis. *American Society of Brewing Chemist*, 1992, 50(3), 89-93.
- [36] Jacobsen, T and Hage, T. Hop Utilization in the Brewery-An Interbrewery Comparison. *American Society of Brewing Chemist. ASBC Journal*, 1989, 62-67.

- [37] Khatib, A; Kim, H; Wilson, E and Verpoorte, R. High performance liquid chromatographic method for Iso- α -acids. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 2006, 29(2), 293-302.
- [38] Araki, S; Takashio, M and Shinotsuka, K. A new parameter for determination of the extent of staling in beer. *J.Am.Soc.Brew.Chem*, 2002, 60 (1), 26-30.
- [39] De Cooman, L; Aerts, G; Overmeire, H and De Keukeleire, D. Alterations of the profiles of iso-alpha-acids during beer ageing, marked instability of trans-iso-alpha acids and implications for beer bitterness consistency in relation to tetrahydroiso-alpha-acids. *Journal of the institute of brewing*, 2000, 106, 169-178.
- [40] Clark, J; Burroughs, L and Guzinski, J. High-Performance Liquid Chromatography Analysis of Tetrahydro-iso- α -acids in Beer. *J.Am.Soc. Brew.Chem*, 1998, 56 (2), 76-79.
- [41] De Villiers, A; Vanhoenacker, G; Lynen, F and Sandra, P. Stir bar sorptive extraction-liquid desorption applied to the analysis of hop-derived bitter acids in beer by micellar electrokinetic chromatography. *Electrophoresis*, 2004, 25(4-5), Pages 664 - 669.
- [42] Harms, D; Nietzsche, F; Hoffmann, A; David, F and Sandra, P. The analysis of the bitter and other flavour compounds in beer and wort by Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE) followed by HPLC. AppNote 5/2001. GERSTEL.
- [43] Harms, D and Nietzsche, F. High-Performance Separation of Unmodified and Reduced Hop and Beer Bitter Compounds by a Single High-Performance Liquid Chromatographic Method. *J. Am. Soc. Brew. Chem*, 2001, 59(1), 28-31.
- [44] Ochiai, N and Nakamura, S. Application of Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE) Coupled to Thermal Desorption GC-MS for Determination of Ultra-Trace Level Compounds in Aqueous Samples. AppNote 5/2005. GESTEL.
- [45] David, F; Tienpont, B and Sandra, P. Stir-Bar Sorptive Extraction of trace organic compounds from aqueous matrices. LC.GC Europe. 2003, pp 2-7. www.lgceurope.com
- [46] IUPAC Compendium of chemical terminology (1997). <http://goldbook.iupac.org/L03540.html> Recopilado en diciembre 2010.
- [47] <http://msds.chem.ox.ac.uk/> Recopilado en diciembre 2010.
- [48] Wang, Q; O'Reilly, J and Pawliszyn, J. Determination of low-molecular mass aldehydes by automated headspace solid-phase microextraction with in-fibre derivatisation. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1071, 147-154.

- [49] Masucci, J and Caldwell, G. Techniques for gas chromatography /mass spectrometry. In *Modern practice of gas chromatography*, edited by Grob, R; John Wiley & Sons, Inc, 3rd ed, New York, 1995, 368-376.
- [50] De Clippeleer, J; De Rouck, G; De Cooman, L and Aerts, G. Influence of the hopping technology on the storage-induced appearance of staling aldehydes in beer. *J. Inst. Brew*, 2010, 116 (4), 381-398.
- [51] International calibration standards for HPLC analysis of isomerized α -acids. http://www.brewers.or.jp/bcoj/pdf/New_Iso_Stnds_Brochure_Final.pdf
- [52] De Schutter, D; Saison, D; Delvaux, F; Derdelinckx, G and Delvaux, F.R. The chemistry of aging beer. In *Beer in health and disease prevention*, edited by Preedy, V, Elsevier Inc, UK, 2009, volume 1, cap 36, 373-388.
- [53] Bravo, A; Herrera, J.C; Scherer, E; Ju-Nam, Y; Rübsam, H; Madrid, J; Zufall, C and Rangel-Aldao, R. Formation of α -dicarbonyl compounds in beer during storage of pilsner. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2008, 56, 4134-4144.

X. APÉNDICES

APÉNDICE A. Espectros de masas de las oximas obtenidos por impacto de electrones (EI)



APÉNDICE B. Resultados del ANOVA y pruebas realizadas para la verificación de los supuestos del modelo para 2-metil-butanal (solución estándar)

Full Factorial Design:

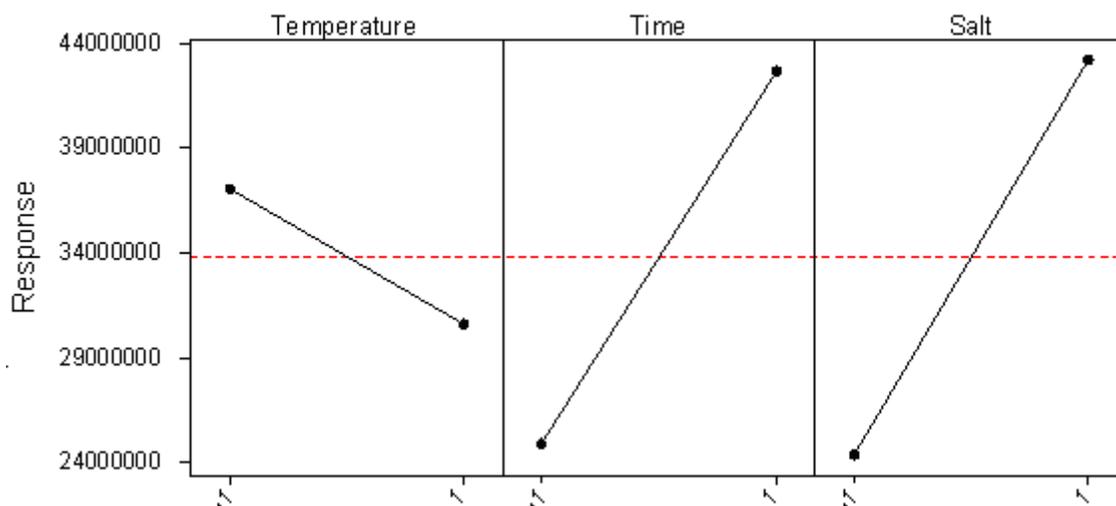
Factors: 3 ; Base Design: 3, 8
 Runs: 24; Replicates: 3
 Blocks: 3; Center pts (total): 0

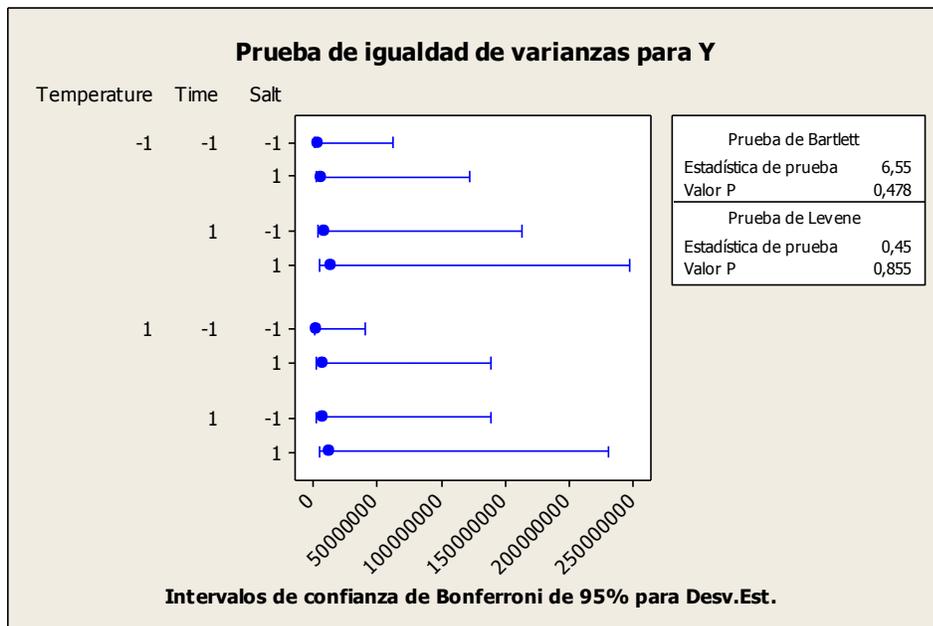
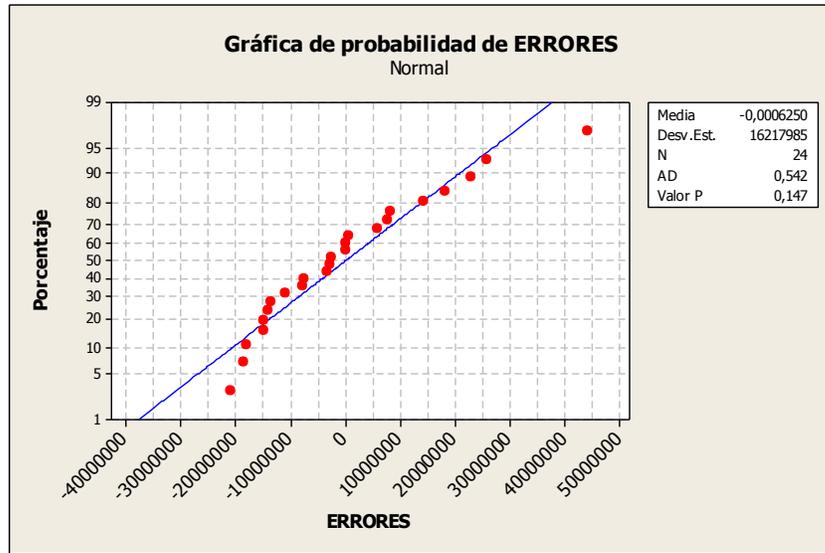
Block Generators: replicates

Analysis of Variance for Y, using Adjusted SS for Tests

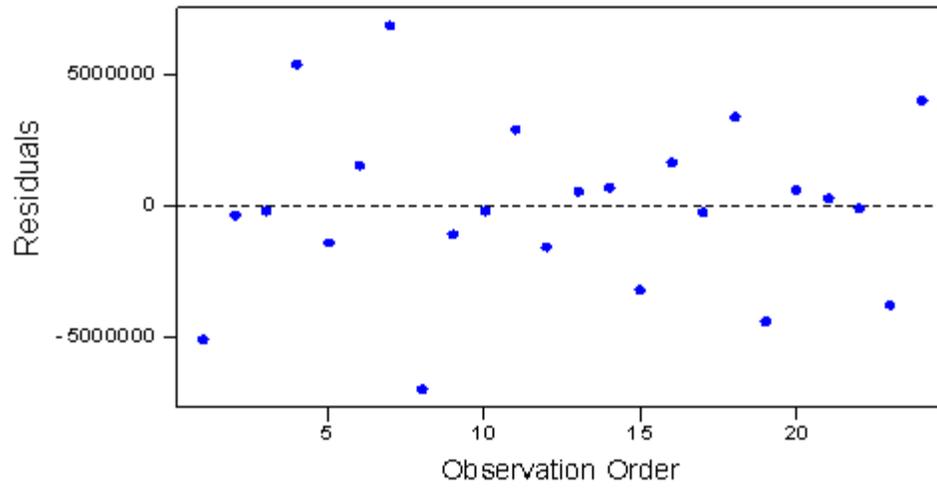
Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Temperat	1	2.5389E+14	2.5389E+14	2.5389E+14	14.59	0.002
Time	1	1.9097E+15	1.9097E+15	1.9097E+15	109.76	0.000
Salt	1	2.1393E+15	2.1393E+15	2.1393E+15	122.95	0.000
Temperat*Time	1	3.9774E+14	3.9774E+14	3.9774E+14	22.86	0.000
Temperat*Salt	1	1.1993E+13	1.1993E+13	1.1993E+13	0.69	0.420
Time*Salt	1	7.3346E+13	7.3346E+13	7.3346E+13	4.22	0.059
Temperat*Time*Salt	1	3.0030E+12	3.0030E+12	3.0030E+12	0.17	0.684
Blocks	2	1.0170E+15	1.0170E+15	5.0850E+14	29.23	0.000
Error	14	2.4359E+14	2.4359E+14	1.7399E+13		
Total	23	6.0495E+15				

Main Effects Plot - LS Means for Y

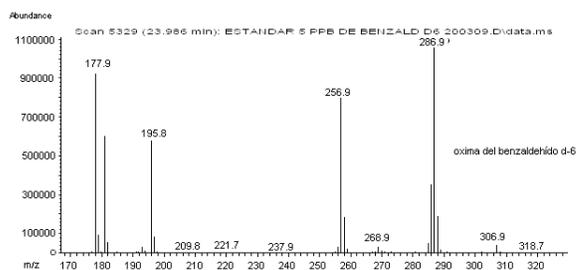
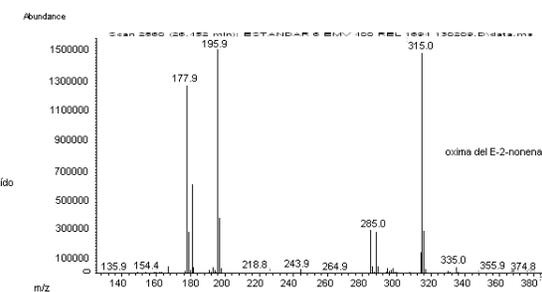
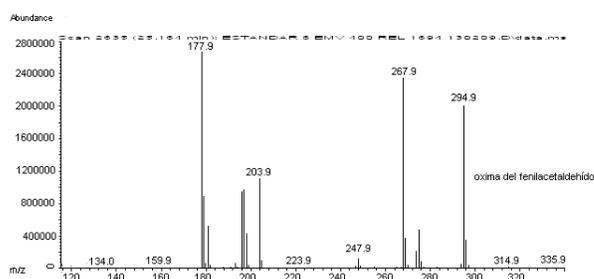
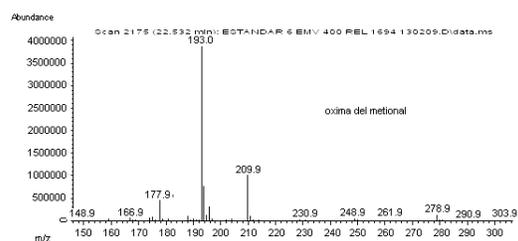
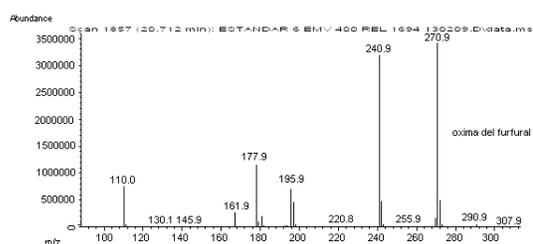
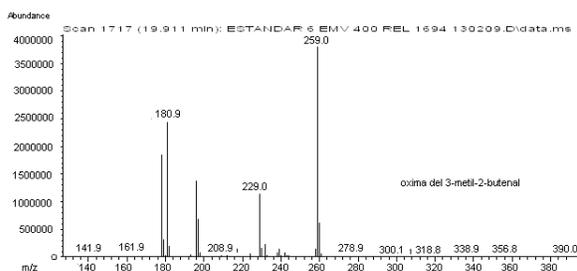
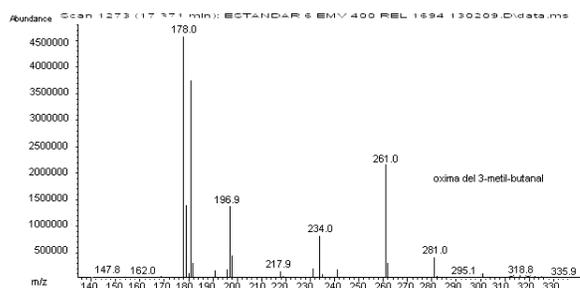
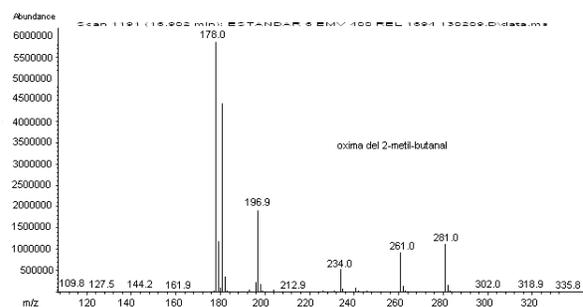
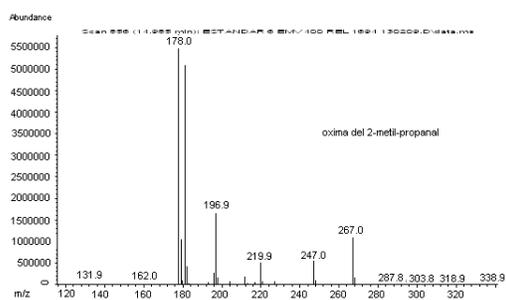




Residuals Versus the Order of the Data
(response is Y)

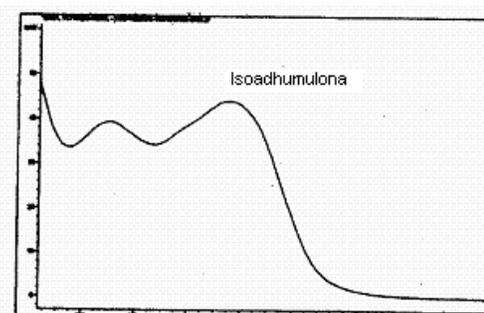
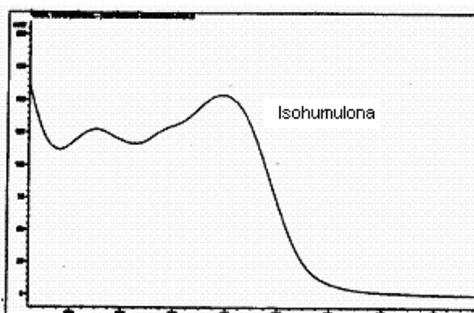
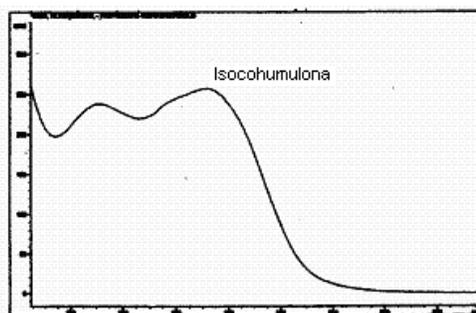
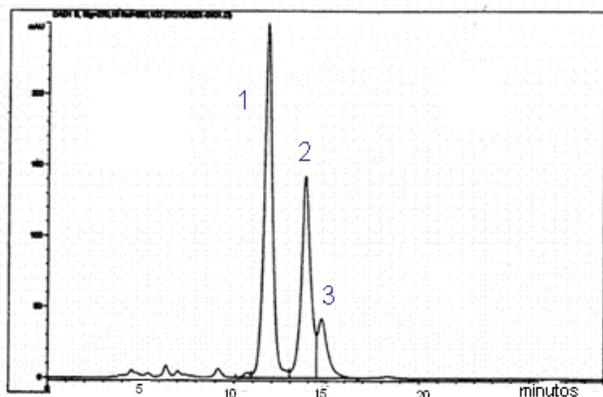


APÉNDICE C. Espectros de masas de las oximas obtenidos por ionización química negativa (NCI)



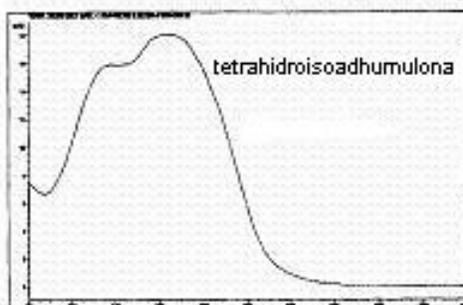
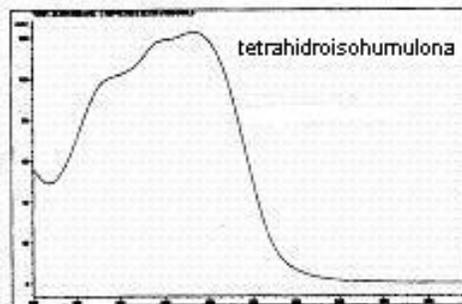
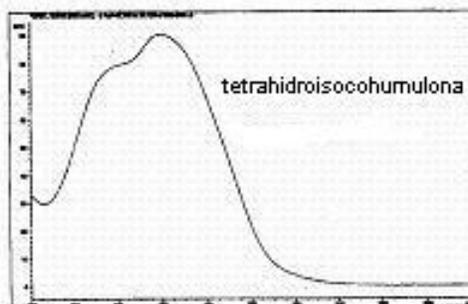
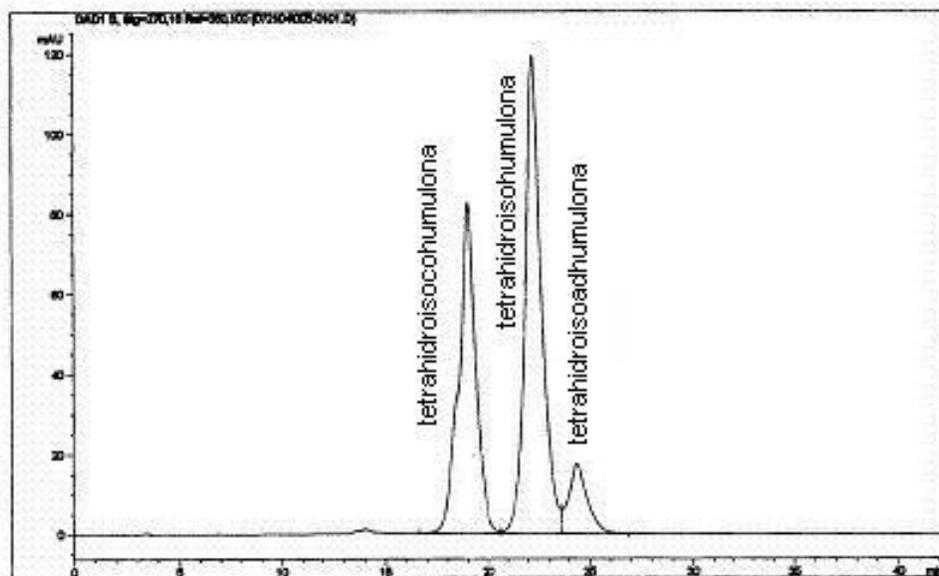
APÉNDICE D. Reportes de las fichas técnicas de los iso- α -ácidos modificados y sin modificar

D.1. Iso- α -ácidos



Reporte de la ficha técnica del estándar DCHA-Iso ICS-I2
Fase móvil: CH₃OH:H₂O:H₃PO₄:EDTA (75:24:1:0,1,v/v/v/v), Temperatura =35 °C
Columna: Nucleosil C18 250 mm x 4,6mm x5 μ m. Longitud de onda = 270 nm
Data acquired by Susan Mulqueen 7/21/04

D.2. Tetrahidro- iso- α -ácidos



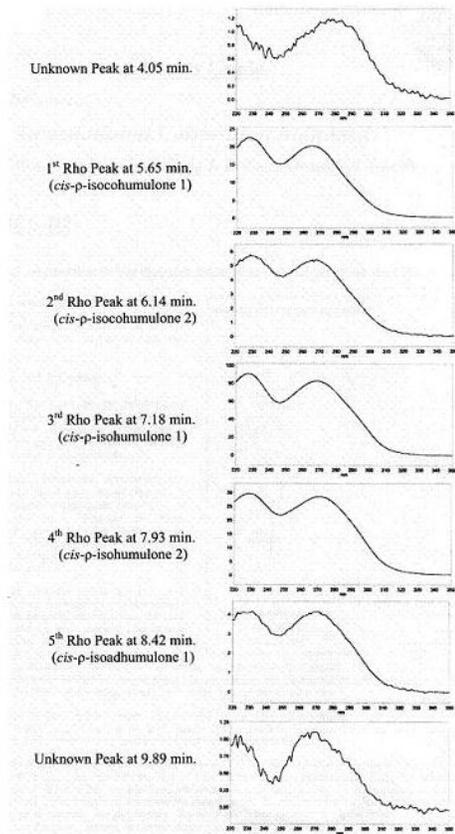
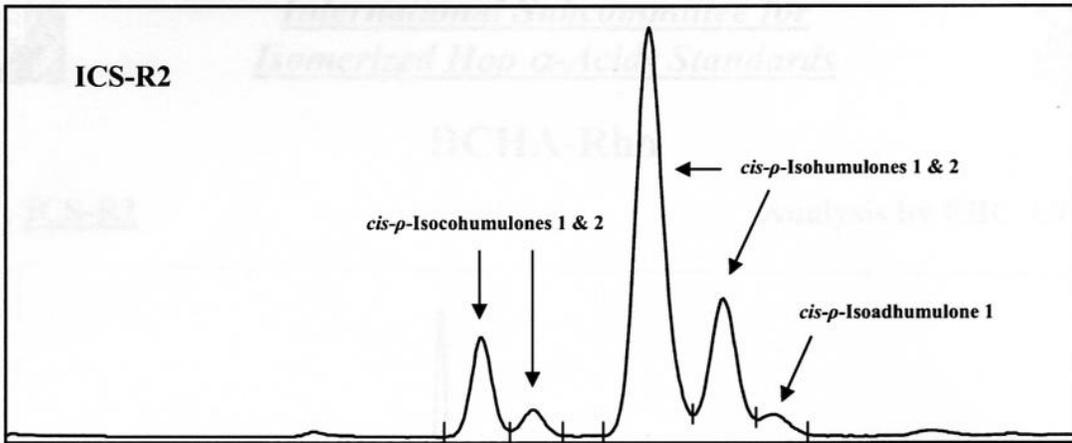
Reporte de la ficha técnica del estándar **Tetra ICS-T2**

Fase móvil: CH₃OH:H₂O:H₃PO₄:EDTA (75:24:1:0,1,v/v/v/v), Temperatura = 35 °C

Columna: Nucleosil C18 250 mm x 4,6mm x5 μ m. Longitud de onda = 270 nm

Data acquired by Susan Mulqueen 7/21/04

D.3. Rho-iso- α -ácidos



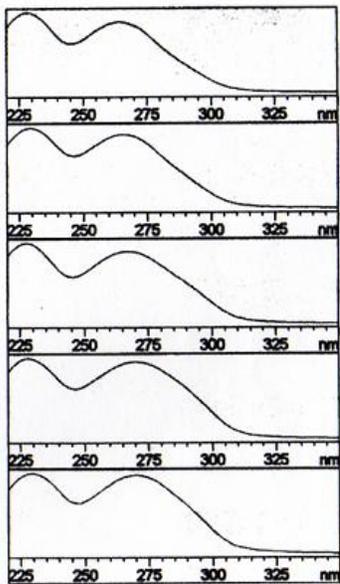
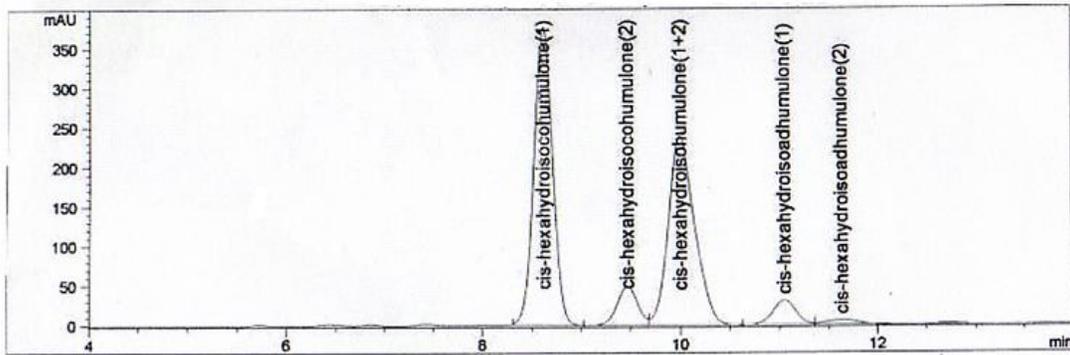
Reporte de la ficha técnica del estándar **DCHA-Rho, ICS-R2**

Fase móvil: CH₃OH:H₂O:H₃PO₄:EDTA (75:24:1:0,1,v/v/v/v), flujo =1,4 mL/min,

Temperatura= 40 °C

Columna: Synergi Hydro-RP C18 150 mm x 4,6mm x 4 μ m. Longitud de onda = 270 nm

D.4. Hexahidro-iso- α -ácidos



Reporte de la ficha técnica del estándar **DCHA-Hexa ICS-H1**

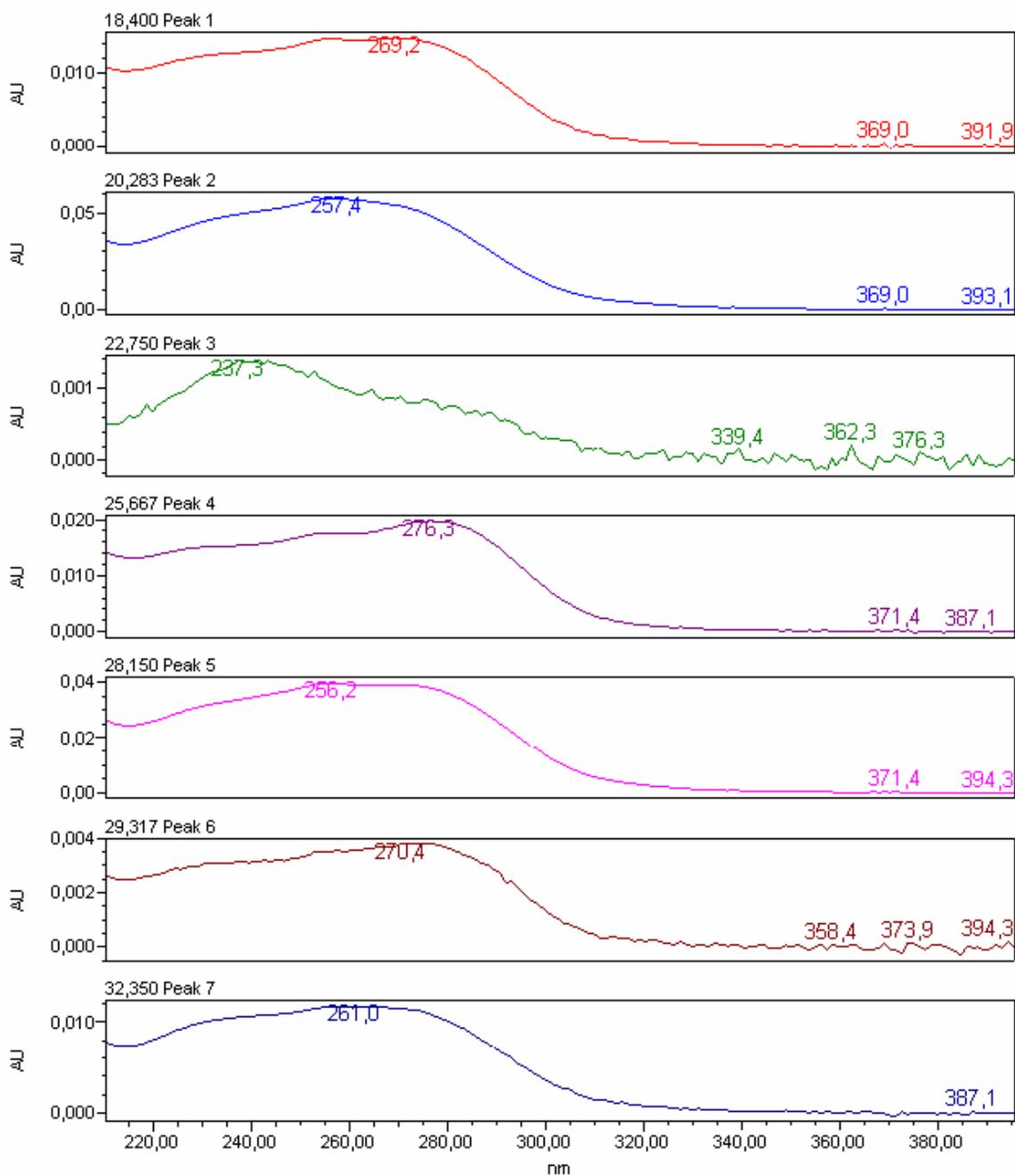
Fase móvil: CH₃OH:H₂O:H₃PO₄:EDTA (75:24:1:0,1,v/v/v/v), Temperatura= 35 °C

Columna: Nucleosil C18 250 mm x 4,6mm x 5 μ m. Longitud de onda = 270 nm

Data acquired by Mark M Bossert 2/23/01

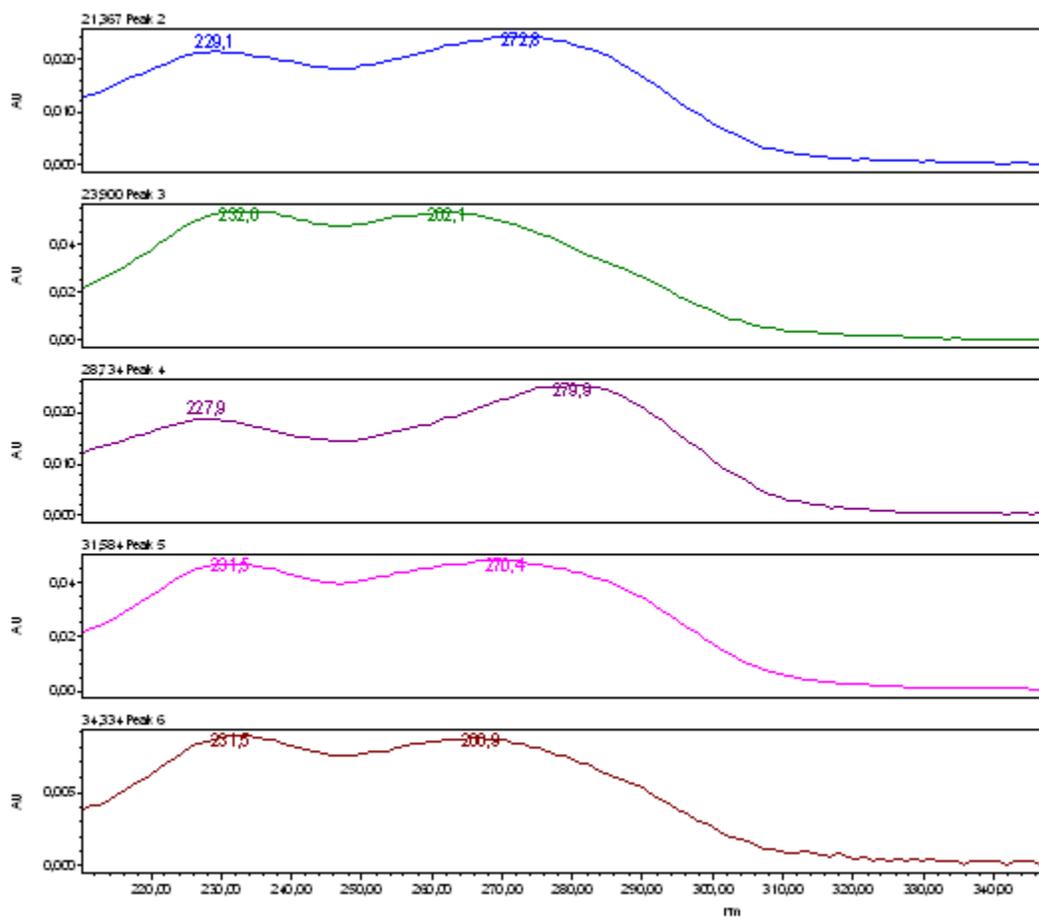
APÉNDICE E. Espectros UV obtenidos para cada grupo de iso- α -ácidos

E.1. Iso- α -ácidos



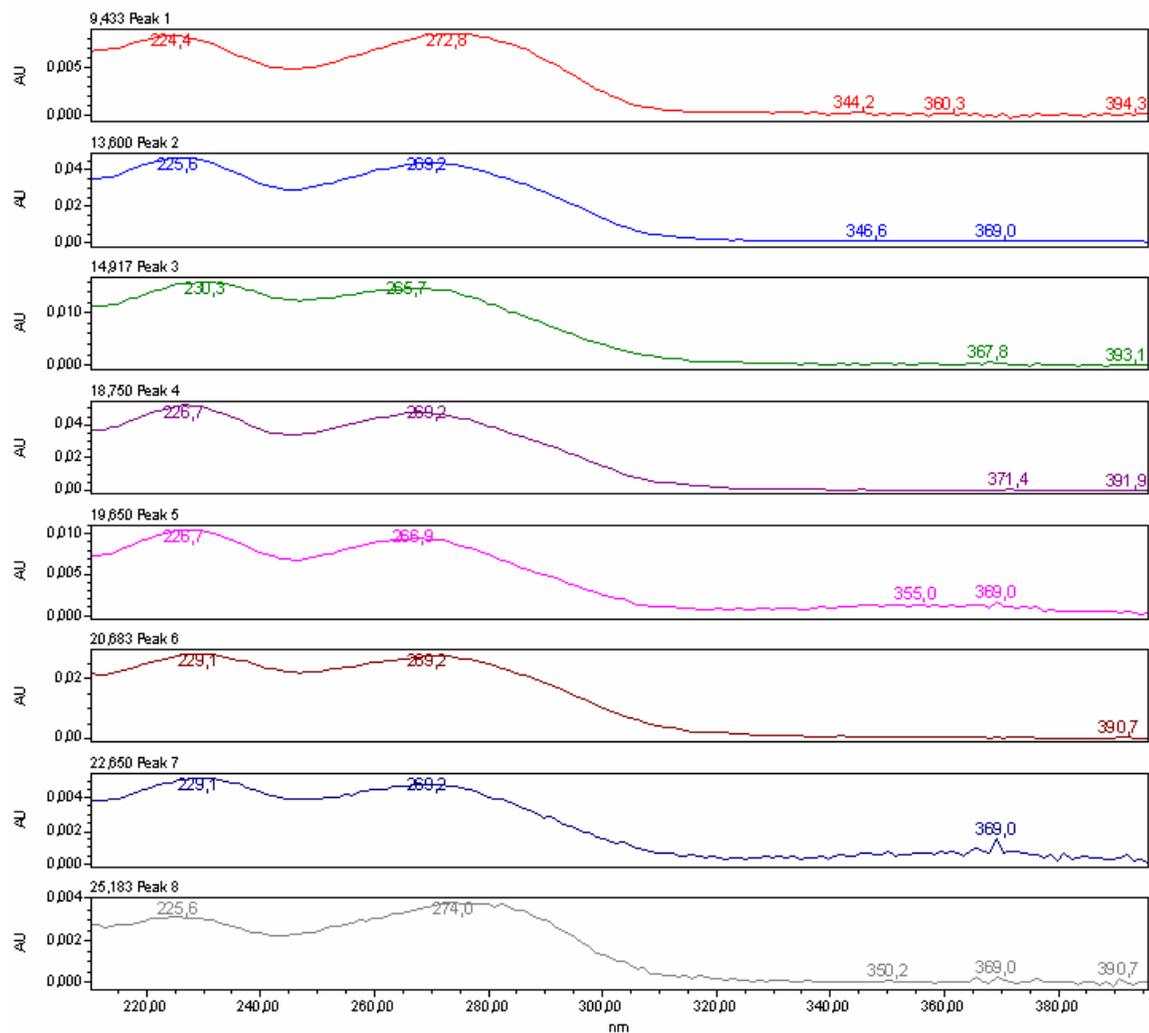
Espectros UV de los iso- α -ácidos separados con $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_3\text{PO}_4$ (45:46:9:0,08, v/v/v/v). Columna Atlantis dC18 150 x 4,6 mm x 5 μm , T:35°C, flujo: 1,2 mL min^{-1} . λ detección: 270 nm.

E.2. Tetrahidro-iso- α -ácidos



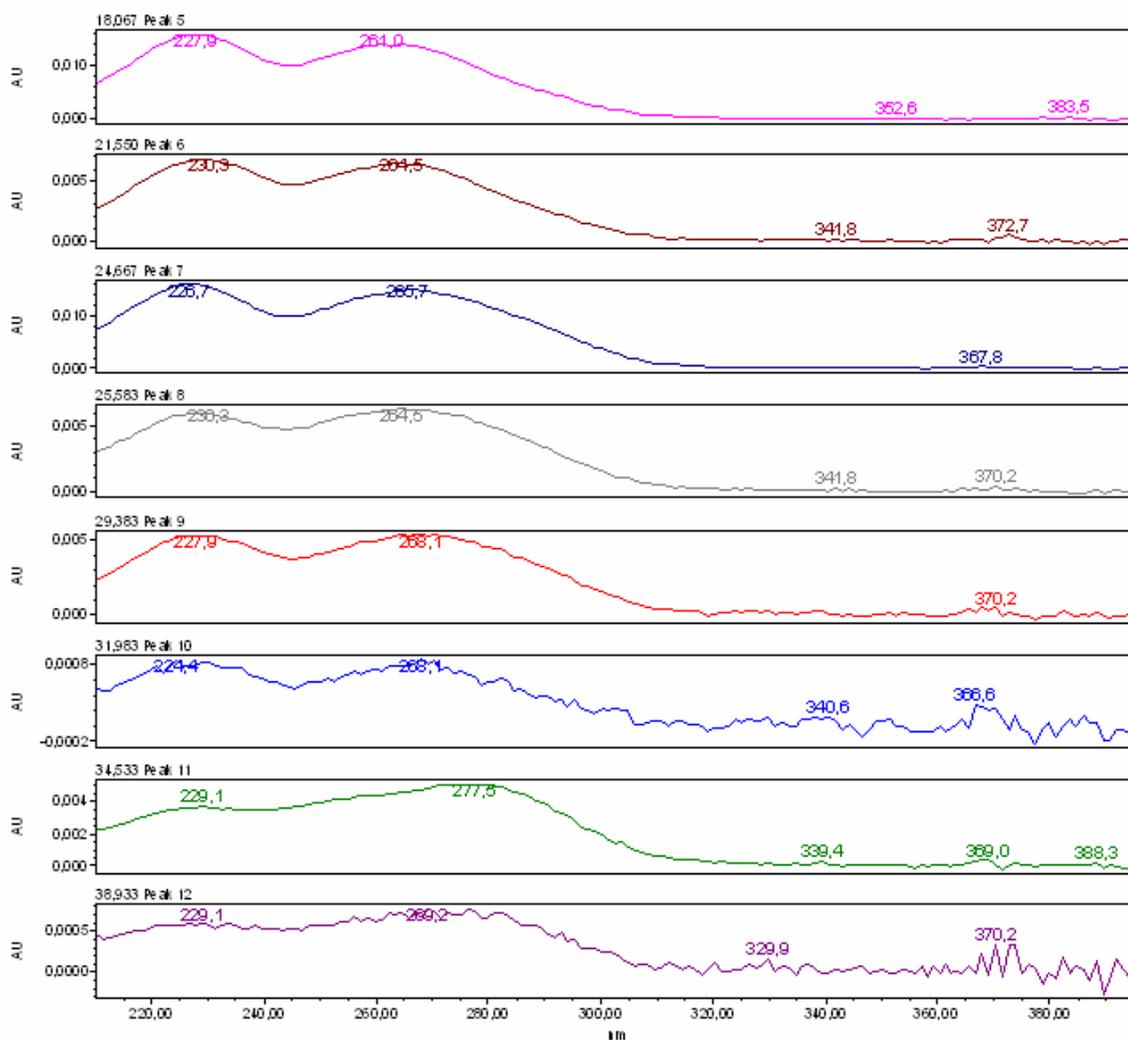
Espectros UV de las especies tetra separadas con $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}:\text{H}_3\text{PO}_4$ (55:45:0,3,v/v/v)
Columna Atlantis dC18 150 x 4,6 mm x 5 μm , T:35°C, flujo: 1,2 mL min^{-1} . λ detección: 270 nm.

E.3. Rho-iso- α -ácidos



Espectros UV de los rho-iso- α -ácidos empleando $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}:\text{H}_3\text{PO}_4(68:32:0,8, \text{ v/v/v})$.
Columna Atlantis dC18 150 x 4,6 mm x 5 μm , T:35°C, flujo: 1,2 mL min^{-1} . λ detección: 270 nm.

E.4. Hexahidro-iso- α -ácidos



Espectros UV de las especies hexahidro-iso- α -ácidos empleando $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}:\text{H}_3\text{PO}_4$ (70:30:0,8, v/v/v). Columna Atlantis dC18 150 x 4,6 mm x 5 μm , T:35°C, flujo: 1,2 mL min^{-1} . λ detección: 270 nm.

Application of Factorial Designs To Study Factors Involved in the Determination of Aldehydes Present in Beer by On-Fiber Derivatization in Combination with Gas Chromatography and Mass Spectrometry

Génesis Carrillo,[†] Adriana Bravo,^{*,‡} and Carsten Zufall[‡]

[†]Departamento de Química, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela

[‡]Departamento de Tecnología e Innovación, Cervecería Polar, Caracas, Venezuela

ABSTRACT: With the aim of studying the factors involved in on-fiber derivatization of Strecker aldehydes, furfural, and (*E*)-2-nonenal with *O*-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylamine in beer, factorial designs were applied. The effect of the temperature, time, and NaCl addition on the analytes' derivatization/extraction efficiency was studied through a factorial 2³ randomized-block design; all of the factors and their interactions were significant at the 95% confidence level for most of the analytes. The effect of temperature and its interactions separated the analytes in two groups. However, a single sampling condition was selected that optimized response for most aldehydes. The resulting method, combining on-fiber derivatization with gas chromatography–mass spectrometry, was validated. Limits of detections were between 0.015 and 1.60 μg/L, and relative standard deviations were between 1.1 and 12.2%. The efficacy of the internal standardization method was confirmed by recovery percentage (73–117%). The method was applied to the determination of aldehydes in fresh beer and after storage at 28 °C.

KEYWORDS: factorial design, aldehydes, beer, on-fiber derivatization, PFBHA

INTRODUCTION

A group of volatile aldehydes, some derived from the reaction of reducing sugars and amino acids and others generated from the degradation of fatty acids, may be produced during storage of beer on the shelf, thus deteriorating its flavor. Until relatively recent, Strecker aldehydes, derived from the decarboxylation and deamination of amino acids, were mainly considered as indicators of beer aging. Strecker aldehyde concentration increased significantly during beer storage, but the individual compounds rarely exceeded their flavor thresholds.¹ However, the latest studies have shown that Strecker aldehydes are important contributors to the formation of aged flavors in beers.^{2–4} Saison et al.² demonstrated that the addition of a mixture of Strecker aldehydes to a fresh beer at concentration levels found in aged beers contributed to the formation of aged notes (caramel, burnt, bread, cardboard, and stale-sulfury), suggesting important interactions between these aldehydes for the formation of the aged flavor. Other researchers^{3,4} have also found important flavor interactions between Strecker aldehydes, suggesting that they are not only indicators of beer aging but important contributors to flavor deterioration. Another relevant aldehyde is (*E*)-2-nonenal, which is produced from the oxidative degradation of fatty acids. There are differing results in the literature regarding (*E*)-2-nonenal influence on beer taste. Some authors⁵ found that the concentration of this aldehyde does not increase significantly during beer aging. Most recent studies have demonstrated that (*E*)-2-nonenal is responsible for the development of cardboard flavor^{2,3} and, as a consequence, does contribute to the formation of the aged flavor.^{2,4} Furthermore, furfural, which is formed from the degradation of reducing sugars, has been considered to be a good indicator of beer exposure to high temperatures.⁶

The concentrations of the above group of aldehydes in beer are very low, at trace levels; thus, their determination requires decreasing the interferences caused by most volatile compounds present in the beer matrix. An appropriate method for achieving this is selective derivatization of the carbonyl moiety. Different reagents have been used to derivatize the carbonyl group; among them *O*-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylamine (PFBHA) has been shown to be more reactive than pentafluorophenylhydrazine (PFPH), and the resulting derivatives of PFBHA derivatization are more volatile than those of PFPH.⁷ The former properties explain the extensive use of PFBHA as a carbonyl derivatizing reagent in beer. Furthermore, the combined use of derivatization and solid phase microextraction (SPME) has the advantage of decreasing analysis time when compared to the many steps associated with derivatization followed by liquid–liquid extraction. Three combinations of derivatization and SPME have been reported in the literature: (1) derivatization in the sample matrix followed by SPME extraction, either by headspace or by direct immersion;^{8–12} (2) simultaneous extraction and derivatization in the sample headspace;^{11,13–17} and (3) derivatization in the injection port.¹⁸

The most convenient combination for the determination of aldehydes in beer is simultaneous extraction and derivatization (on-fiber derivatization), which is very simple and easy to apply.^{13,14,17} In these works, the derivatizing reagent, PFBHA, is loaded on the fiber coating prior to analyte sampling. When the

Received: January 12, 2011

Revised: March 28, 2011

Accepted: April 3, 2011

Published: April 03, 2011

analyte reaches the coating, it reacts to produce the derivatives, syn and anti, directly on the fiber.

On-fiber derivatization combined with gas chromatography and mass spectrometry has provided appropriate selectivity (characteristic ions) and sensitivity (high ion abundances) in the electron impact mode as well as in the negative chemical ionization mode for the quantification of some aldehydes in beer. It has been reported that methional is one of the most difficult to detect aldehydes in beer.¹⁴ This may be related to the analyte's intrinsic properties such as volatility, Henry's law constant, and molecular structure, which may affect its extraction and derivatization processes. Given that each analyte will show a different behavior during extraction and derivatization,¹³ it is necessary to investigate the factors that affect these processes, and their overall significance, to optimize the analyte response. Most studies^{8,13,14} have used a univariate approach to determine the conditions that improve the efficiency of the analyte extraction. However, univariate analysis has two main limitations.^{19,20} First, it involves many experiments because each factor is optimized one at a time. Second, it does not allow the determination of whether the factors have interactions or not; this may lead to erroneous interpretations of analyte behavior and to the establishment of sampling conditions far from the optimum.

The objective of the present research was to study the factors that are involved in the process of simultaneous extraction and derivatization and their effect on the extraction efficiency of a group of aldehydes, Strecker aldehydes, furfural, and (*E*)-2-nonenal, with the aim of developing a reliable and rapid method for their quantification in beer. This was accomplished by the use of two experimental designs: (a) a factorial 2² design to study the effect of temperature and time on PFBHA fiber loading and (b) a factorial 2³ randomized-block design to study the effect of temperature, time, and NaCl addition on the derivatization/extraction efficiency. It was of special interest to obtain a rapid method with low detection limits for the quantification of aldehydes in fresh beer and in beers at early stages of aging at mild temperatures (28 °C), when very low concentration increments are expected to occur in relation to the fresh beer. The analytical method was validated using internal standardization, which allowed rapid and simple quantification of the aldehydes in beer. Finally, the method was applied to determine the analytes in fresh beer and after storage at 28 °C for 15 and 30 days.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. 2-Methylpropanal (≥97.7%) and phenylacetaldehyde (98.7%) were purchased from Chem Service (West Chester, PA). 2-Methylbutanal (95%) and 3-methylbutanal (97%) were purchased from Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany). 3-Methyl-2-butenal (97%) was obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). 2-Furaldehyde (99%), methional, and (*E*)-2-nonenal (97%) were purchased from Aldrich (Milwaukee, WI). Benzaldehyde-*d*₆ (98%, +0.1% hydroquinone) was purchased from Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA). *O*-(2,3,4,5,6-Pentafluorobenzyl)hydroxylamine hydrochloride (98%) was obtained from Aldrich (St. Louis, MO). Sodium chloride (99.5% p.a.) was purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Phosphoric acid (85% w/w) was purchased from Mallinckrodt Baker (Phillipsburg, NJ). Ethanol (99.9%) was obtained from Merck. Ultrapure water was taken from a Milli-Q water Millipore purification system (Billerica, MA).

Standard Solutions. Aldehyde standard solutions were prepared in ethanol 99.9% at a concentration of 1000 mg/L and stored at -20 °C.

Working solutions were prepared weekly from standard solutions using ethanol 5%. Standard solutions for optimization experiments and calibration were prepared on a daily basis from working solutions in ethanol (5%) and adjusted to pH 4.5 with H₃PO₄ (0.1%). Working solutions of PFBHA were prepared in Milli-Q water and stored at 0 °C.

SPME Fiber. SPME fibers with a 65 μm polydimethylsiloxane/divinylbenzene (PDMS-DVB) coating were purchased from Supelco (Bellefonte, PA). This fiber type was selected on the basis of prior research.¹⁴

Beer Samples. The samples were commercial Venezuelan Pilsner beer.

Instrumentation. Gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) analysis was performed utilizing an Agilent Technologies 7890 GC instrument (Wilmington, DE) by using a capillary HP-5MS (30 m × 0.25 mm i.d., 0.25 μm, Agilent Technologies) and a split/splitless injector held at 230 °C. Derivatized analytes desorption from the SPME fiber was performed during 2.5 min in splitless mode. The initial oven temperature was 40 °C, and the temperature was raised to 230 °C at a rate of 6 °C/min, giving a run time of 31.67 min. The carrier gas was helium at a constant flow rate of 1.3 mL/min. MS analysis was performed with an Agilent Technologies 5975C mass selective detector in the electron impact mode (70 eV), and the transfer line was kept at 280 °C. Mass range was adjusted between *m/z* 170 and 350, and selective ion monitoring (SIM) mode was used for aldehyde quantification.

On-Fiber Derivatization Procedure. Simultaneous extraction and derivatization comprises two steps: (1) PFBHA loading on the PDMS-DVB fiber, by exposing the coating to the headspace PFBHA solution, and (2) SPME sampling, by exposing the loaded fiber to sample headspace. Optimization of the main factors affecting both steps was carried out by means of the experimental designs described below.

Optimization of PFBHA Loading. Before the optimization of PFBHA loading, the appropriate concentration of the derivatizing reagent was determined. Different concentrations of PFBHA, ranging from 0.06 to 8 g/L, were assessed. PFBHA solutions (10 mL) were added to glass vials (20 mL) with Teflon-silicone caps and placed in a stirring hot plate (240 rpm, 40 °C). The SPME fiber (PDMS-DVB) was exposed to the headspace of the vial for 5 min and desorbed at the GC injection port. PFBHA loading effectiveness was evaluated by its chromatographic peak area. Loading factors, temperature and time, were subsequently evaluated by a factorial 2² experimental design, at the PFBHA concentration selected in the earlier experiment. For this experiment, loading temperature and loading time were varied at the two levels selected for the design: 30 and 40 °C and 5 and 10 min, respectively.

Optimization of SPME Sampling Conditions. Three factors were selected as potentially affecting the derivatization/extraction efficiency, namely, temperature, extraction time, and NaCl addition. To study the influence of these factors and their possible interactions, a factorial 2³ randomized-block experimental design was chosen. Response variables were the areas of the derivative aldehydes (syn and anti oximes). The experimental design was applied to both beer samples and aldehyde standard solutions (5% ethanol). For this experiment, temperature, extraction time, and NaCl addition were varied at the two levels selected for the design: 30 and 50 °C, 10 and 30 min, and 0 and 2.6 M, respectively.

Aldehyde standard solutions (2-methylpropanal, 2-methylbutanal, and 3-methylbutanal, 15 μg/L; furfural, 50 μg/L; (*E*)-2-nonenal, 0.1 μg/L; methional and phenylacetaldehyde, 20 μg/L) or beer samples (20 mL) were added to amber glass vials (40 mL) with Teflon-silicone caps, spiked with internal standard (30 μg/L, 3-methyl-2-butenal), and placed in a stirring hot plate (240 rpm). Each sample was equilibrated at the sampling temperature for 20 min and subsequently extracted according to the corresponding treatments specified in the design matrix.

Extraction Time Profiles. Extraction time profiles were studied for each of the analytes in standard solutions (ethanol 5%) as well as in beer, from 2 to 50 min, at the temperature and salt concentration selected in the experimental design. Beer samples were stored at 38 °C for 3 months before the study, to increase the aldehyde concentration

Table 1. Fragments Used for Aldehydes Quantification

PFBHA derivatized aldehyde	molecular mass (g/mol)	retention time (min)	ions m/z
2-methylpropanal	267	12.75	181, 195, 250
2-methylbutanal	281	14.70	181, 239
3-methylbutanal	281	15.05	181, 239
3-methyl-2-butenal (IS ^a)	279	17.50	181, 264, 279
furfural	291	18.50	291, 248
methional	299	20.44	299, 252
benzaldehyde- <i>d</i> ₆ (IS)	307	21.85	277, 307
phenylacetaldehyde	315	22.90	181, 297, 315
(<i>E</i>)-2-nonenal	335	24.40	181, 250

^a IS, internal standard.

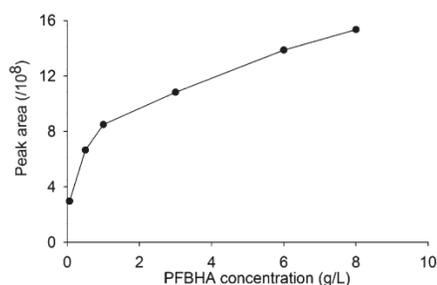


Figure 1. Effect of PFBHA concentration on its chromatographic peak area. Loading temperature, 40 °C; loading time, 5 min.

so that aldehyde spiking was not necessary before the analysis. Standard solution concentration and sample preparation were the same as in the above section. Each sample was equilibrated at the sampling temperature for 20 min and extracted at the different time points.

Method Validation. To determine the quality of the method, linearity, detection limit, repeatability, and recovery studies were performed for each analyte. Linear dynamic ranges were determined by external and internal standardization. Standard calibration solution (20 mL) was added to amber glass vials (40 mL) with Teflon–silicone caps, spiked with internal standards (30 µg/L, 3-methyl-2-butenal; and 3 µg/L, benzaldehyde-*d*₆) and placed in a stirring hot plate (240 rpm). Each solution was equilibrated at the sampling temperature for 20 min and subsequently extracted according to selected extraction conditions. Detection limits were determined according to IUPAC,²¹ the lowest analytical signal, y_L , was given by the equation $y_L = y_b + ks_b$. In this equation, y_b is the mean of the blank measures, s_b is their standard deviation, and k is a numerical factor chosen according to the confidence level desired. In the present case, $k = 3$, corresponding to a 95% confidence level. For the detection limits estimation, 10 measures on blank solutions (5% ethanol, at pH 4.5 adjusted with 0.1% H₃PO₄, and spiked with the internal standards) were performed.

Repeatability study was performed using standard solutions at two different concentration levels with five replicates. For recovery experiments, beer samples were spiked with aldehyde standard solutions at two concentration levels.

Table 2. 2² Factorial Design Matrix and Response Values^a

run	temperature	time	peak area (/10 ⁷)
1	−1	1	201.0
2	1	−1	209.2
3	−1	−1	172.8
4	1	1	191.5
5	−1	1	217.2
6	1	−1	219.6
7	1	−1	210.2
8	−1	−1	192.4
−1	30 °C	5 min	
1	40 °C	10 min	

^a Matrix generated by Minitab statistical software, two replicates.

RESULTS AND DISCUSSION

Aldehyde Identification. Compound identification was performed by mass spectrometry and electronic impact ionization in scan mode through the injection of each aldehyde standard derivatized with PFBHA. The quantification of the different aldehydes was carried out in the selective ion monitoring mode using combinations of the most characteristic ions and/or the most abundant (see Table 1). The sum of the syn and anti oxime areas for each aldehyde was considered as a chromatographic response. Furfural, methional, and benzaldehyde-*d*₆ coelutions were detected when the m/z 181 ion was used; therefore, minority ions were selected to monitor the oximes of these aldehydes.

PFBHA Loading Optimization. To determine the concentration of PFBHA solution that optimizes the loading of this reagent on the PDMS-DVB fiber, the effect of increasing PFBHA concentrations on its response area after 5 min of exposure at 40 °C was studied. Figure 1 shows that a PFBHA concentration of 6 g/L allows a fiber loading close to its maximum loading capacity. This concentration was then selected for the rest of the study.

The effects of temperature and time on PFBHA loading were studied using the 2² factorial design matrix shown in Table 2. The response variable of this experiment, PFBHA chromatographic area, is also presented in Table 2.

The analysis of variance (ANOVA) was applied to these results, and the validity of this model assumption was confirmed. The Anderson–Darling test and the normal probability plot of the residuals confirmed the normality of the errors. Bartlett's test was applied to assess the homogeneity of variances, and the plot of residuals versus the order of data confirmed the independence of residuals. The ANOVA showed that only the temperature had a P value of <0.05, indicating that it has a significant effect on the PFBHA loading. Temperature showed a positive effect on PFBHA peak area, indicating that an increase in the loading temperature produced a greater amount of derivatizing reagent being loaded on the fiber. Because time was not found to be a significant factor, a loading time of 5 min was chosen for the experiment. Consequently, the optimized conditions for PFBHA loading on the PDMS-DVB fiber were a temperature of 40 °C and a loading time of 5 min, using a 6 g/L PFBHA solution.

SPME Sampling Optimization. To study the influence of temperature, extraction time, and NaCl addition on the areas of the derivative aldehydes, a factorial 2³ randomized-block experimental

Table 3. 2³ Factorial Design Matrix^a

treatment	blocks	temperature	time	NaCl
1	1	-1	-1	-1
2	1	1	-1	1
3	1	1	1	-1
4	1	1	1	1
5	1	-1	-1	1
6	1	-1	1	-1
7	1	-1	1	1
8	1	1	-1	-1
9	2	1	1	1
10	2	1	1	-1
11	2	1	-1	-1
12	2	-1	1	-1
13	2	1	-1	1
14	2	-1	-1	1
15	2	-1	1	1
16	2	-1	-1	-1
17	3	1	-1	1
18	3	-1	-1	-1
19	3	1	1	1
20	3	-1	-1	1
21	3	1	1	-1
22	3	-1	1	-1
23	3	-1	1	1
24	3	1	-1	-1
-1		30 °C	10 min	0
1		50 °C	30 min	2.6 M

^a Generated by Minitab statistical software.

design was applied, being repetitions of the blocks of the experiments. The number of repetitions (r) was calculated according to the equation $(T - 1)(r - 1) \geq 12$, where T is the number of treatments (2³). Given that the factorial design with the three repetitions could not be performed in a single day, the complete design was executed in three blocks (one per day). This design allowed the elimination of "days" as a source of variability. Because each block consisted of a repetition of the experiment, it was possible to estimate all effects on the response variable. Table 3 shows the design matrix.

The validity of the model was confirmed by ANOVA assumptions for the responses of each oxime, as performed for PFBHA loading optimization. The results of this analysis are presented in Table 4. The experimental design was applied to beer samples as well as to aldehyde standard solutions (5% ethanol).

The design allowed assessment of main effects, interactions between them, and the block effect (day). Data processing was performed using Minitab statistical software. Results, as presented in Table 4, show that temperature, time, and NaCl addition were all significant for the vast majority of analytes; moreover, most interactions were also significant.

Temperature showed a negative effect for highly volatile aldehydes and a positive effect for the less volatile ones. This was confirmed by the time–temperature interaction results. In Figure 2a, referred to 2-methylbutanal, it can be observed that a sampling time increase causes a significant accretion of the oxime

Table 4. Main Effects, Interactions between Factors, and Block Effect for Every Analyte in Beer and Aldehyde Standard Solutions (5% Ethanol) for the Optimization of SPME Sampling^a

compound	matrix	main effects			interactions				block effect
		T	t	salt	salt	t	Tt	salt	
2-methylpropanal	1	-	+	+	-	+			yes
	2	-	+	+	-	-	+		yes
2-methylbutanal	1	-	+	+	-				yes
	2	-	+	+	-	-	+	-	yes
3-methylbutanal	1	+	+	+	+	+			no
	2		+	+	-	+	-		yes
3-methyl-2-butenal	1	-	+	+	-	+			yes
	2	-	+	+	-				no
furfural	1	-	+	+	-	+			yes
	2	-	+	+	-				no
methional	1	+	+	+	+	+	+	+	no
	2	+	+	+	+	+	+	+	no
phenylacetaldehyde	1	+	+	+	+	+	+	+	no
	2	+	+	+	+	+	+	+	no
(E)-2-nonenal	1	+	+	+	+	+	+		yes
	2	+	+	+	+	+	+		yes

^a Factors: T , temperature; t , time; salt, NaCl addition. Internal standard: 3-methyl-2-butenal. Matrix: 1, aldehyde standard solution; 2, beer. Significant effects at 95% confidence: +, positive effect; -, negative effect.

response at lower temperature. A similar behavior was observed for 2-methylpropanal, 3-methyl-2-butenal, and furfural. Conversely, with phenylacetaldehyde (Figure 2b) the oxime response was enhanced significantly at higher temperature. This behavior was also observed for methional and (E)-2-nonenal. The effect of temperature on the oxime response was positive for 3-methylbutanal only in the standard solution, but its effect was not significant when it was in beer. This behavior was exceptional considering that this aldehyde is a volatile compound. However, the interaction plots for this analyte (Figure 4c,d) revealed an important interaction between temperature and time, which indicates that 3-methylbutanal response is also enhanced at lower temperature and longer extraction time.

Time and NaCl addition were found to have a positive effect on the oxime response for all analytes in both beer and standard solution. In the case of NaCl addition, the result indicates that an increase in the ionic strength of the matrix will increase the distribution constant of the aldehydes to the headspace; this is known as a salting-out effect. NaCl addition showed a positive interaction with sampling time, which implies that oxime response significantly increases at longer sampling time when NaCl is present in the matrix. A significant interaction between NaCl addition and temperature was also observed, which was dependent

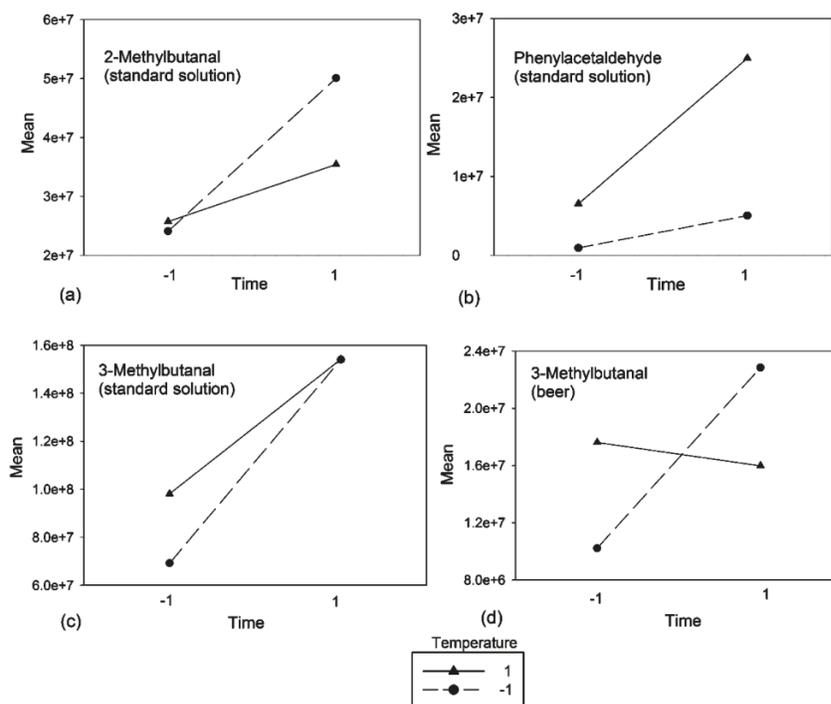


Figure 2. Time–temperature interaction plots in aldehyde standard solutions (a–c) and beer (d).

on aldehyde and/or oxime volatility. For highly volatile aldehydes, a negative interaction was observed in beer, whereas a positive interaction was obtained for the lower volatile aldehydes, both in beer and in standard solution. This behavior confirms the observed effect of the temperature on oxime response as well as the effect of the interactions between temperature and other factors.

The applied design revealed that temperature and its interactions with other factors allowed separating the analytes into two groups according to the significance, positive or negative, regardless of the matrix, beer or standard solutions. The first group, with negative significance, comprises the higher volatile aldehydes: 2-methylpropanal, 2-methylbutanal, 3-methylbutanal, 3-methyl-2-butenal, and furfural. The vapor pressures of these aldehydes are between 1 and 2 orders of magnitude greater than those of aldehydes from group 2.²² The same tendency would be expected to occur in the corresponding PFBHA derivatives. The former would explain, for aldehydes in group 1, the decrease of oxime responses at higher temperature, probably as a result of oxime desorption from fiber. The second group, with positive significance of temperature and its interactions, comprises the lower volatile aldehydes: methional, phenylacetaldehyde, and (*E*)-2-nonenal. For this group, with low vapor pressures, an increase of temperature seems to favor the distribution equilibrium of the aldehydes toward the headspace with no effect on oxime desorption from fiber, thus obtaining an increase in oxime response.

Statistical analyses demonstrated that, for most analytes, the effect of the day was significant (Table 4, block effect), indicating the relevance of the application of the randomized-block design. Additionally, the selection of the appropriate number of repetitions

assured the precision of the study of the factors and their interactions in the process of aldehyde simultaneous extraction and derivatization.

Even though the study suggests that aldehydes in beer shall be determined at two different sampling temperatures, according to their vapor pressure, this would significantly increase analysis time and reagent consumption. Consequently, the use of a single condition for all aldehydes is proposed, performing the extraction and derivatization at 30 °C during 30 min, in the presence of NaCl. These conditions optimize the response of the higher volatile aldehydes, including the internal standard, but reduce the extraction efficiency of phenylacetaldehyde, methional, and (*E*)-2-nonenal.

Extraction Time Profiles. Extraction time profiles allowed the formation rate of the different derivatives, in beer and standard solutions, to be examined under the sampling conditions established in the previous section. It was of special interest to determine whether the formation of the oximes reaches a plateau during the sampling time. Figure 3 shows the extraction time profile for the different analytes. It can be seen that no plateau was attained for any of the analytes during the 50 min of analysis. For 2-methylpropanal, 2-methylbutanal, 3-methylbutanal, and furfural in beer, the formation rate was faster during the first 10 min and progressively slowed through 40 min. In standard solution, the formation rate for these analytes was slower than in beer. A different behavior was observed for phenylacetaldehyde, methional, and (*E*)-2-nonenal; in beer and in standard solution derivatives the formation rate was almost constant throughout the 60 min of sampling time.

When the formation rates of the different groups of analytes are compared, it is observed that oximes of highly volatile

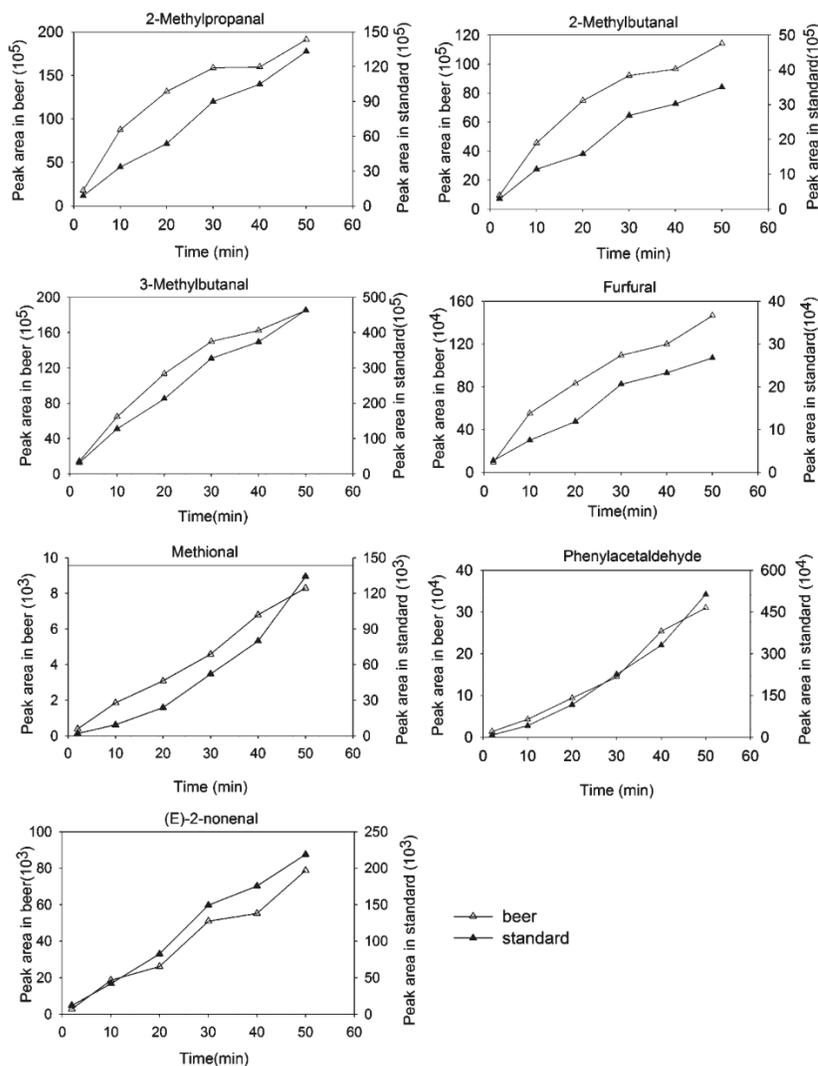


Figure 3. Extraction time profiles for the oximes of aldehydes in beer and standard solutions. Extraction temperature: 30 °C, 3 g (2.6 M) NaCl.

aldehydes are formed at a higher rate than those of methional and phenylacetaldehyde, in both beer and standard solution. The same behavior was observed for these analytes in a previous study.¹³ This behavior can be explained by the differences in aldehyde affinity for the aqueous solution. It is expected that methional and phenylacetaldehyde have a greater affinity for the aqueous solution, given their lower Henry's law constant. In the case of the higher volatile aldehydes, they distribute rapidly from the aqueous solution to the headspace during the first minutes of extraction. Then the oxime formation rate decreases, probably as a result of the reduction of aldehyde concentration in the headspace because of their reaction with PFBHA.

The extraction time profiles showed that a plateau condition was not observed for any of the analytes during the 50 min of sampling. This indicates that a precise control of the extraction

time is critical for the quantification because small variations in it may lead to significant variations in oxime response areas. In the case of highly volatile aldehydes this factor is less critical given that their formation rate tends to be slower at the selected extraction time (30 min).

Method Validation. Method validation was performed under the sampling conditions established above. Table 5 shows quality parameters using internal standardization method. The linear dynamic range was determined for all analytes except for methional, phenylacetaldehyde, and (*E*)-2-nonenal, the upper limits of which were established at lower values than the actual linear dynamic range. However, dynamic ranges were broad enough to include aldehyde concentrations found in any beer.

The use of 3-methyl-2-butenal as internal standard allowed better correlation coefficients to be obtained for all aldehydes

Table 5. Linearity, Detection Limit, Quantification Limit, and Repeatability of the Optimized Method Using 3-Methyl-2-butenal as Internal Standard

aldehyde	linearity		LOD ($\mu\text{g/L}$)	LOQ ($\mu\text{g/L}$)	repeatability RSD (%) ($n = 5$)	
	range ($\mu\text{g/L}$)	R^2			low level	high level
2-methylpropanal	0.4–75	0.9978	0.11	0.40	2.7 (0.3) ^a	1.1 (75)
2-methylbutanal	0.1–50	0.9987	0.03	0.11	3.9 (0.1)	3.6 (50)
3-methylbutanal	0.3–50	0.9972	0.09	0.30	3.0 (0.5)	7.4 (50)
furfural	5–300	0.9993	1.60	5.20	5.4 (5)	9.1 (300)
methionial	1–20	0.9941	0.30	1.00	7.6 (3)	8.0 (20)
phenylacetaldehyde	0.6–20	0.9975	0.23	0.76	12.2 (0.8)	6.3 (20)
		0.9982 ^b	0.17 ^b	0.55 ^b	9.5 (0.8) ^b	7.8 (20) ^b
(<i>E</i>)-2-nonenal	0.05–0.25	0.9967	0.015	0.05	5.6 (0.04)	8.9 (0.25)

^a The values in parentheses indicate the actual concentration ($\mu\text{g/L}$) of the aldehyde at each level. ^b Values corrected with benzaldehyde- d_6 as internal standard.

compared with the values obtained without this correction (data not shown). Additionally, the correction of the internal standard compensated for the loss of linearity observed for 2-methylpropanal, 2-methylbutanal, and 3-methylbutanal. The use of an aromatic internal standard (benzaldehyde- d_6) was also tested for the correction of phenylacetaldehyde variations during extraction and derivatization steps. It can be observed in Table 5 that the use of benzaldehyde- d_6 also showed good linearity. No optimization experiments were performed for the use of this internal standard because it was available only at the final stage of the research.

In Table 5, the figures of merit for each aldehyde can be observed. Low detection and quantification limits were obtained for all aldehydes, considering the concentration of these analytes found in fresh beer. Twenty-eight percent lower limits were obtained for phenylacetaldehyde using benzaldehyde- d_6 as internal standard. Detection and quantification limits obtained in the present work are comparable to those reported in the literature.^{13–16}

An estimation of the precision of the method is given by repeatability, which was determined at two concentration levels as shown in Table 5. Good relative standard deviation (RSD) values were obtained for all analytes, ranging from 1.1 to 12.2%, which indicate a good precision when compared with similar SPME methods.^{10,13,14} The highest RSD value (12.2%) was obtained for the lower concentration level of phenylacetaldehyde when 3-methyl-2-butenal was used as internal standard. The use of benzaldehyde- d_6 improves this RSD value to 9.5%.

To evaluate the interference of beer matrix components in the analytical determination, the analyte recovery was determined at two aldehyde concentration levels,²³ and the results are shown in Table 6. Recovery values are reported using two calibration methods, internal and external standardization, to evaluate the effectiveness of internal standards. In Table 6, it can be noted that the use of internal standards significantly improves analyte recovery. Recovery percentage obtained by external calibration is in the range from 24 to 210%, whereas internal calibration recovery ranges between 73 and 117%. Recovery values below 85% were obtained only for 2-methylpropanal, 3-methylbutanal, phenylacetaldehyde (corrected with benzaldehyde- d_6), and (*E*)-2-nonenal at the lower concentration level. It is important to mention that phenylacetaldehyde determination can be

Table 6. Recovery Results of Spiking Aldehydes in Beer Samples Using 3-Methyl-2-butenal as Internal Standard

aldehyde	standardization method	recovery (%)	
		low level	high level
2-methylpropanal	internal	79 (5) ^a	104 (20)
	external	24 (5)	57 (20)
2-methylbutanal	internal	88 (5)	85 (10)
	external	88 (5)	74 (10)
3-methylbutanal	internal	78 (5)	80 (20)
	external	89 (5)	72 (20)
furfural	internal	97 (50)	102 (100)
	external	92 (50)	97 (100)
methionial	internal	87 (6)	90 (15)
	external	77 (6)	210 (15)
phenylacetaldehyde	internal	80 (5) ^b	90 (15) ^b
		87 (5)	100 (15)
	external	80 (5)	75 (15)
(E)-2-nonenal	internal	73 (0.05)	117 (0.15)
	external	74 (0.05)	99 (0.15)

^a Values in parentheses indicate the spike concentration ($\mu\text{g/L}$). ^b Values corrected with benzaldehyde- d_6 as internal standard.

performed using any of the two internal standards studied, 3-methyl-2-butenal or benzaldehyde- d_6 . 3-Methyl-2-butenal showed to be a good internal standard for both aliphatic and aromatic aldehydes. Its effectiveness may be associated with the selected extraction conditions, which seem to be favorable for this compound.

Quantification of Aldehydes in Beer. The analytical method was applied to determine the concentration of aldehydes in fresh beer and after storage at 28 °C for 15 and 30 days. Concentration

Table 7. Aldehyde Concentration in Fresh Beer and in Beer after Storage at 28 °C for 15 and 30 Days

compound	aldehyde concentration ^a (µg/L)		
	fresh beer	beer 15 days at 28 °C	beer 30 days at 28 °C
2-methylpropanal	1.90 ± 0.12	6.2 ± 0.4	7.7 ± 0.2
2-methylbutanal	0.58 ± 0.03	1.09 ± 0.05	1.16 ± 0.02
3-methylbutanal	0.58 ± 0.04	1.52 ± 0.05	1.88 ± 0.07
furfural	25.7 ± 1.5	28.9 ± 0.9	59.3 ± 4.2
methional	nq	1.0 ± 0.1	1.69 ± 0.04
phenylacetaldehyde	1.3 ± 0.3	1.45 ± 0.05	1.7 ± 0.1
(E)-2-nonenal	0.04 ± 0.01	0.0647 ± 0.0003	0.078 ± 0.002

^a Concentrations are reported as means of triplicate experiments ± one standard deviation. nq, not quantifiable.

values are presented in Table 7. It was confirmed that the quantification limits for all aldehydes were satisfactory for the determination of these analytes at the low concentrations found in fresh beer, except for methional, the concentration of which was slightly below the quantification limit. The method can be applied for the study of the changes in aldehyde concentrations during the beer aging process.

We have demonstrated in this work that the application of factorial designs allowed, in a simple way, the study of factors involved in simultaneous extraction and derivatization and the selection of conditions for the determination of Strecker aldehydes, furfural, and (E)-2-nonenal in beer. Under the selected conditions, quality parameters of the internal standardization method were shown to be satisfactory for the determination of all analytes in beer, comparable to those obtained by the application of the standard addition method.^{13,14} The application of the internal standardization method to the quantification of aldehydes in beer was consistent with the finding that the behavior of the analytes during the extraction/derivatization was similar in beer samples and in ethanolic standard solutions. The study of principal factors and their interactions was shown to be useful for comparing the behavior of the analytes in different matrices and could help in the selection of the most convenient standardization method.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Phone: +58 212 202 3905. Fax: +58 212 202 3065. E-mail: adriana.bravo@empresas-polar.com.

■ ACKNOWLEDGMENT

We gratefully acknowledge Cerveceria Polar for the permission to publish this work.

■ ABBREVIATIONS USED

PFBHA, O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylamine; PFPH, pentafluorophenylhydrazine; SPME, solid phase microextraction; PDMS-DVB, polydimethylsiloxane/divinylbenzene; SIM, selective ion monitoring; GC-MS, gas chromatography–mass spectrometry; ANOVA, analysis of variance; RSD, relative standard deviation.

■ REFERENCES

- (1) Thum, B.; Miedaner, H.; Narziss, L.; Back, W. Formation of staling carbonyls. *Proc. Eur. Brew. Conv.* **1995**, 491–498.
- (2) Saison, D.; De Schutter, D.; Uyttenhove, B.; Delvaux, F.; Delvaux, F. R. Contribution of staling compounds to the aged flavour of lager beer by studying their flavour thresholds. *Food Chem.* **2009**, *114*, 1206–1215.
- (3) Herrmann, M.; Klotzbücher, B.; Wurzbacher, M.; Hanke, S.; Kattein, U.; Back, W.; Becker, T.; Krottenthaler, M. A new validation of relevant substances for the evaluation of beer aging depending on the employed boiling system. *J. Inst. Brew.* **2010**, *116*, 41–48.
- (4) Guedes de Pinho, P.; Silva Ferreira, A. C. Role of Strecker aldehydes on beer flavour stability. In *Flavour Science: Recent Advances and Trends*, 1st ed.; Bredie, W. L. P., Petersen, M. A., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2006; pp 529–532.
- (5) Schieberle, P.; Komarek, D. Changes in key aroma compound during natural beer aging. In *Freshness and Shelf Life of Foods*; Cadwallader, K. R., Weenens, H., Eds.; American Chemical Society: Washington, DC, 2002; pp 70–79.
- (6) Narziss, L.; Miedaner, H.; Lustig, S. Das Verhalten flüchtiger Aromastoffe bei der Alterung des Bieres (The behaviour of volatile aromatic substances as beer ages). *Monatsschr. Brauwiss.* **1999**, *52*, 164–175.
- (7) Ojala, M.; Kotiaho, T.; Siirila, J.; Sihvonen, M. L. Analysis of aldehydes and ketones from beer as O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylamine derivatives. *Talanta* **1994**, *41*, 1297–1309.
- (8) Wardencki, W.; Sowiński, P.; Curylo, J. Evaluation of headspace solid-phase microextraction for the analysis of volatile carbonyl compounds in spirits and alcoholic beverages. *J. Chromatogr., A* **2003**, *984*, 89–96.
- (9) Bao, M. L.; Pantani, F.; Griffini, O.; Burrini, D.; Santianni, D.; Barbieri, K. Determination of carbonyl compounds in water by derivatization-solid-phase microextraction and gas chromatographic analysis. *J. Chromatogr., A* **1998**, *809*, 75–87.
- (10) Cancho, B.; Ventura, F.; Galceran, M. T. Determination of aldehydes in drinking water using pentafluorobenzylhydroxylamine derivatization and solid-phase microextraction. *J. Chromatogr., A* **2002**, *943*, 1–13.
- (11) Beránek, J.; Kubátová, A. Evaluation of solid-phase microextraction methods for determination of trace concentration aldehydes in aqueous solution. *J. Chromatogr., A* **2008**, *1209*, 44–54.
- (12) Saison, D.; De Schutter, D. P.; Delvaux, F.; Delvaux, F. R. Determination of carbonyl compounds in beer by derivatization and headspace solid-phase microextraction in combination with gas chromatography and mass spectrometry. *J. Chromatogr., A* **2009**, *1216*, 5061–5068.
- (13) Saison, D.; De Schutter, D. P.; Delvaux, F.; Delvaux, F. R. Optimisation of a complete method for the analysis of volatiles involved in the flavour stability of beer by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography and mass spectrometry. *J. Chromatogr., A* **2008**, *1190*, 342–349.
- (14) Vesely, P.; Lusk, L.; Basarova, G.; Seabrooks, J.; Ryder, D. Analysis of aldehydes in beer using solid-phase microextraction with on-fiber derivatization and gas chromatography/mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 6941–6944.
- (15) Tsai, S. W.; Chang, C. M. Analysis of aldehydes in water by solid-phase microextraction with on-fiber derivatization. *J. Chromatogr., A* **2003**, *1015*, 143–150.
- (16) Wang, Q.; O'Reilly, J.; Pawliszyn, J. Determination of low-molecular mass aldehydes by automated headspace solid-phase microextraction with in-fibre derivatisation. *J. Chromatogr., A* **2005**, *1071*, 147–154.
- (17) Martos, P.; Pawliszyn, J. Sampling and determination of formaldehyde using solid-phase microextraction with on fiber derivatization. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 2311–2320.
- (18) Stashenko, E. E.; Martinez, J. R. Derivatization and solid-phase microextraction. *Trends Anal. Chem.* **2004**, *23*, 553–561.

- (19) Pulido, H. G.; de la Vara, R. Diseños factoriales. In *Análisis y Diseño de Experimentos*, 1st ed.; McGraw-Hill: Mexico City, 2004; pp 155–158.
- (20) Czitrom, V. *Am. Stat.* **1999**, *53*.
- (21) IUPAC Compendium of Chemical Terminology, 1997; <http://goldbook.iupac.org/L03540.html> (retrieved December 2010).
- (22) <http://msds.chem.ox.ac.uk/> (retrieved December 2010).
- (23) Supelco, *Bulletin* 929; <http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Supelco/Bulletin/11143.Par.0001.File.tmp/11143.pdf> (retrieved December 2010).