

**TRABAJO ESPECIAL DE GRADO**

**MEJORAMIENTO DE LA METODOLOGÍA DE PREPARACIÓN DE  
MUESTRAS HOMOGENEAS Y ESTABLES PARA ESTUDIOS  
INTERLABORATORIOS DEL MÉTODO DE MEDICIÓN DE OXÍGENO  
EN CERVEZA**

Presentado ante la Ilustre  
Universidad Central de Venezuela  
Por la Br. Pájaro S., Jailin del C.  
Para optar al Título  
De Ingeniero Químico

Caracas, 2012

## **TRABAJO ESPECIAL DE GRADO**

# **MEJORAMIENTO DE LA METODOLOGÍA DE PREPARACIÓN DE MUESTRAS HOMOGENEAS Y ESTABLES PARA ESTUDIOS INTERLABORATORIOS DEL MÉTODO DE MEDICIÓN DE OXÍGENO EN CERVEZA**

Tutor Industrial: Ing. Omar D. Padrón C.

Tutor Académico: Prof. Luis V. García B.

Presentado ante la Ilustre  
Universidad Central de Venezuela  
Por la Br. Pájaro S., Jailin del C.  
Para optar al Título  
De Ingeniero Químico

Caracas, 2012

Caracas, Noviembre 2012

Los abajo firmantes, miembros del Jurado designado por el Consejo de Escuela de Ingeniería Química, para evaluar el Trabajo Especial de Grado presentado por la Bachiller Jailin Del Carmen Pájaro Suarez, titulado:

**MEJORAMIENTO DE LA METODOLOGÍA DE PREPARACIÓN DE  
MUESTRAS HOMOGENEAS Y ESTABLES PARA ESTUDIOS  
INTERLABORATORIOS DEL MÉTODO DE MEDICIÓN DE OXÍGENO  
EN CERVEZA**

Considera que el mismo cumple con los requisitos exigidos por el plan de estudio conducente al título de Ingeniero Químico, y sin que esto signifique que se hacen solidarios con las ideas expuestas por el autor, lo declaran **APROBADO**

---

Prof. Franca Gambino

Jurado

---

Prof. Trino Romero

Jurado

---

Prof. Luis V. García B.

Tutor Académico

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar a Dios por su eterno apoyo y compañía.

A mis padres Lilian y Jaime por su amor y constancia, por ustedes soy la mujer que logra sus sueños.

A mis hermanos Jaidierlin y Jaiderson, por los momentos compartidos.

A la Universidad Central de Venezuela, por todos los conocimientos que me permitió adquirir a lo largo de la carrera.

A la Ing. Eliana Orduz, por darme la oportunidad de demostrar mis capacidades a través de mi tesis en Empresas Polar C.A.

A mi Tutor Industrial Ing. Omar Padrón, por su continuo interés en la ejecución de esta investigación y su infinita paciencia, eternamente agradecida.

A mis compañeros de trabajo: Marcia, Blanca, Luís, Juan y Leonardo por el apoyo brindado durante la realización del estudio.

A mi querido Profesor y Tutor Académico Luís García, por sus consejos y recomendaciones a lo largo del desarrollo de la investigación.

Finalmente al Ing. Simón Medina, por ser el sonido incansable de la conciencia en mis oídos, ocupando un lugar importante e intransferible en mi corazón.

**Pájaro S. Jailin Del C.**

**MEJORAMIENTO DE LA METODOLOGÍA DE PREPARACIÓN DE  
MUESTRAS HOMOGÉNEAS Y ESTABLES PARA ESTUDIOS  
INTERLABORATORIOS DEL MÉTODO DE MEDICIÓN DE OXÍGENO  
EN CERVEZA**

**Tutor Académico: Prof. Luís V. García B. Tutor Industrial: Ing.  
Omar D. Padrón C.**

**Tesis. Caracas, U.C.V. Facultad de Ingeniería. Escuela de  
Ingeniería Química. Año 2012, 80p.**

**Palabras Claves:** Cervecerías Polar C.A, oxígeno disuelto en cerveza, muestras homogéneas, muestras estables, estudios interlaboratorios.

**Resumen.** El aseguramiento de la calidad de los resultados es una parte importante dentro de un Sistema de Gestión de Calidad. Una de las herramientas empleadas para ello es el estudio interlaboratorio. Actualmente en Cervecería Polar C.A., se dispone de una muestra homogénea y estable para realizar estudios interlaboratorios del método de medición de oxígeno en cerveza, a través de la generación de tres niveles de concentración de oxígeno. Sin embargo, se desea mejorar la repetibilidad y reproducibilidad de las muestras puesto que la variabilidad debido a la combinación de estos factores, es considerado alto. Por ello se planteó como objetivo del presente trabajo mejorar la metodología de preparación de muestras homogéneas y estables para la utilización en estos estudios, con la finalidad de garantizar que cualquier variación obtenida se deba al sistema de medición y no a la muestra, pudiendo de esta manera disminuir las dispersiones debido a r&R. Para lograr esto, se evaluó la influencia de la agitación y la temperatura en la determinación del oxígeno disuelto en cerveza, con el fin de conocer si el tipo de agitación y el rango de temperaturas establecidos en el método vigente eran los más adecuados. Los resultados obtenidos permitieron evaluar 4 metodologías para lograr la generación de los 3 niveles de concentración de oxígeno: por adición de agua antes del tapado, por inyección de agua después del tapado, a partir de la implementación de campana a la metodología actual y a través de muestras sintéticas. Siendo la metodología de adición de agua antes del tapado la mejor muestra desarrollada, logrando una disminución del error debido a r&R de 4,33 % en comparación con la metodología actual; permitiendo cambiar la categoría de ubicación del método de marginal a bueno, según los criterios de Gutiérrez y de La Vara para evaluación de métodos de ensayo (2004).

# TABLA DE CONTENIDO

|  |     |
|--|-----|
| LISTADO DE TABLAS .....  | xii |
| LISTADO DE FIGURAS .....   | xiv |
| INTRODUCCIÓN.....  | 1   |
| CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO  |     |
| 1.1. Cerveza.....  | 3   |
| 1.1.1. Tipos de cerveza .....  | 3   |
| 1.2. Producción de cerveza.....  | 4   |
| 1.2.1 Llenadora.....   | 7   |
| 1.2.2. Proceso de llenado de botellas .....  | 7   |
| 1.3. Sistema de gestión de calidad.....  | 9   |
| 1.3.1. ISO/IEC 17025:2005 Requisitos generales para la<br>competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración ..... | 9   |
| 1.3.2. Requisitos técnicos para lograr el aseguramiento de la<br>calidad.....  | 10  |
| 1.3.3. Validación de metodologías de ensayos .....   | 10  |
| 1.4. Estudios interlaboratorios .....  | 12  |

|   |    |
|---|----|
| 1.5. Sistema de medición de oxígeno disuelto en cerveza.....  | 13 |
| 1.6. Antecedentes de la investigación .....   | 15 |
| 1.6.1. Fundamentos teóricos para el cálculo de oxígeno total en cerveza (Vilacha C. & Uhlig K., 1985) .....   | 16 |
| 1.6.2. Desarrollo de una muestra homogénea y estable para estudios interlaboratorios del método de medición de oxígeno (De Amorín, 2005) .....  | 18 |
| 1.6.3. Evaluación de los factores que afectan la variabilidad de los resultados durante la implementación de campana a la metodología actual de preparación de muestras homogéneas y estables para medición de oxígeno en cerveza (Soprano, 2010). .... | 20 |

## CAPÍTULO II: FUNDAMENTOS DE LA INVESTIGACIÓN

|                                       |    |
|---------------------------------------|----|
| 2.1. Planteamiento del Problema ..... | 23 |
| 2.2. Objetivos .....                  | 24 |
| 2.2.1. Objetivo General.....          | 24 |
| 2.2.2. Objetivos Específicos.....     | 24 |
| 2.2.3. Limitaciones.....              | 25 |
| 2.2.4. Alcances .....                 | 25 |

## CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO

|                                 |    |
|---------------------------------|----|
| 3.1. Tipo de investigación..... | 26 |
|---------------------------------|----|

|  |    |
|--|----|
| 3.2. Diseño de la investigación.....   | 27 |
| 3.3. Definición de la población .....  | 27 |
| 3.3.1. Definición de la muestra: Muestra probabilística .....  | 27 |
| 3.3.1.1. Cantidad de muestras requeridas provenientes<br>de la Cervecería Polar, Planta Los Cortijos.....  | 28 |
| 3.3.1.2. Variables .....   | 28 |
| 3.4. Instrumentos de recolección de información .....  | 29 |
| 3.5. Técnicas de recolección de datos .....  | 29 |
| 3.5.1 Evaluación de factores del método de medición<br>de oxígeno .....  | 30 |
| 3.5.1.1. Estudio de la influencia de la agitación de<br>la muestra .....   | 31 |
| 3.5.1.2. Evaluación de la influencia de la temperatura .....   | 33 |
| 3.5.1.3 Evaluación de campana utilizando como gas<br>de purga nitrógeno y dióxido de carbono en la preparación<br>de las muestras .....                                      | 34 |
| 3.6. Desarrollo de muestras utilizando como matriz cerveza .....   | 35 |
| 3.6.1. Metodología actual de preparación de muestras<br>homogéneas y estables para estudios interlaboratorios del<br>método de medición de oxígeno disuelto en cerveza ..... | 36 |

|   |    |
|---|----|
| 3.6.2. Generación de niveles por adición de agua antes del tapado en campana con gas inerte .....     | 36 |
| 3.6.3. Generación de niveles por inyección de agua después del tapado en campana con gas inerte ..... | 38 |
| 3.6.4. Generación de niveles a partir de la implementación de campana a la metodología actual .....   | 39 |
| 3.6.5.1. Generación de tres concentraciones de oxígeno utilizando sales reductoras .....              | 41 |

#### CAPÍTULO IV: ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

|   |    |
|---|----|
| 4.1. Análisis de factores del método de medición de oxígeno.....  | 44 |
| 4.1.1. Análisis de los distintos tipos de agitación .....   | 44 |
| 4.1.2. Análisis del rango de temperaturas .....   | 46 |
| 4.1.3. Análisis de la evaluación de campana utilizando como gas de purga nitrógeno y dióxido de carbono en la preparación de las muestras ..... | 47 |
| 4.2. Análisis del desarrollo de muestras utilizando como matriz cerveza.....  | 49 |
| 4.2.1. Generación de niveles por adición de agua antes del tapado en campana con gas inerte .....   | 49 |
| 4.2.2. Generación de niveles por inyección de agua después del tapado en campana con gas inerte .....   | 53 |

|  |    |
|--|----|
| 4.2.3. Generación de niveles según la metodología actual .....   | 55 |
| 4.2.4. Generación de niveles a partir de la Implementación<br>de campana a la metodología actual.....  | 58 |
| 4.3 Análisis de las pruebas realizadas para el desarrollo<br>de la metodología de preparación de muestras sintéticas .....   | 60 |
| 4.3.1. Estabilidad del patrón .....  | 61 |
| 4.3.2. Evaluación del método de llenado.....   | 61 |
| 4.3.3. Evaluación de la temperatura de calentamiento .....   | 63 |
| 4.3.4. Análisis de la concentración del ácido a utilizar .....   | 64 |
| 4.3.5. Análisis de la evaluación de los catalizadores (HCl y calor)....  | 66 |
| 4.3.6. Análisis de los resultados a partir de la aplicación de la<br>metodología de muestras sintéticas .....  | 67 |
| 4.4. Comparación de las metodologías desarrolladas con<br>respecto a la metodología actual.....  | 71 |
| 4.5. Estudio de repetibilidad y reproducibilidad .....   | 73 |
| 4.5.1. Comparación de metodologías adición de agua<br>antes del tapado en campana con gas inerte, implementación<br>de campana a la metodología actual y muestras sintéticas ..... | 74 |
| CONCLUSIONES.....  | 77 |
| RECOMENDACIONES .....  | 78 |

|  |    |
|--|----|
| BIBLIOGRAFÍA.....  | 80 |
| APENDICES.....   | 82 |
| Apéndices A. Metodología de referencia desarrollada por<br>la ASBC.....          | 82 |
| Apéndice B. Evaluación del método de llenado para nitrito<br>de sodio.....       | 83 |
| Apéndice C. Estabilidad del patrón..   | 84 |
| Apéndice D. Estudio de repetibilidad y reproducibilidad de las<br>muestras ..... | 85 |
| Apéndice E. Criterios para la evaluación de métodos de ensayo .....              | 86 |

## LISTADO DE TABLAS

|   |    |
|---|----|
| TABLA N° 1: Evaluación de los distintos tipos de agitación .....                    | 44 |
| TABLA N° 2: Evaluación del rango de temperaturas (20±3)°C.....                      | 46 |
| TABLA N° 3: Evaluación del gas inerte a utilizar .....                              | 47 |
| TABLA N° 4: Repetibilidad. Metodología adición de agua antes del tapado.....        | 50 |
| TABLA N° 5: Estabilidad. Metodología de adición de agua antes del tapado.....       | 51 |
| TABLA N° 6: Repetibilidad. Metodología inyección de agua después del tapado .....   | 53 |
| TABLA N° 7: Estabilidad. Metodología inyección de agua después del tapado .....     | 54 |
| TABLA N° 8: Repetibilidad. Metodología actual .....                                 | 55 |
| TABLA N° 9: Estabilidad. Metodología actual.....                                    | 57 |
| TABLA N° 10: Repetibilidad. Implementación de campana a la metodología actual ..... | 58 |
| TABLA N° 11: Estabilidad. Implementación de campana a la metodología actual .....   | 59 |
| TABLA N° 12: Evaluación del método de llenado.....                                  | 62 |

|   |    |
|---|----|
| TABLA N° 13: Evaluación de la temperatura de calentamiento.....                                     | 63 |
| TABLA N° 14: Análisis de la concentración del ácido.....  | 65 |
| TABLA N° 15: Análisis de la evaluación de catalizadores .....                                       | 66 |
| TABLA N° 16: Prueba 1. Generación de niveles de concentración<br>de oxígeno.....                    | 68 |
| TABLA N° 17: Prueba 2. Generación de niveles de concentración<br>de oxígeno.....                    | 68 |
| TABLA N° 18: Repetibilidad. Muestra sintética.....  | 69 |
| TABLA N° 19: Estabilidad. Muestras sintéticas .....   | 70 |
| TABLA N° 20: Comparación de metodologías desarrolladas con<br>respecto a la metodología actual..... | 72 |
| TABLA N° 21: Comparación de metodologías propuestas para el<br>estudio r&R.....                     | 74 |
| TABLA N° 22. Resultados del estudio r&R.....  | 76 |
| TABLA N° 23: Estabilidad del patrón.....  | 84 |
| TABLA N° 24: Criterios para la evaluación de métodos de ensayo .....                                | 86 |

## LISTADO DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| FIGURA 1. Etapa 1 Proceso de elaboración de la cerveza.<br>Fuente: Velazco, 2011.....   | 4  |
| FIGURA 2. Etapa 2 Envasado y despacho del producto terminado.<br>Fuente: Polar, 2012.....   | 6  |
| FIGURA 3. Etapas del proceso de llenado. Fuente: Polar, 2012. ....  | 8  |
| FIGURA 4. Equipo utilizado para la medición de oxígeno disuelto en<br>cerveza. Fuente: Propia .....   | 13 |
| FIGURA 5. (1) Luminiscencia sin presencia de oxígeno<br>(2) Luminiscencia con presencia de oxígeno.<br>Fuente: Haffmans, 2007 .....               | 14 |
| FIGURA 6. Diagrama causa-efecto. Fuente: Propia.....  | 29 |
| FIGURA 7. Esquema de la investigación. Fuente: Propia .....   | 30 |
| FIGURA 8. Esquema de la trayectoria del movimiento que<br>debe seguir la botella al realizar la agitación manual simple.<br>Fuente: Propia.....   | 32 |
| FIGURA 9. Esquema de la trayectoria del movimiento que<br>debe seguir la botella al realizar la agitación manual vigorosa.<br>Fuente: Propia..... | 33 |
| FIGURA 10. Dispersión obtenida durante la evaluación de<br>los tipos de agitación. Fuente: Propia.....  | 45 |

|  |    |
|--|----|
| FIGURA 11. Evaluación del rango de temperaturas (20±3)°C.<br>Fuente: Propia .....  | 47 |
| FIGURA 12. Evaluación del gas de purga para la implementación<br>de campana a la metodología actual. Fuente: Propia .....                                | 48 |
| FIGURA 13. Evaluación de la repetibilidad para la metodología<br>de adición de agua antes del tapado. Fuente: Propia .....                               | 51 |
| FIGURA 14. Metodología de adición de agua antes del tapado<br>en campana con gas inerte. Fuente: Propia .....  | 52 |
| FIGURA 15. Evaluación de repetibilidad para la metodología de<br>inyección de agua después del tapado en campana con gas<br>inerte. Fuente: Propia ..... | 53 |
| FIGURA 16. Metodología de inyección de agua después del<br>tapado. Fuente: Propia .....  | 55 |
| FIGURA 17. Evaluación de la repetibilidad para la metodología<br>actual de cambio de tapa. Fuente: Propia .....  | 56 |
| FIGURA 18. Metodología actual de cambio de tapa. Fuente: Propia ...  | 57 |
| FIGURA 19. Evaluación de la repetibilidad para la implementación<br>de campana a la metodología actual. Fuente: Propia .....                             | 59 |
| FIGURA 20. Implementación de campana a la metodología actual.<br>Fuente: Propia .....  | 60 |
| FIGURA 21. Estabilidad del patrón sintético. Fuente: Propia .....  | 61 |

|   |    |
|---|----|
| FIGURA 22. Evaluación del método de llenado para el sulfito de sodio. Fuente: Propia .....                        | 62 |
| FIGURA 23. Evaluación de la temperatura de calentamiento. Fuente: Propia .....                                    | 64 |
| FIGURA 24. Evaluación de la concentración del HCl. Fuente: Propia .....   | 65 |
| FIGURA 25. Evaluación de catalizador $T=40^{\circ}\text{C}$ y $[\text{HCl}]=0,01\text{ N}$ . Fuente: Propia ..... | 66 |
| FIGURA 26. Evaluación de la repetibilidad de las muestras sintéticas. Fuente: Propia .....                        | 69 |
| FIGURA 27. Estabilidad de las muestras sintéticas. Fuente: Propia ....  | 70 |
| FIGURA 28. Comparación de metodologías. Fuente: Propia .....  | 73 |
| FIGURA 29. Evaluación del método de llenado para nitrito de sodio. Fuente: Propia .....                           | 83 |
| FIGURA 30. Estudio R&R metodología adición de agua antes de enchapar. Fuente: Propia .....                        | 85 |

## INTRODUCCIÓN

El contenido de oxígeno disuelto en cerveza es uno de los parámetros de control más importantes en el proceso de envasado, debido a que puede afectar las propiedades organolépticas del producto, comprometiendo su calidad. Es por ello, que la industria cervecera además de los controles de calidad internos realiza controles de calidad externos para lograr el aseguramiento de los resultados mediante estudios interlaboratorios. Los estudios interlaboratorios son estudios en el que varios laboratorios realizan mediciones de una o más porciones idénticas de materiales homogéneos y estables, como parte del Sistema de Gestión de Calidad (SGC).

Actualmente, en Cervecería Polar C.A se utiliza una metodología de preparación de muestras para interlaboratorios del método de medición de oxígeno, que consiste en la elaboración de muestras homogéneas y estables empleando cerveza en las cuales se generan 3 niveles de concentración de oxígeno mediante la inyección de aire por medio de una jeringa de cromatografía de gases. Con estas muestras se ha obtenido como resultado un error debido a la repetibilidad y reproducibilidad (r&R) de 24%. Dicho valor representa una mejora en cuanto al resultado reportado por la American Society of Brewing Chemists (ASBC), el cual fue de 48% (ver apéndice A). Sin embargo, el valor de r&R aún es muy alto puesto que la variabilidad de las muestras puede afectar el resultado del estudio. (De Amorín, 2005)

En base a la necesidad de disminuir el r&R, se planteó como propósito de este trabajo de investigación el mejoramiento de la metodología de preparación de muestras homogéneas y estables para estudios interlaboratorios del método de medición de oxígeno en

cerveza, mediante la comparación de 4 metodologías con respecto a la de uso actual. Una de ellas fue el desarrollo de una muestra sintética basada en reacciones químicas. Las otras tres metodologías, consistieron en la elaboración de la muestra empleando cerveza bajo diferentes condiciones en una campana de atmósfera inerte.

# CAPÍTULO I

## MARCO TEÓRICO

### 1.1. Cerveza

La cerveza es una bebida alcohólica no destilada elaborada a base de granos de cereales, como la cebada por ejemplo, cuyo componente de almidón será modificado para ser luego fermentado y aromatizado con lúpulo para impartirle aroma y sabor amargo. Entre sus principales características se encuentran: abundante espuma blanca, presencia de gas carbónico y un grado alcohólico generalmente entre 3-9 % volumen. (Covenin, 2002)

#### 1.1.1. Tipos de cerveza

Existen varios criterios de clasificación. El más moderno es el criterio funcional, según el cual existen sólo dos tipos de cervezas:

- **Refrescancia:**
  - Son cervezas ligeras, color amarillo pálido a profundo y brillantes.
  - Sacian la sed, el amargo es suave y delicado.
  - El nivel de alcohol va de 3,5 a 5,0 % vol.
  - Normalmente se utilizan adjuntos para aumentar la tomabilidad.
  - Son de agradable recuerdo y media / alta carbonatación.
  - La temperatura de consumo va de los 2,0 a 8,0 °C.
- **Deleite:**
  - El color va de dorado profundo al negro opaco.
  - Alcohol mayor al 5,0%, carbonatación media-baja, para disfrutarla con comidas gourmet.
  - Temperatura de consumo entre los 8,0 - 17 °C.

## 1.2. Producción de cerveza

La producción de cerveza se divide en dos etapas: la elaboración de cerveza y envasado y despacho del producto (Polar, 2012).

- **Etapa 1: Elaboración de la cerveza:**

La elaboración de la cerveza se lleva a cabo mediante una serie de procesos como se muestra en la Figura 1:

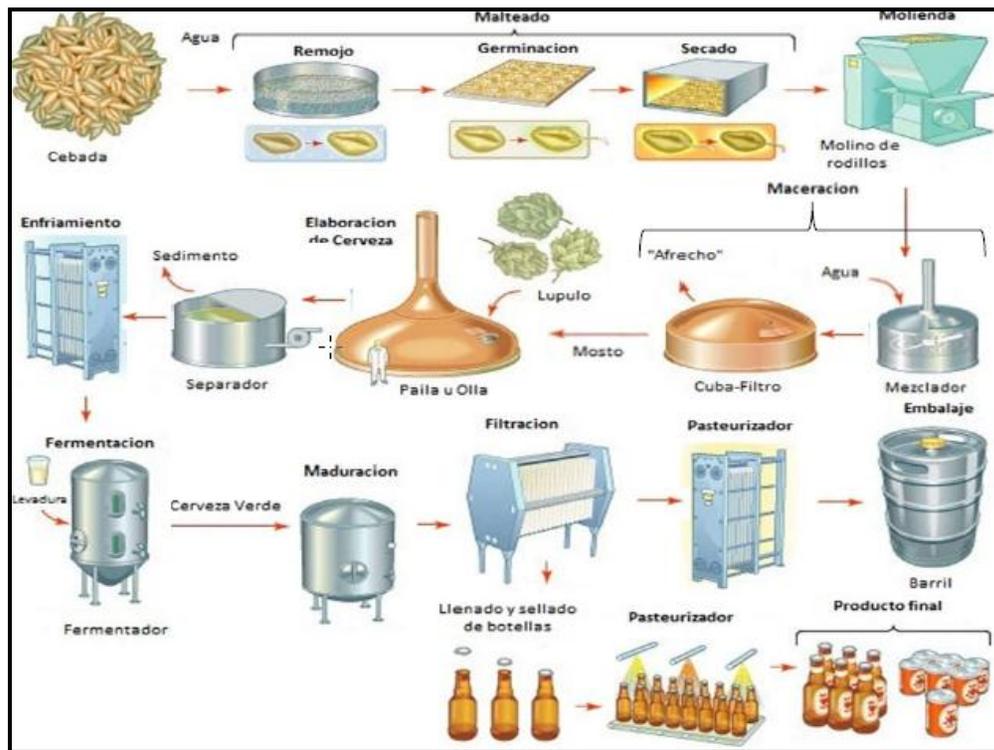


FIGURA 1. Proceso de elaboración de la cerveza (Etapa 1). Fuente: Velazco, 2011.

Entre los procesos principales de elaboración se encuentran los siguientes:

- **El malteado:** Consiste en transformar la cebada en malta. Está compuesto por 3 etapas donde el grano crece y desarrolla el sabor:

el remojo donde se le agrega agua, la germinación donde el grano de cebada brota y comienza el proceso de crecimiento, y el secado y tostado en donde se detiene el proceso de germinación y se le da el color deseado.

- **Maceración:** Es la extracción, mediante cocción en agua, de las sustancias valiosas de la malta y demás materias primas adjuntas previa trituración de las mismas. La finalidad de la maceración es la conversión de los almidones de los cereales en sustancias más simples y susceptibles de solubilizarse y fermentarse tales como el azúcar de malta y otros compuestos de bajo peso molecular.
- **Fermentación:** El proceso de fermentación se desarrolla en recipientes metálicos refrigerados denominados fermentadores, a los cuales llega el mosto frío junto con la cantidad de levadura calculada para el volumen de mosto a fermentar. La fermentación comienza cuando se une la levadura con el mosto frío y aireado, desde este punto el producto se llama cerveza. Puede llevar entre 4 y 7 días, dependiendo del estilo de cerveza, tipo de levadura y temperaturas de proceso. Se dosifica la levadura fresca y se pasa al tanque de fermentación; los azúcares se transforman en alcohol y gas carbónico, creando la carbonatación natural y el desarrollo de sabores.
- **Filtración:** Consiste en separar los sólidos de la cerveza antes de ser enviados a envasado.
  
- **Etapa 2: Envasado y despacho del producto terminado:**

En la Figura 2 se observa el proceso de envasado y despacho de cerveza; todo comienza con la recepción del vacío y su paso a la despaletizadora en donde las cajas llenas son enviadas a la desembaladora, en ella se separan las botellas de las cajas y se envían

a sus respectivas lavadoras. En el caso de las botellas, al salir de la lavadora pasan por un sistema electrónico de control de calidad de botellas vacías previo a la entrada a la llenadora. En la llenadora las botellas son llenadas con el producto terminado y enviadas a la pasteurizadora para mantener por un tiempo mayor las propiedades organolépticas de la cerveza.

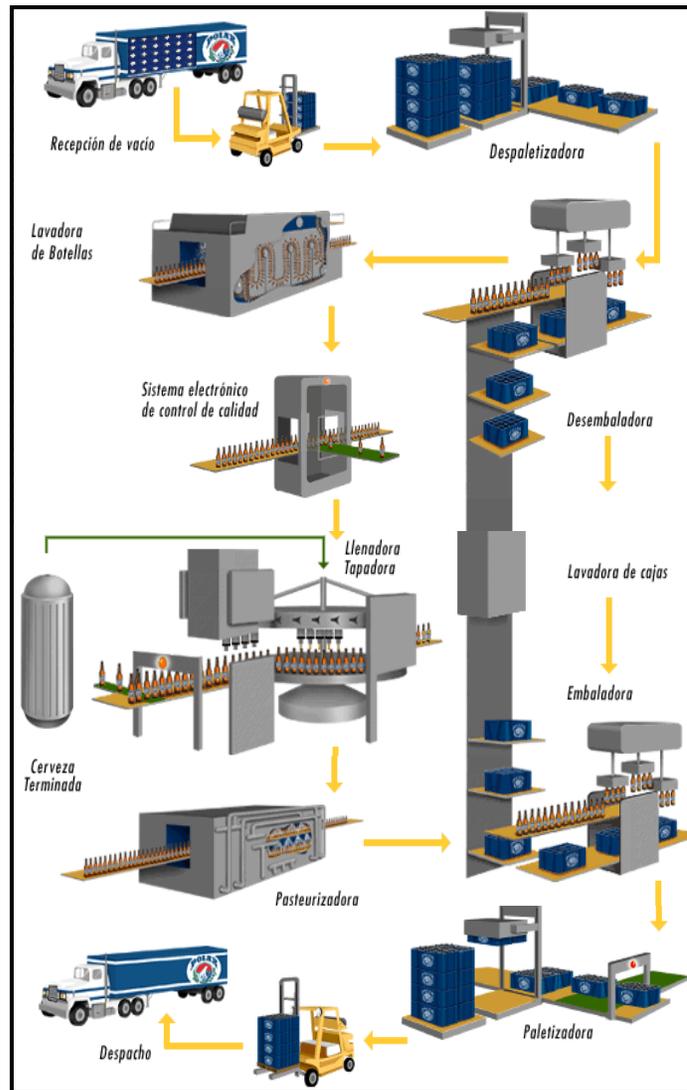


FIGURA 2. Envasado y despacho del producto terminado (Etapa 2). Fuente: Polar, 2012.

### 1.2.1 Llenadora

La Llenadora es una máquina giratoria compuesta por una llenadora propiamente dicha y una tapadora, que a alta velocidad llena los envases y luego los tapa, cumpliendo con los estándares de calidad. La Llenadora es la máquina más compleja y delicada de un tren de envasado ya que del llenado dependen en gran medida la conservación de las condiciones microbiológicas y características del producto final. Por ejemplo, la espuma cremosa, efervescencia, brillo, color y sabor de la cerveza <sup>(Polar, 2012)</sup>.

### 1.2.2. Proceso de llenado de botellas

El proceso de llenado de botellas consta de 6 etapas como se pueden apreciar en la Figura 3:

- **Pre-evacuación de aire:** Sistema de vacío que consiste en extraer el aire que se encuentra en el interior de los envases, antes de ser llenados, para así evitar la contaminación y oxidación del producto.
- **Enjuague con CO<sub>2</sub>:** Con el enjuague se logra eliminar el resto de oxígeno que queda en el envase después del primer vacío efectuado.
- **Presurización:** Consiste en inyectar gas carbónico (CO<sub>2</sub>) al envase para que la presión del mismo se iguale a la presión del calderín de la cerveza y la botella se llene sin formar espuma.
- **Llenado:** Una vez que la botella este llena de gas carbónico la cerveza comienza a bajar por gravedad sobre las paredes internas de la botella. Mientras el envase se llena, la cerveza va desplazado el CO<sub>2</sub> que regresa al calderín.

- **Descarga:** Cuando la cerveza alcanza el tubo de venteo, se detiene el llenado. Se abre entonces una válvula que alivia la presión en la botella y la iguala con la de la atmósfera.
- **Expulsión de aire:** Cuando la botella se separa de la válvula de llenado entra aire que puede contaminar la cerveza y oxidarla. Para eliminar este efecto, se inyecta agua a alta presión que libera gas carbónico y produce suficiente espuma para desalojar el aire que se encuentra en la parte superior del envase antes de ser tapado.

Cualquier falla operativa en el proceso descrito anteriormente tiene como consecuencia la obtención de productos fuera de especificación desde el punto de vista de los tres parámetros de control de calidad en la llenadora: cantidad de dióxido de carbono, volumen de llenado y por supuesto el parámetro de interés en este estudio la cantidad de oxígeno disuelto en el producto envasado.

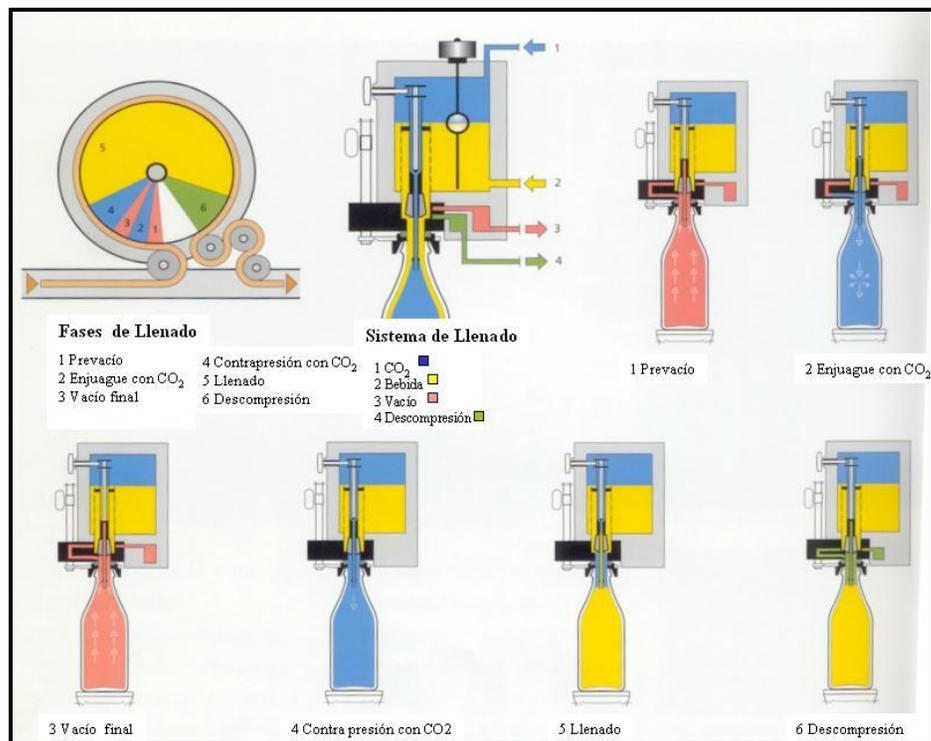


FIGURA 3. Etapas del proceso de llenado. Fuente: Polar, 2012.

### **1.3. Sistema de gestión de calidad**

El sistema de gestión de calidad está conformado por todos aquellos procedimientos y actos orientados a garantizar la calidad de un producto. En Cervecería Polar, todos los laboratorios funcionan de acuerdo con un sistema de gestión de calidad basado en la Norma Internacional ISO/IEC 17025: 2005 Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración.

#### **1.3.1. ISO/IEC 17025:2005 Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración**

Los laboratorios de ensayo y de calibración que cumplen esta Norma Internacional funcionan también de acuerdo con la Norma ISO 9001, la cual especifica los requisitos para un sistema de gestión de calidad, que debe cumplir una empresa para demostrar su capacidad de prestar un servicio que satisfaga los requisitos del cliente y los reglamentos aplicables.

La Norma ISO/IEC 17025:2005, establece de manera general que para demostrar competencia los laboratorios deben:

- Identificar y concretar cómo se ordenan y se interrelacionan los procesos necesarios para el sistema de gestión de calidad.
- Determinar los criterios y métodos necesarios para asegurarse de que la operación y el control de estos procesos sean eficaces.
- Asegurarse de la disponibilidad de recursos e información necesarios para apoyar la operación y el seguimiento de los procesos.
- Realizar el seguimiento, la medición y el análisis de los procesos.

- Implementar las acciones necesarias para lograr los resultados planificados y la mejora continua de estos procesos.

El cumplimiento de estos lineamientos en conjunto con los requisitos técnicos que se presentan a continuación, permiten garantizar el aseguramiento de la calidad de cualquier proceso y facilitar la estandarización de los métodos utilizados en el laboratorio:

### **1.3.2. Requisitos técnicos para lograr el aseguramiento de la calidad**

Muchos factores determinan la exactitud y la confiabilidad de los ensayos o de las calibraciones realizadas por un laboratorio. Estos factores incluyen elementos provenientes: de los factores humanos, de las instalaciones y condiciones ambientales, de los métodos de ensayo y de calibración, de la validación de los métodos, de los equipos, de la trazabilidad de las mediciones y del muestreo.

El grado con el que los factores contribuyen a la incertidumbre total de la medición difiere considerablemente según los ensayos y calibraciones. Es por ello, que los laboratorios deben tener en cuenta estos factores al desarrollar los métodos y procedimientos de ensayo y de calibración, en la formación y la calificación del personal, así como en la selección y la calibración de los equipos utilizados <sup>(ISO/IEC 17025, 2005)</sup>.

### **1.3.3. Validación de metodologías de ensayos**

La norma Covenin ISO-9000:2000 define la validación como:

“La confirmación por examen y el suministro de evidencia objetiva de que se ha cumplido los requisitos particulares para una utilización o aplicación específica prevista”.

La validación de un método de ensayo representa la garantía en la obtención de resultados técnicamente válidos y confiables mediante el conocimiento de los parámetros de desempeño del método.

En el apartado 9.1 de la norma ISO/IEC 17025:2005, se encuentran los requisitos para validación de métodos, mediante los cuales se exige que cualquier laboratorio que desee validar un método específico debe analizar y controlar los factores que inciden en la confiabilidad y exactitud de los resultados que informa.

En el alcance de estos requisitos se establece la validación de:

- Métodos no normalizados
- Métodos diseñados o desarrollados por el laboratorio
- Métodos normalizados usados para evaluaciones distintas al alcance para el cual fueron desarrollados.
- Métodos normalizados que han sido ampliados o modificados.

Estos requisitos sugieren que:

- La validación sea tan extensiva como el propio método de ensayo lo requiera y pueda incluir los procesos relacionados con el muestreo, el manejo y el transporte de la muestra.
- Entre las técnicas disponibles para determinar los parámetros de desempeño del método de ensayo se aplique al menos una de las siguientes: la calibración mediante patrones de referencia, la comparación de los resultados con otros métodos de ensayo, las

comparaciones interlaboratorios y/o la evaluación de la incertidumbre.

En Cervecería Polar C.A, el aseguramiento de la calidad en el caso de la metodología de preparación de muestras homogéneas y estables para el método de medición de oxígeno en cerveza se realiza a través de estudios interlaboratorios.

#### **1.4. Estudios interlaboratorios**

La participación en programas de ensayos de aptitud provee a los laboratorios de un medio objetivo para evaluar y demostrar la confiabilidad de los datos que se recopilan mediante las distintas pruebas realizadas. La mayoría de estos ensayos comparte como característica común, la comparación de los resultados o de las mediciones obtenidas por dos o más laboratorios mediante estudios interlaboratorios. Las comparaciones interlaboratorios se llevan a cabo con la finalidad de:

- Determinar el desempeño de laboratorios individuales para efectuar ensayos o mediciones específicas y hacer el seguimiento del desempeño continuo de dichos laboratorios.
- Identificar problemas en los laboratorios e iniciar acciones correctivas que puedan estar relacionadas, por ejemplo, con el desempeño del personal o con la calibración del instrumental.
- Establecer la efectividad y el grado de comparación de nuevos métodos de ensayo o de medición y, en forma similar hacer el seguimiento de los métodos establecidos.
- Identificar diferencias interlaboratorios.
- Determinar las características de desempeño de un método, a menudo conocido como 'ensayos colaborativos' tales como repetibilidad, reproducibilidad e incertidumbre.

Por lo tanto, la realización de estudios interlaboratorios son indispensables para suplementar los procedimientos internos de control de calidad de los laboratorios, al proporcionar una medida externa de su capacidad de ensayo.

### 1.5. Sistema de medición de oxígeno disuelto en cerveza

Para realizar la medición de oxígeno disuelto en cerveza se utiliza un medidor de flujo, el equipo O-DGM, y un pinchador de cerveza como se puede observar en la Figura 4.

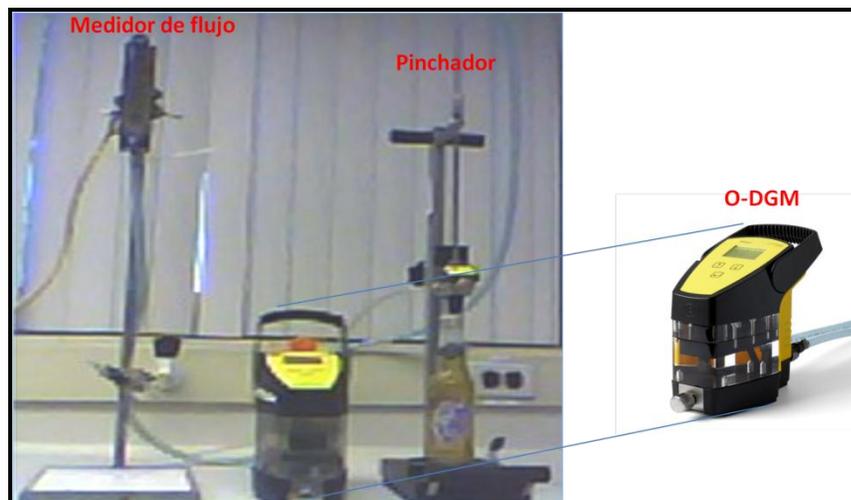


FIGURA 4. Equipo utilizado para la medición de oxígeno disuelto en cerveza.  
Fuente: Propia

El proceso de medición de oxígeno disuelto se lleva a cabo mediante el desplazamiento de la cerveza hacia el medidor de flujo debido a la presión generada por el dióxido de carbono, que pasa a la botella a través de un orificio realizado en la tapa por el pinchador, entre la goma perteneciente al pinchador y la tapa de la botella se mantiene una hermeticidad durante el proceso de medición que evita la entrada

de aire. La medición de oxígeno se basa en la medición de la luminiscencia mediante un sensor que se comporta según el principio que se muestra en la Figura 5. El sensor de oxígeno mide el contenido de oxígeno del líquido ópticamente, sobre la base del principio de medición por luminiscencia, por el cual una capa sensible al oxígeno se expone a luz azul. Esto provoca la excitación de las moléculas en la capa sensible al oxígeno. Cuando no hay presencia de oxígeno, las moléculas emiten luz roja. Cuando hay presencia de oxígeno, el gas colisiona con las moléculas de la capa sensible al oxígeno. En este proceso existe una relación directa entre la concentración de oxígeno y, la intensidad y velocidad a la cual se reduce la intensidad de la luz. En presencia de concentraciones elevadas de oxígeno, la intensidad de la luz cae y se produce un incremento en la velocidad a la cual se reduce la intensidad de la luz. La concentración de oxígeno se calcula a partir de la temperatura de producto y el tiempo transcurrido entre la exposición y la iluminación que indica el cambio de fase (Haffmans, 2007).

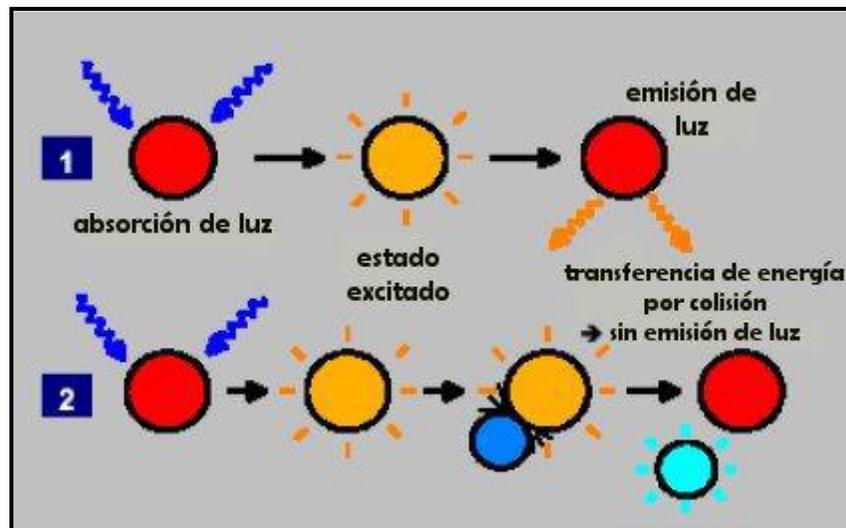


FIGURA 5. (1) Luminiscencia sin presencia de oxígeno (2) Luminiscencia con presencia de oxígeno. Fuente: Haffmans, 2007

## 1.6. Antecedentes de la investigación

Para lograr una buena calidad en el producto envasado, es necesario el control de tres parámetros durante el proceso de llenado: volumen de llenado, cantidad de CO<sub>2</sub> y cantidad de oxígeno total en cerveza, siendo este último el más importante debido a que su concentración es un factor que puede alterar las propiedades organolépticas de la cerveza, por lo tanto mantener valores bajos de oxígeno garantiza la estabilidad del producto en el tiempo al evitar reacciones de oxidación. La medición del oxígeno total en una cerveza envasada consiste en determinar la cantidad de oxígeno disuelto en la cerveza y la cantidad de oxígeno presente en la fase gaseosa dentro de la botella (“head space”). Esta estandarización referida al volumen total del envase permite comparaciones más sencillas entre envases de distintos tamaños y el establecimiento de límites de control de calidad internos de oxígeno en cerveza con mayor facilidad.

Cuando se requiere garantizar la calidad de los análisis realizados en un laboratorio, se utiliza la aplicación de verificaciones externas. Entre este tipo de verificaciones se encuentran los estudios interlaboratorios. Los estudios interlaboratorios se fundamentan en que varios laboratorios lleven a cabo mediciones sobre muestras distintas de uno o varios materiales homogéneos y estables con el fin de obtener una información determinada, que permita conocer por ejemplo, las características de desempeño de un método <sup>(García, 2001)</sup>

Los resultados obtenidos en estudios interlaboratorios anteriores para la medición de oxígeno total, permitió el planteamiento de posibles mejoras aplicables a la metodología actual de preparación de muestras homogéneas y estables para la realización de estos estudios. Una mejora importante fue la elaboración de las muestras dentro de una

campana con atmósfera inerte con el objeto de disminuir la dispersión entre las muestras y el impacto de la variabilidad de las muestras en los resultados de los estudios.

Como antecedentes de esta investigación se presentan los basamentos del método de medición de oxígeno en cerveza, el desarrollo de la metodología actual para la preparación de muestras homogéneas y estables para estudios interlaboratorios, y la implementación de la campana de nitrógeno como atmósfera de bajo contenido de oxígeno para la preparación de las muestras:

#### **1.6.1. Fundamentos teóricos para el cálculo de oxígeno total en cerveza (Vilacha C. & Uhlig K., 1985)**

En este estudio se desarrolló un método rápido para cuantificar el contenido total de oxígeno en cerveza envasada a partir de la medición de oxígeno disuelto. Entre los basamentos del método se encuentran los siguientes:

1. No se requiere del estudio volumétrico del gas para la cuantificación del oxígeno en la fase gaseosa.
2. El método se basa en el equilibrio entre el oxígeno disuelto en el líquido y el presente en el espacio de cabeza ("head space"), alcanzado por medio de la agitación mecánica, antes de la medición de oxígeno disuelto.
3. El oxígeno en la fase gaseosa se comporta como un gas ideal, mientras que el disuelto en la fase líquida cumple con la Ley de Henry.
4. Los cálculos realizados para estimar la cantidad de oxígeno total en cerveza, estuvieron basados en 4 leyes fundamentales de los gases:

**-Ley de Henry:** La cuál enuncia lo siguiente: “La concentración de un gas en un líquido a una temperatura dada es proporcional a la presión parcial de ese gas en contacto con el líquido cuando las dos fases están en equilibrio”.

**-Ley de Dalton:** En ella se expresa que la presión parcial de oxígeno en una botella, corresponde a la presión aportada por las moléculas de oxígeno, y es igual a la presión total en la botella multiplicada por la fracción volumétrica de oxígeno en el espacio de cabeza (“head space”).

**-Ley de los gases ideales:** La cual expresa que los volúmenes ocupados por una misma masa gaseosa son directamente proporcionales a las temperaturas absolutas correspondientes, e inversamente proporcionales a las presiones soportadas.

**-Ley de Amagat:** La ley de Amagat expresa “En una mezcla cualquiera de gases, el volumen total es igual a la suma de los volúmenes parciales de los constituyentes de la mezcla”.

5. Los factores denominados  $z$  se encuentran expresados en función del porcentaje de espacio de cabeza (“head space”) existente en el envase. Este porcentaje esta referido a la relación entre el volumen ocupado por la fase gaseosa ( $V_{HS}$ ) y el volumen de cerveza ( $V_C$ ) servido en la botella.

El método de cálculo desarrollado en este estudio permitió concluir que la concentración total de oxígeno es función de la concentración de oxígeno disuelto, la temperatura y del porcentaje de espacio de cabeza (“head space”); y se determina mediante la siguiente expresión:

$$m_T = X \cdot \left[ \frac{32 \cdot 1000 \cdot HS \cdot (4,15 \cdot 10^{-7} \cdot T^2 + 2 \cdot 10^{-4} \cdot T - 0,0701)}{0,0821 \cdot T \cdot 1,0332 \cdot 100} + 1 \right] \quad (1)$$

$$\text{ó } m_T = X \cdot Z \quad (2)$$

Donde:

$m_T$  Concentración total de oxígeno en cerveza (mg/L)

X Concentración de oxígeno disuelto (mg/L)

T Temperatura (K)

HS Head space (%)

Z Factor (adimensional)

Dicha expresión en conjunto con los basamentos del método representó la base de cálculo de medición de oxígeno total de esta investigación experimental.

### **1.6.2. Desarrollo de una muestra homogénea y estable para estudios interlaboratorios del método de medición de oxígeno (De Amorín, 2005)**

En esta publicación De Amorín, propuso una metodología para el desarrollo de muestras homogéneas y estables. Realizó ensayos empleando como matrices agua y cerveza, y desarrolló una metodología para la inyección de aire en la botella para generar diferentes niveles de concentración de oxígeno. Durante la evaluación de las matrices, De Amorín obtuvo como resultado que las muestras elaboradas con agua presentaron una alta dispersión, mientras que las

muestras elaboradas con cerveza, reportaron una mayor homogeneidad y estabilidad.

En cuanto a la metodología para generar diferentes niveles de evaluación mediante la inyección de aire en las muestras, De Amorín empleó una tapa corona provista de un orificio en la cubierta metálica y un septum pegado al revestimiento interno de la misma, que permitió la inyección de la cantidad deseada de aire mediante la utilización de una jeringa de precisión para gases manteniendo la hermeticidad del envase.

Basándose en estos resultados, diseñó un modelo de análisis interlaboratorios, el cual consistió en tres niveles de concentración. El primero consistió en el nivel base originado en una llenadora piloto. Para generar los otros dos niveles, se inyectó aire a las muestras empleando una jeringa de precisión para gases. Este modelo ha sido puesto en uso práctico, y su reproducibilidad y repetibilidad es de 24%, valor que representa una mejora importante con respecto al valor de 48% obtenido mediante la aplicación de la metodología publicada por American Society of Brewing Chemists (ASBC) para el momento del desarrollo de este estudio.

La metodología de De Amorín empleando matriz cerveza es la utilizada actualmente por la empresa y se tomó como base de esta investigación experimental el modelo de análisis interlaboratorios diseñado utilizando como matriz cerveza.

### **1.6.3. Evaluación de los factores que afectan la variabilidad de los resultados durante la implementación de campana a la metodología actual de preparación de muestras homogéneas y estables para medición de oxígeno en cerveza (Soprano, 2010).**

El nitrógeno es un gas inerte a condiciones normales, es incoloro, inodoro, insípido y poco reactivo por lo que no deteriora la cerveza.

En el estudio desarrollado por Soprano, se realizaron ensayos de implementación de campana a la metodología actual de preparación de muestras con matriz cerveza para estudios interlaboratorios (metodología de De Amorín), con la finalidad de disminuir la dispersión de las muestras obtenidas con la aplicación de la metodología actual.

En el tipo de campana utilizada en los ensayos, se llevó a cabo un barrido o purga con gas que consistió en desplazar el aire alojado dentro de la campana, mediante una corriente continua de nitrógeno. Durante este tiempo se colocaron dentro de la campana, las herramientas necesarias para llevar a cabo el tapado de las muestras. Transcurrido el tiempo de purga, se cerró herméticamente la campana y se aplicó la metodología actual para la preparación de muestras con matriz cerveza para estudios interlaboratorios.

Debido a que de acuerdo a la duración del tiempo de purga, existía menor o mayor variación entre los valores de oxígeno de la muestra, Soprano realizó ensayos para determinar el tiempo de purga de aire necesario dentro de la campana de nitrógeno para disminuir las posibles dispersiones. Realizó pruebas con tiempos iguales a 2, 4, 6 y 8 minutos, obteniendo como resultado que la implementación de 6

minutos permitió una reducción significativa de la desviación estándar en los valores reportados de oxígeno disuelto.

Se tomó como aporte de esta investigación la metodología para la implementación de la Campana de Nitrógeno.

### **1.7 Estudio de repetibilidad y reproducibilidad (*Gage r&R study*)**

En cualquier proceso que envuelva medidas, es altamente probable que la variabilidad observada sea el resultado no sólo del producto, sino también del instrumento de medir y la persona que lo mida. Para medir la precisión de un sistema de medidas se realiza un estudio de repetibilidad y reproducibilidad <sup>(Botero, Arbeláez & Mendoza, 2007)</sup>

La repetibilidad es la variación de las mediciones obtenidas con un instrumento de medición, cuando es utilizado varias veces por un operador, al mismo tiempo que mide las mismas características en una misma parte.

La reproducibilidad es la variación de las mediciones realizadas por diferentes operadores que utilizan un mismo instrumento de medición cuando miden las mismas características en una misma parte.

Los estudios de repetibilidad y reproductibilidad de las mediciones determinan que parte de la variación observada en el proceso se debe al sistema de medición usado.

Se empleará el paquete estadístico MINITAB 16<sup>®</sup> para realizar de forma eficaz y rápida este tipo de estudios, a partir de los cuales se analizará el sistema de medición. Para estudios de repetibilidad y reproducibilidad (*Gage r&R study*) MINITAB 16<sup>®</sup> realiza dos tipos de análisis: el cruzado y el anidado.

El análisis cruzado es utilizado cuando cada operador mide varias veces una parte; mientras que el análisis anidado es aplicable cuando cada parte es medida por únicamente un operador como sucede en pruebas destructivas, es decir, la característica medida es diferente después de la medición en que estaba al comenzar el proceso<sup>(Izarra, 2001)</sup>.

El programa MINITAB 16<sup>®</sup> ofrece dos métodos para estudiar la repetibilidad y la reproducibilidad: Xbar y R, y Anova. El método Xbar y R divide la variación en tres categorías: Parte-a-Parte, repetibilidad y Reproducibilidad. El método Anova es mucho más exacto y divide la reproducibilidad en componentes operador y operador por parte<sup>(Izarra, 2001)</sup>.

En esta investigación se utilizó el método Anova, debido a que es más preciso que el método Xbar y R por que considera la interacción del operador por parte y elabora una partición estadística de la varianza con su respectiva significancia.

## **CAPÍTULO II**

### **FUNDAMENTOS DE LA INVESTIGACIÓN**

En el presente capítulo se detalla el planteamiento del problema y de los objetivos del presente trabajo de investigación:

#### **2.1. Planteamiento del Problema**

El oxígeno total es uno de los parámetros más importantes de la calidad de la cerveza debido a que puede producir reacciones de oxidación alterando las propiedades físicas, químicas y organolépticas del producto una vez envasado. Este parámetro es monitoreado constantemente para verificar que se encuentre dentro de especificación ( $\leq 40$  ppb) en los laboratorios de calidad. Adicionalmente, para poder garantizar un nivel estándar de la calidad de la cerveza en todos los laboratorios, se han realizado estudios interlaboratorios empleando distintas muestras de referencia con el objeto de evaluar el sistema de medición de oxígeno, como parte del sistema de gestión de calidad para el aseguramiento de los resultados orientado a proporcionar confianza en que se cumplen rigurosamente los requisitos de calidad de la empresa.

Actualmente, se cuenta con una muestra para ensayos interlaboratorios de oxígeno que se elabora a partir de la metodología propuesta por De Amorín. Esta muestra presenta una dispersión considerable que está afectando los resultados de evaluación del método y por lo tanto, se desea mejorar la misma evaluando diferentes metodologías de preparación con el propósito de aumentar la estabilidad y repetibilidad del material de referencia empleado hasta los momentos, de tal manera que cualquier variación que se presente en

los ensayos interlaboratorios se deba al método de medición y no a la muestra.

## **2.2. Objetivos**

### **2.2.1. Objetivo General**

Mejorar la metodología de preparación de muestras homogéneas y estables para estudios interlaboratorios del método de medición de oxígeno en cerveza.

### **2.2.2. Objetivos Específicos**

1. Estudiar la influencia de la agitación de la muestra y la temperatura en la determinación del oxígeno disuelto en cerveza.
2. Evaluar el desarrollo de muestras con matriz de cerveza preparadas en una atmósfera de bajo contenido de oxígeno.
3. Evaluar el desarrollo de diferentes niveles de muestras con matriz de cerveza mediante la adición de soluciones con oxígeno disuelto conocido.
4. Estudiar el desarrollo de una muestra sintética generada a partir de reacciones químicas.
5. Comparar las metodologías propuestas con respecto a la metodología de uso actual.
6. Realizar un análisis de repetibilidad y reproducibilidad de la mejor muestra obtenida para validar los resultados.

### **2.2.3. Limitaciones**

Para la realización de esta investigación, se contó con lo requerido en cuanto a infraestructura, materiales, reactivos y servicios, del Laboratorio de Calidad Envasado del Centro Tecnológico Polar y del Laboratorio de Planta Los Cortijos.

Las limitaciones de este proyecto estuvieron conformadas por la cantidad finita de muestras de cervezas proporcionadas por Planta Los Cortijos, a las cuales no era factible controlar la cantidad de oxígeno inicial adicionando variabilidad al proceso de medición.

### **2.2.4. Alcances**

Esta investigación estuvo enfocada en el desarrollo de una metodología de preparación de muestras homogéneas y estables para estudios interlaboratorios del método de medición de oxígeno, que permitiera disminuir el error debido a repetibilidad y reproducibilidad obtenido con la aplicación de la metodología actual. Para ello, se llevaron a cabo una serie de pruebas como se señala en el capítulo III de este estudio, mediante las cuales se alcanzaron cada uno de los objetivos específicos nombrados en el apartado 2.2.2, logrando proponer a través del análisis de los resultados la metodología que permitió desarrollar la mejor muestra para ser utilizada en estudios interlaboratorios posteriores.

## **CAPÍTULO III**

### **MARCO METODOLÓGICO**

En toda investigación científica, es necesario garantizar que las pruebas realizadas y los resultados obtenidos reúnan las condiciones de fiabilidad, objetividad y validez interna. Para ello, se requiere delimitar los procedimientos de orden metodológico a través de los cuales se intenta dar respuestas a las interrogantes objeto de una investigación <sup>(Balestrini, 2006)</sup>.

A continuación se detallan brevemente los elementos constitutivos del marco metodológico de este proyecto, el cual incluye el tipo de investigación, el diseño de la investigación, la definición de la población y de la muestra, y las técnicas e instrumentos que se emplearon para llevar a cabo el proceso de recolección de datos:

#### **3.1. Tipo de investigación**

El tipo de investigación utilizada es el estudio experimental. Un estudio experimental, es un estudio donde se manipulan las variables para determinar las consecuencias sobre otras variables efecto, dentro de una situación controlada por el investigador. Se denominan experimentales debido a que el investigador interviene o manipula las condiciones de la investigación <sup>(Balestrini, 2006)</sup>.

En el presente estudio, los efectos observados en la pruebas experimentales mediante la evaluación de las metodologías de adición de agua antes de tapar, inyección de agua después de tapar, implementación de campana a la metodología actual y desarrollo de muestras sintéticas a partir de reacciones químicas, fueron

comparadas con la metodología actual de preparación de muestras para estudios interlaboratorios del método de medición de oxígeno en cerveza. Esto se realizó con la finalidad de identificar si alguna de las metodologías propuestas presentaba mejores resultados que la metodología de uso actual.

### **3.2. Diseño de la investigación**

En este estudio se desarrolló un diseño experimental que permitió establecer una interacción entre los objetivos y la realidad de la situación experimental, observar y recolectar los datos directamente de la realidad, y profundizar en la comprensión de los hallazgos con la aplicación de los instrumentos estadísticos pertinentes.

### **3.3. Definición de la población**

La población de este estudio está conformada por el total de cervezas producidas en la Cervecería Polar, Planta los Cortijos.

#### **3.3.1. Definición de la muestra: Muestra probabilística**

La muestra probabilística se caracteriza por ser extraída al azar, es decir de manera aleatoria, de esta manera el tipo de selección es tal, que cada elemento de la población tiene igual oportunidad de ser seleccionado <sup>(Gabaldon, 1994:9)</sup>

Para la realización de este estudio se utilizarán muestras probabilísticas provenientes de la Cervecería Polar, Planta Los Cortijos.

### **3.3.1.1. Cantidad de muestras requeridas provenientes de la Cervecería Polar, Planta Los Cortijos**

Para la realización de esta investigación se seleccionaron 105 muestras de cervezas Polar Ice<sup>®</sup> de 222 mL y 234 muestras de cervezas Polar Ice<sup>®</sup> de 330 mL distribuidas según cada prueba de la siguiente manera:

- 105 muestras de cervezas Polar Ice<sup>®</sup> de 222 mL para la realización de las pruebas de agitación y efectos de la temperatura en la medición de oxígeno en cerveza. Cada prueba fue repetida 3 veces, con lotes distintos de cerveza para validar los resultados.
- 45 muestras de cervezas Polar Ice<sup>®</sup> de 330 mL para la realización de pruebas con implementación de campana de atmósfera inerte. Cada prueba fue repetida 3 veces para validar los resultados.
- 189 muestras para la evaluación de las 5 metodologías: adición de agua antes de encharpar, inyección de agua después de encharpar, metodología actual y muestras sintéticas.

### **3.3.1.2. Variables**

Existen variables que deben ser consideradas en el diseño experimental, debido a que pueden afectar al sistema de medición, adicionando variabilidad al ensayo que se realiza. En esta investigación las variables a considerar son aquellas que afectan la preparación de las muestras como lo son los materiales utilizados, la metodología empleada en la medición, la influencia del hombre y del ambiente. En la Figura 6 se muestra un diagrama causa-efecto, donde se puede apreciar los factores que influyen en las variables mencionadas.

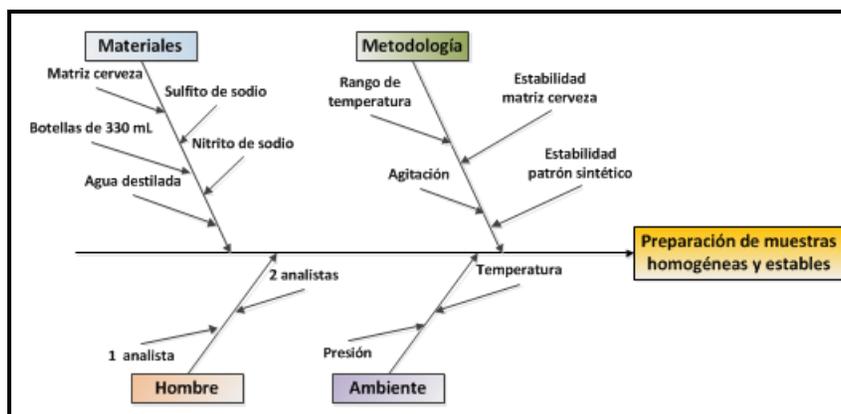


FIGURA 6. Diagrama causa-efecto. Fuente: Propia

### 3.4. Instrumentos de recolección de información

Se utilizaron como instrumentos de recolección de datos dos tipos de fuentes:

- **Fuentes primarias:** Los datos son reunidos y utilizados por el investigador a partir de la observación directa de la realidad objeto de estudio. En el caso de esta investigación, las fuentes primarias están conformadas por cada una de las pruebas experimentales realizadas<sup>(Balestrini, 2006:146)</sup>.
- **Fuentes secundarias:** Los datos son reunidos mediante el análisis de fuentes documentales existentes. En el caso de este estudio, las fuentes secundarias están conformadas por los fundamentos de la investigación, instructivos vigentes e información consultada de páginas científicas en internet<sup>(Balestrini, 2006:146)</sup>.

### 3.5. Técnicas de recolección de datos

En la Figura 7, se presenta el esquema de la investigación:

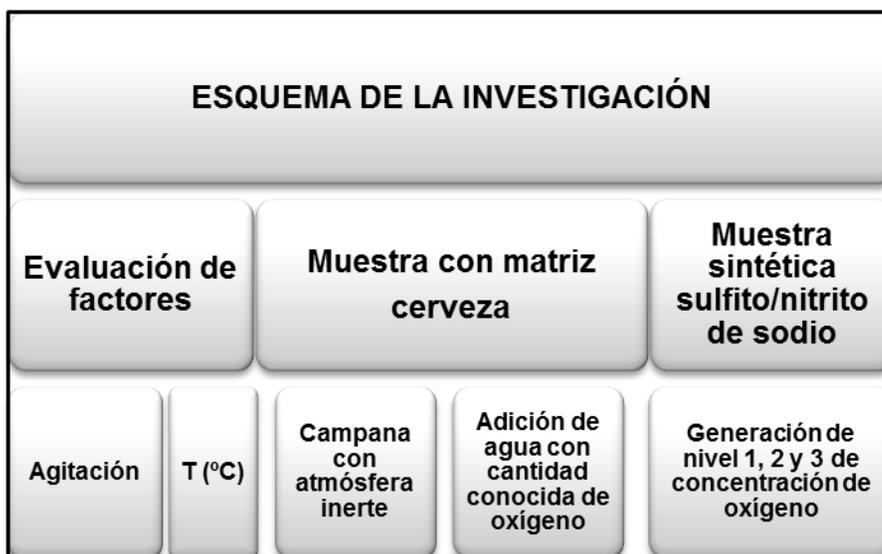


FIGURA 7. Esquema de la investigación. Fuente: Propia

De acuerdo a este esquema el desarrollo del proyecto se ejecutó en 3 etapas:

### 3.5.1 Evaluación de factores del método de medición de oxígeno

Existen 2 factores importantes que pueden influir en la medición de oxígeno disuelto: la agitación y la temperatura.

Se estudió la influencia de estos factores en la determinación del oxígeno disuelto en cerveza, con el fin de conocer si el tipo de agitación y el rango de temperaturas establecidos en el método vigente de determinación de oxígeno eran los más adecuados. De esta manera se garantizó que los resultados obtenidos en el presente estudio no fuesen afectados por el método de medición.

La evaluación de la influencia de la agitación en el método de ensayo se realizó mediante 4 pruebas: sin agitación, agitación manual simple, agitación manual vigorosa y muestra con agitación con un dispositivo mecánico. Ésta última es la que se emplea en el método

vigente de medición de oxígeno. Se emplearon 5 muestras de cerveza por cada prueba.

En cuanto a la temperatura, se evaluó el rango de temperatura ( $20\pm 3$ )°C utilizado en la metodología actual de medición de oxígeno disuelto. Cada valor de este rango se identifica como un nivel de temperatura existiendo por ende 7 niveles. Para la realización de esta evaluación se planteó medir las temperaturas extremas del rango de medición y en caso de que se obtuvieran diferencias significativas en los resultados obtenidos, se disminuiría el rango de evaluación.

Adicionalmente, se realizaron pruebas de implementación de campana a la metodología actual de cambio de tapa, evaluando dos gases de purga: dióxido de carbono y nitrógeno, con la finalidad de escoger aquel gas que permitiera obtener una mejora con respecto a los valores de oxígeno obtenidos mediante la aplicación de la metodología actual de tapado.

Las evaluaciones que se realizaron para evaluar los factores del método de medición de oxígeno se presentan a continuación:

#### **3.5.1.1. Estudio de la influencia de la agitación de la muestra**

Las pruebas realizadas fueron las siguientes:

- **Prueba 1:** Para cada una de las muestras sin agitar:
  1. Se atemperó la muestra a 20 °C.
  2. Se extrajo la botella del baño térmico por el cuello de manera vertical sin voltearla, se secó la superficie de la botella y se realizó la medición de oxígeno disuelto en la muestra.

3. Se tabularon los valores de oxígeno disuelto (en ppb) y el tiempo de cada medición en una tabla.
- **Prueba 2:** Para cada una de las muestras con agitación manual simple:
  1. Se atemperó la muestra a 20 °C.
  2. Se extrajo la botella del baño térmico por el cuello de manera vertical sin voltearla, se secó la superficie de la botella.
  3. Se tomó la botella con la mano justo en la mitad del cuerpo de la misma y se realizaron 3 giros de 180° (ver Figura 8) con una duración de 4 segundos, asegurando que la fase gaseosa atravesara la fase líquida. Se consideró importante que la botella se moviera en un sólo plano.
  4. Se midieron y se tabularon los valores de Oxígeno disuelto (en ppb) y el tiempo de cada medición en una tabla.

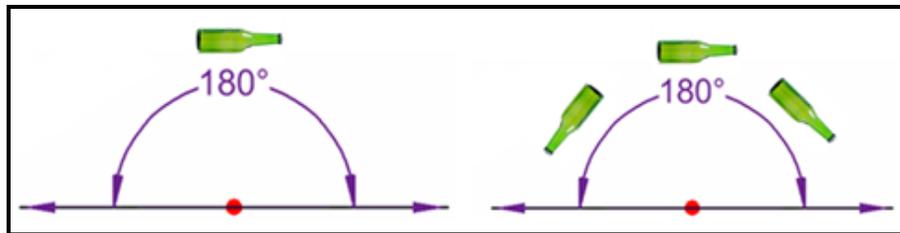


FIGURA 8. Esquema de la trayectoria del movimiento que debe seguir la botella al realizar la agitación manual simple. Fuente: Propia

- **Prueba 3:** Para cada una de las muestras con agitación manual vigorosa:
  1. Se atemperó la muestra a 20 °C.
  2. Se extrajo la botella del baño térmico por el cuello de manera vertical sin voltearla, se secó la superficie de la botella.
  3. Se tomó la botella con la mano derecha justo en la mitad del cuerpo de la misma y se realizaron movimientos ascendentes y descendentes utilizando sólo el antebrazo, partiendo desde un ángulo de 180° con respecto al cuerpo, hasta llegar a un ángulo

de 30° aproximadamente (ver Figura 9) por un periodo de 2 minutos. Se consideró indispensable que existiera turbulencia dentro de la botella durante el recorrido para que se generara el equilibrio de fases.

4. Se midieron y se tabularon los valores de oxígeno disuelto (en ppb) y el tiempo de cada medición en una tabla.

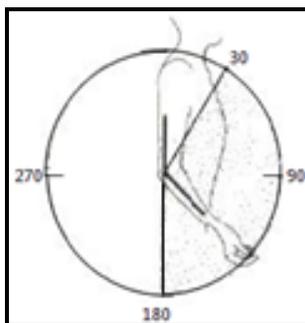


FIGURA 9. Esquema de la trayectoria del movimiento que debe seguir la botella al realizar la agitación manual vigorosa. Fuente: Propia

- **Prueba 4:** Para cada una de las muestras con agitación en un dispositivo mecánico:
  1. Se atemperó la muestra a 20 °C.
  2. Se extrajo la botella del baño térmico por el cuello de manera vertical sin voltearla, se secó la superficie de la botella.
  3. Se levantó verticalmente y se posicionó sobre el agitador mecánico.
  4. Se agitó la muestra durante 5 minutos.
  5. Se extrajo del agitador en forma vertical, se midió y se tabulo los valores de oxígeno y el tiempo de medición en una tabla.

### 3.5.1.2. Evaluación de la influencia de la temperatura

La metodología utilizada fue la siguiente:

1. Se atemperaron 5 muestras a 17°C, se agitaron empleando el agitador mecánico durante 5 minutos y se midió la cantidad de oxígeno disuelto.
2. Se atemperaron 5 muestras a 20°C, se agitaron empleando el agitador mecánico durante 5 minutos y se midió la cantidad de oxígeno disuelto.
3. Se atemperaron 5 muestras a 23°C, se agitaron empleando el agitador mecánico durante 5 minutos y se midió la cantidad de oxígeno disuelto.
4. Si no se evidencian diferencias significativas en la cantidad de oxígeno disuelto a estos tres intervalos de temperatura, se concluye que el rango elegido de  $T = (20 \pm 3) \text{ } ^\circ\text{C}$  es adecuado puesto que no genera una variabilidad que afecte los resultados.
5. Si se evidencia una desviación significativa entre los valores de oxígeno disuelto obtenidos, se estrecha el rango de temperatura, y se repite la evaluación esta vez con 5 muestras a 18°C y 5 muestras 19°C.

### **3.5.1.3 Evaluación de campana utilizando como gas de purga nitrógeno y dióxido de carbono en la preparación de las muestras**

1. Se extrajo la botella de la máquina de temperatura por el cuello de manera vertical sin voltearla y se secó.
2. Se introdujo en la campana desinflada junto con la tapadora pequeña y los demás implementos (destapador y chapas)
3. Se activó el proceso de purga de oxígeno por barrido de nitrógeno o  $\text{CO}_2$  según fuera el caso.
4. Se mantuvo el proceso de purga por 6 minutos.
5. Se realizó el cambio de tapa.
6. Se desinfló la campana, se extrajeron las muestras y se midió la cantidad de oxígeno disuelto.

### **3.6. Desarrollo de muestras utilizando como matriz cerveza**

Se desarrollaron muestras utilizando como matriz cerveza, para ello se evaluaron 4 metodologías para la generación de los niveles de concentración de oxígeno: por adición de agua antes del tapado en campana con gas inerte, por inyección de agua después del tapado en campana con gas inerte, a partir de la implementación de campana con atmósfera inerte a la metodología actual de preparación de muestras homogéneas y estables para estudios interlaboratorios y muestras sintéticas.

Por medio de cada una de las metodologías se generaron los 3 niveles de concentración de oxígeno, requeridos para la realización de los estudios interlaboratorios. Los resultados fueron comparados con los obtenidos mediante la aplicación de la metodología actual, con el propósito de identificar si se pudo lograr una mejora con respecto a la repetibilidad y estabilidad de las muestras.

La repetibilidad de cada metodología fue evaluada de manera inmediata mediante la medición de oxígeno disuelto en cerveza, utilizando 5 muestras por nivel de concentración de oxígeno.

La estabilidad de cada metodología fue evaluada mediante la medición de oxígeno disuelto en cerveza, en un período de 2 semanas almacenadas a 5°C y 28 °C, utilizando 6 muestras por semana para cada nivel de concentración de oxígeno (3 muestras por temperatura para cada una de las metodologías).

A continuación se presenta la metodología actual de preparación de muestras la cual está basada en el trabajo De Amorín, seguida por cada una de las metodologías evaluadas:

### **3.6.1. Metodología actual de preparación de muestras homogéneas y estables para estudios interlaboratorios del método de medición de oxígeno disuelto en cerveza**

1. Se extrajo la botella del baño térmico a 20°C por el cuello de manera vertical sin voltearla, y se secó la botella.
2. Se agitó la botella sacudiéndola hacia arriba y hacia abajo 3 veces.
3. Se dejó reposar 2 minutos, mientras tanto se utilizó parte de este tiempo para posicionar la nueva chapa en la tapadora manual.
4. Se destapó rápidamente, si no existió la salida espontánea de espuma de la botella, se procedió a golpear suavemente en la parte media de la misma para inducir el espumeo y se tapó rápidamente.
5. Se midió la cantidad de oxígeno disuelto.

### **3.6.2. Generación de niveles por adición de agua antes del tapado en campana con gas inerte**

Antes de aplicar la metodología se realizaron ciertos pasos de cálculos preliminares para determinar la dosificación de agua a utilizar para la generación de los niveles 2 y 3 de concentración de oxígeno:

1. Se midió la cantidad de oxígeno disuelto presente en una cerveza del lote y en el agua destilada que se iba a utilizar para realizar las dosificaciones, obteniendo como resultado 22 ppb para el caso de la cerveza y 6387 ppb para el caso del agua destilada.
2. Mediante la aplicación de la fórmula:

$$X_{\text{agua}} + X_{\text{cerveza}} = X_{\text{nivel}}$$

Donde:

$X_{\text{agua}}$  Concentración del agua (ppb)

$X_{\text{cerveza}}$  Concentración de la cerveza (ppb)

$X_{\text{nivel}}$  Concentración que se desea obtener en el nivel (ppb)

Se puede estimar que cantidad de agua destilada debe agregarse para obtener el nivel deseado de concentración de oxígeno, conociendo la concentración de oxígeno disuelto en la cerveza. Se desea obtener un nivel 2 de aproximadamente 30 ppb y un nivel 3 de aproximadamente 40 ppb.

3. Sabiendo que  $1ppb = 1 \frac{\mu g}{L}$ , y conociendo que hay aproximadamente

6387 ppb en el agua destilada utilizada, mediante un factor de conversión se obtiene la cantidad de agua destilada que debe dosificarse para obtener los niveles de concentración de oxígeno deseado, resultando 2mL para el nivel 2 y 3mL para el nivel 3.

La metodología de generación de niveles por adición de agua antes del tapado en campana con gas inerte utilizada, es la siguiente:

**Nivel 1:**

- Se emplearon 5 botellas tal cual como son recibidas de planta.

**Nivel 2 y 3:**

1. Se introdujeron las 5 muestras correspondientes al nivel (2 o 3 según sea el caso) en la campana desinflada junto con la tapadora pequeña y los demás implementos (destapador, chapas, inyectora de insulina, agua destilada en una piceta y beaker )
2. Se activó el proceso de purga de oxígeno por barrido de nitrógeno.
3. Se mantuvo el proceso de purga por 6 minutos.

4. Se cerró la campana.
5. Se agregó el contenido de la piceta en el beaker.
6. Se destapó una de las botellas cuidadosamente para evitar la pérdida de líquido.
7. Se adicionó mediante la inyectora 2 mL para el nivel 2 y 3mL para el nivel 3.
8. Se tapó la muestra.
9. Se repitieron los pasos del 6 al 8 para las 4 botellas restantes.
10. Se desinfló la campana y se extrajeron las muestras.

Las muestras de los 3 niveles fueron refrigeradas a 5°C y se le realizó la medición de oxígeno disuelto al séptimo día contando el día de preparación.

### **3.6.3. Generación de niveles por inyección de agua después del tapado en campana con gas inerte**

#### **Nivel 1:**

- Se utilizaron 5 botellas tal cual como fueron recibidas de planta.

#### **Nivel 2 y 3:**

1. Se introdujeron las 5 muestras correspondientes al nivel (2 o 3 según sea el caso) en la campana desinflada junto con la tapadora pequeña y los demás implementos (destapador, chapas, inyectora de insulina, agua destilada en una piceta y beaker)
2. Se activó el proceso de purga de oxígeno por barrido de nitrógeno.
3. Se mantuvo el proceso de purga por 6 minutos.
4. Se cerró la campana.
5. Se vertió el contenido de la piceta en el beaker.
6. Se destapó una de las botellas según la metodología actual de destapado.

7. Se tapó la muestra con las tapas horadadas con septum.
8. Se dosificó utilizando la inyectora 2 mL para el nivel 2 o 3mL para el nivel 3 según fuera el caso.
9. Se repitieron los pasos del 6 al 8 para las 4 botellas restantes del nivel 2 o 3 según fuese el caso.
10. Se desinfló la campana y se extrajeron las muestras.
11. Se realizó la medición de oxígeno disuelto en cerveza.

#### **3.6.4. Generación de niveles a partir de la implementación de campana a la metodología actual**

1. Se extrajeron las botellas del baño térmico a 20°C por el cuello de manera vertical sin voltearla, y se secaron las botellas.
2. Se le aplicó la metodología de agitación mecánica.
3. Se introdujeron en la campana desinflada junto con la tapadora pequeña y los demás implementos (destapador y chapas).
4. Se activó el proceso de purga de oxígeno por barrido de nitrógeno.
5. Se mantuvo el proceso de purga por 6 minutos y se cerró la campana.
6. Se agitó la botella sacudiéndola hacia arriba y hacia abajo 3 veces.
7. Se dejó reposar 2 minutos.
8. Se destapó rápidamente, si no existió la salida espontánea de espuma de la botella, se golpeo levemente en la parte media de la misma para inducir el espumeo y se tapo rápidamente.
9. Se desinfló la campana, se extrajeron las muestras y se midió la cantidad de oxígeno disuelto.

#### **3.6.5. Metodología de preparación de muestras sintéticas**

Se desarrollaron dos tipos de muestras sintéticas a partir de reacciones químicas: la primera se obtuvo a partir de agua destilada y sulfito de sodio, y la segunda a partir de agua destilada y nitrito de

sodio. En ambos casos se evaluó el medio ácido y la temperatura como condiciones para favorecer la reacción. El propósito de estas muestras sintéticas era generar los 3 niveles de concentración de oxígeno necesarios para realizar los estudios interlaboratorios. Los resultados fueron comparados con los obtenidos mediante la aplicación de la metodología actual, con el propósito de identificar si se pudo lograr una mejora con respecto a la repetibilidad y estabilidad de las muestras.

Para definir la metodología se consideró lo siguiente:

1. Debido a que la distribución del vidrio es variable entre las botellas, se verificó qué método de llenado garantizaba menor dispersión (misma cantidad de líquido o misma cantidad de head space).

Los métodos de llenado que se evaluaron fueron los siguientes:

- **Método de llenado por peso:** Se pesó una cantidad de agua específica. Mediante este método se garantizó que todas las muestras contendrían la misma cantidad de líquido.
- **Método de extracción de un porcentaje de líquido:** Se llenaron las botellas hasta el punto en que se rebosaron de agua y se extrajeron un porcentaje de agua igual para todas las botellas, de esta manera se garantizó que todas las botellas poseían el mismo espacio de cabeza.

La evaluación de estos métodos de llenado permitió elegir para la realización de las pruebas aquel método que presentó menores dispersiones durante la medición de oxígeno disuelto.

2. La temperatura de calentamiento se evaluó de manera experimental, mediante la realización de ensayos para valores de 40, 50 y 60°C, debido a que se consideró que valores menores de 40°C no aportarían un cambio significativo a la muestra y valores

mayores a 60 °C representan un riesgo a la seguridad, debido a que se pueden fracturar las botellas o explotar. Se utilizó para la realización de las pruebas la temperatura que reportó valores más bajos de oxígeno disuelto.

3. La concentración del HCl se evaluó de manera experimental, se realizaron ensayos para valores de concentración de 0,01 y 2 N, debido a que son las concentraciones mínimas y máximas de los ácidos existentes en el laboratorio. Se utilizó para la realización de las pruebas la concentración que reportó los valores más bajos de oxígeno disuelto.
4. Adicionalmente se evaluó si era necesario para el desarrollo de la muestra sintética la adición de HCl y calor, o era suficiente con la adición de uno de ellos.

Para desarrollar una muestra sintética con tres niveles de concentración de oxígeno disuelto, se realizaron las siguientes pruebas:

#### **3.6.5.1. Generación de tres concentraciones de oxígeno utilizando sales reductoras**

Para la generación de las concentraciones de oxígeno, se utilizó agua destilada y se evaluaron dos sales reductoras. La primera sal fue sulfito de sodio, la cual es la indicada por el fabricante del equipo para realizar las verificaciones. La segunda sal fue nitrito de sodio, la cual tiene características reactivas similares al sulfito de sodio. Las pruebas realizadas fueron las siguientes:

- **Generación de concentración 1. Catalizadores HCl y calor**
  1. Se añadió 310 mL de agua destilada en una botella de 330mL.
  2. Se añadió 3mL de HCl 0.01N para generar un medio ácido.

3. Se añadió 3000  $\mu\text{L}$  de Sulfito de sodio o de nitrito de sodio (según sea el caso) al 10% p/v.
4. Se enchapó la muestra según la metodología actual.
5. Se calentó 30 minutos a 40°C.
6. Se agitaron las muestras mecánicamente por 5 minutos.
7. Se midió la cantidad de oxígeno disuelto.

- **Generación de concentración 1. Catalizador HCl**

1. Se añadió 310 mL de agua destilada en una botella de 330mL.
2. Se añadió 3mL de HCl 0.01N para generar un medio ácido.
3. Se añadió 3000  $\mu\text{L}$  de Sulfito de sodio o de nitrito de sodio (según sea el caso) al 10% p/v.
4. Se tapó la muestra según la metodología actual.
5. Se agitó las muestras mecánicamente por 5 minutos.
6. Se midió la cantidad de oxígeno disuelto.

- **Generación de concentración 1. Catalizador calor**

1. Se añadió 310mL de agua destilada en una botella de 330mL.
2. Se añadió 1000  $\mu\text{L}$  de Sulfito de sodio o de nitrito de sodio (según sea el caso) al 10% p/v.
3. Se tapó la muestra según la metodología actual.
4. Se calentó 30 minutos a 40°C.
5. Se agitaron las muestras mecánicamente por 5 minutos.
6. Se midió la cantidad de oxígeno disuelto.

- **Generación de concentraciones 2 y 3:**

Para esta evaluación se consideró como catalizador sólo el medio ácido, de acuerdo a los resultados obtenidos en las pruebas de generación del nivel de concentración 1. El procedimiento fue el siguiente:

1. Se añadió 310mL de agua destilada en una botella de 330mL.
2. Se añadió 3mL de HCl 0.01N para generar un medio ácido.

3. Se añadió Sulfito de sodio o de nitrito de sodio al 10% p/v (2000  $\mu$ L para nivel 2 y 1000  $\mu$ L para nivel 3).
4. Se tapó la muestra según la metodología actual.
5. Se agitaron las muestras mecánicamente por 5 minutos.
6. Se midió la cantidad de oxígeno disuelto.

## CAPÍTULO IV

### ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En este capítulo se presenta el análisis de los factores que permitieron determinar las condiciones más favorables para la realización de la medición de oxígeno disuelto en cerveza, seguido por el análisis de los resultados obtenidos en la evaluación de las 4 metodologías propuestas para la generación de los 3 niveles de concentración de oxígeno: adición de agua antes del tapado en campana con gas inerte, inyección de agua después del tapado en campana con gas inerte, implementación de campana a la metodología actual y muestras sintéticas; y su comparación con la metodología actual. Por último, se presenta el análisis de r&R realizado a la mejor muestra obtenida.

#### 4.1. Análisis de factores del método de medición de oxígeno

A continuación se presenta el análisis de resultados para las pruebas de evaluación de los tipos de agitación, del rango de temperaturas y de la implementación de campana utilizando dos gases de purga distintos: dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y nitrógeno (N<sub>2</sub>).

##### 4.1.1. Análisis de los distintos tipos de agitación

TABLA N° 1: Evaluación de los distintos tipos de agitación

| Prueba de agitación | Prueba 1     |        | Prueba 2     |        | Prueba 3     |        |
|---------------------|--------------|--------|--------------|--------|--------------|--------|
|                     | (X±SD)ppb    | RD (%) | (X±SD)ppb    | RD (%) | (X±SD)ppb    | RD (%) |
| Sin agitar          | 4,42 ± 0,28  | 6,28   | 7,70 ± 0,46  | 6,02   | 6,54 ± 0,54  | 8,21   |
| Suave               | 6,00 ± 0,32  | 5,27   | 9,28 ± 0,22  | 2,34   | 8,74 ± 0,34  | 3,85   |
| Vigorosa            | 6,60 ± 0,16  | 2,40   | 11,60 ± 0,89 | 7,71   | 11,60 ± 1,14 | 9,83   |
| Mecánica            | 18,00 ± 2,92 | 16,20  | 19,20 ± 1,64 | 8,56   | 20,20 ± 2,77 | 13,74  |

En la Tabla N°1 se muestran los promedios con su respectiva desviación estándar ( $X \pm SD$ ), así como la desviación relativa (RD) para cada una de las pruebas. Se puede observar que las pruebas presentan la misma tendencia a aumentar la cantidad de oxígeno en las 3 réplicas realizadas. Las muestras sin agitar presentaron los valores más bajos de oxígeno disuelto en cerveza de todas las evaluaciones realizadas. Esto se debe a que la mayor cantidad del mismo se encuentra contenida en el head space (espacio vacío entre el líquido y la tapa de la botella). En el caso de las muestras agitadas, el efecto mecánico permite una mayor disolución del oxígeno en el líquido, debido al contacto continuo entre las fases. Al comparar las distintas agitaciones con la agitación mecánica (agitación de referencia), se observa que esta última presentó los valores más altos en la medición de oxígeno disuelto. Esta diferencia se debe a que la agitación mecánica en comparación con los distintos tipos de agitación manual, permite alcanzar una mayor disolución del oxígeno, lo cual indica que es la agitación más adecuada para generar el equilibrio de fases. Mediante estos resultados se puede constatar que la agitación mecánica es el tipo de agitación adecuado para realizar la medición de oxígeno disuelto tal como reportaron en su estudio Vilacha & Uhlig, en el año 1985.

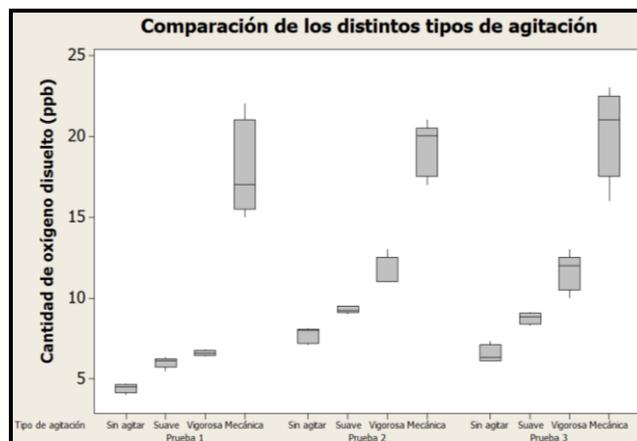


FIGURA 10. Dispersión obtenida durante la evaluación de los tipos de agitación.  
Fuente: Propia

En cuanto a las dispersiones obtenidas durante la realización de las pruebas en la Figura 10 se puede observar que las mayores variaciones se presentan cuando se utiliza el agitador mecánico, esto se debe a que éste puede agitar varias muestras a la vez, añadiendo un tiempo de espera entre la medición de oxígeno disuelto en la primera muestra y las muestras sucesivas, lo que aumenta la variabilidad de los resultados. En el caso de las muestras agitadas manualmente las dispersiones son menores debido a que las muestras son agitadas de manera individual.

#### 4.1.2. Análisis del rango de temperaturas

TABLA N° 2: Evaluación del rango de temperaturas (20±3)°C

| Temperatura<br>(°C) | Prueba 1     |        | Prueba 2     |        | Prueba 3     |        |
|---------------------|--------------|--------|--------------|--------|--------------|--------|
|                     | (X±SD)ppb    | RD (%) | (X±SD)ppb    | RD (%) | (X±SD)ppb    | RD (%) |
| 17                  | 20,00 ± 1,22 | 6,12   | 14,80 ± 0,84 | 5,65   | 19,20 ± 0,84 | 4,36   |
| 20                  | 20,40 ± 1,67 | 8,20   | 14,80 ± 0,84 | 5,65   | 19,00 ± 0,71 | 3,72   |
| 23                  | 19,80 ± 1,48 | 7,49   | 15,20 ± 1,48 | 7,21   | 20,00 ± 0,71 | 3,54   |

En la Tabla N°2 se muestran los valores promedios con su respectiva desviación estándar (X±SD), así como la desviación relativa (RD) para las temperaturas de 17, 20 y 23°C. En esta tabla se puede observar que los valores reportados en la medición de oxígeno disuelto presentan poca variación en el rango (20±3) °C, tendencia que se repite en las tres pruebas realizadas. Lo que indica que la solubilidad del oxígeno es aproximadamente la misma para las temperaturas empleadas por lo que este rango es adecuado para la realización de una buena medición de oxígeno.

En cuanto a las dispersiones se pudo verificar que para las tres temperaturas eran semejantes tal como se observa en la Figura 11.

Esto indica que, independientemente de la temperatura empleada en el baño térmico, se obtiene aproximadamente la misma variabilidad en el proceso de medición de oxígeno.

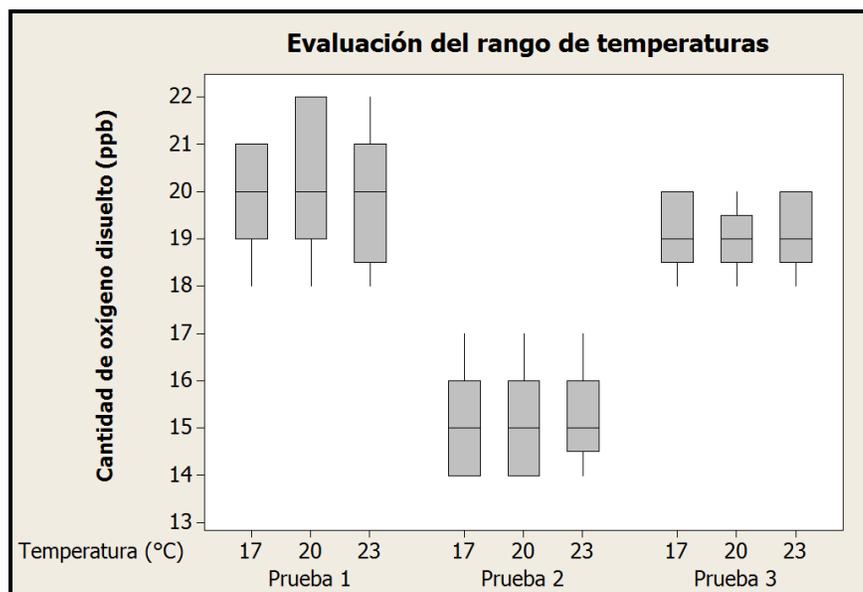


FIGURA 11. Evaluación del rango de temperaturas (20±3)°C. Fuente: Propia

#### 4.1.3. Análisis de la evaluación de campana utilizando como gas de purga nitrógeno y dióxido de carbono en la preparación de las muestras

TABLA N° 3: Evaluación del gas inerte a utilizar

| Gas inerte         | Prueba 1     |        | Prueba 2     |        | Prueba 3     |        |
|--------------------|--------------|--------|--------------|--------|--------------|--------|
|                    | (X±SD)ppb    | RD (%) | (X±SD)ppb    | RD (%) | (X±SD)ppb    | RD (%) |
| Metodología actual | 18,60 ± 0,89 | 4,81   | 17,80 ± 1,10 | 6,15   | 18,00 ± 1,58 | 8,78   |
| Dióxido de carbono | 19,40 ± 0,55 | 2,82   | 20,40 ± 2,07 | 10,16  | 19,60 ± 1,82 | 9,27   |
| Nitrógeno          | 11,60 ± 0,89 | 7,71   | 12,20 ± 0,45 | 3,67   | 12,40 ± 0,55 | 4,42   |

Se evaluaron dos gases de purga durante la implementación de campana: dióxido de carbono y nitrógeno. En la Tabla N°3 se muestran

los resultados obtenidos para las tres pruebas realizadas. De estos resultados, se puede apreciar que el cambio de tapa utilizando la campana con nitrógeno alcanzó los valores más bajos de oxígeno disuelto durante la medición, en comparación con la metodología actual y con la campana empleando CO<sub>2</sub> como gas inerte. No se recomienda el uso de éste último gas inerte, debido a que reporta valores mayores a los obtenidos mediante la aplicación de la metodología actual, posiblemente porque el gas no presenta el grado de pureza necesario para garantizar una atmósfera de bajo contenido de oxígeno.

Bajo esta premisa, es recomendable el uso de nitrógeno como gas de purga adecuado para la realización de la implementación de campana a la metodología actual.

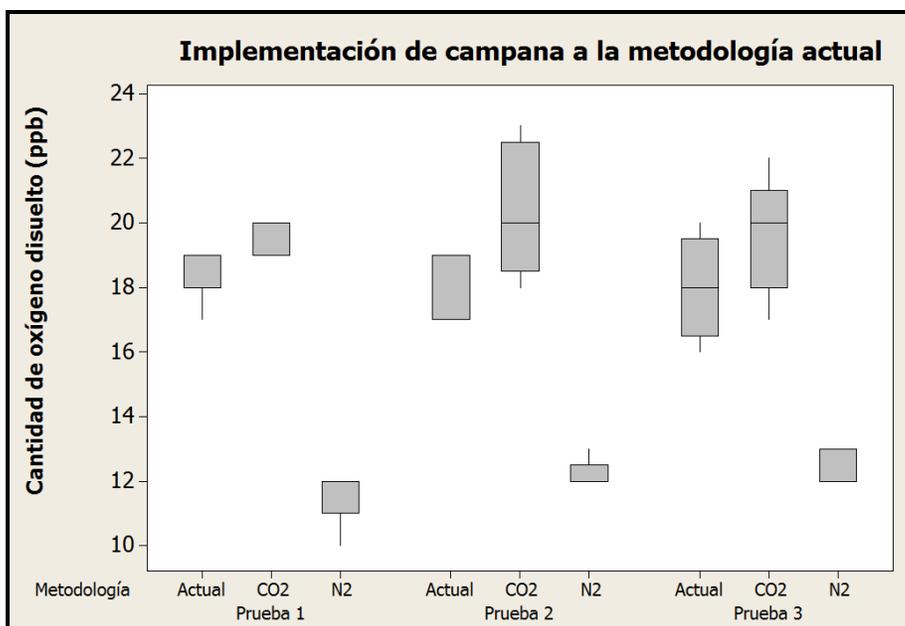


FIGURA 12. Evaluación del gas de purga para la implementación de campana a la metodología actual. Fuente: Propia

En cuanto a las dispersiones, en la Figura 12 se puede observar claramente que la implementación de campana utilizando como gas de

purga nitrógeno presentó las menores variaciones en comparación con la metodología actual. En el caso de la utilización de dióxido de carbono como gas inerte se obtuvieron variaciones aún mayores que las obtenidas mediante la metodología actual, constatándose que su utilización como gas de purga no favorece el proceso de cambio de tapa dentro de la campana.

#### **4.2. Análisis del desarrollo de muestras utilizando como matriz cerveza**

Se evaluaron cuatro metodologías utilizando cerveza como matriz para generar los tres niveles de concentración de oxígeno requeridos para los estudios interlaboratorios: generación de niveles por adición de agua antes del tapado en campana con gas inerte, generación de niveles por inyección de agua después del tapado en campana con gas inerte, implementación de campana a la metodología actual y muestras sintéticas. Se evaluó la repetibilidad de las muestras y su estabilidad por un tiempo de dos semanas a dos temperaturas distintas (5 y 28°C), a continuación se presentan los resultados obtenidos.

##### **4.2.1. Generación de niveles por adición de agua antes del tapado en campana con gas inerte**

En la Tabla N°4 se presentan los resultados para la evaluación de la repetibilidad de las muestras, al finalizar su preparación (semana 0) según esta metodología:

TABLA N° 4: Repetibilidad. Metodología adición de agua antes del tapado

| Nivel de concentración de oxígeno | Repetibilidad |        |
|-----------------------------------|---------------|--------|
|                                   | (X±SD)ppb     | RD (%) |
| 1                                 | 12,80±1,64    | 12,84  |
| 2                                 | 24,40±0,89    | 3,67   |
| 3                                 | 34,00±1,00    | 2,94   |

Como se puede observar la aplicación de esta metodología permite obtener tres niveles de concentración. La adición de agua a la matriz cerveza ayuda a generar de manera efectiva los niveles de concentración de oxígeno que se desean obtener mediante la realización de un simple cálculo como se explicó en el apartado 3.6.2, en donde la separación entre cada nivel se definió con la cantidad de agua añadida. En esta Tabla también se puede observar que la mayor desviación relativa se obtiene para el nivel 1 de concentración de oxígeno, es decir para las muestras obtenidas de planta a las cuales se les realiza la medición de oxígeno directamente. Este resultado, es el esperado debido a que estas muestras no sufren una preparación previa a la medición de oxígeno disuelto, y al ser muestras tomadas al azar de planta pueden presentar alta variabilidad. En cuanto a la generación de los niveles 2 y 3, la desviación relativa es baja lo que permite afirmar que la metodología empleada es adecuada para realizar la generación de los niveles de concentración, ya que permite obtener aproximadamente los mismos valores de oxígeno disuelto en distintas muestras, evidenciando una buena repetibilidad y baja variabilidad como se muestra en la Figura 13.

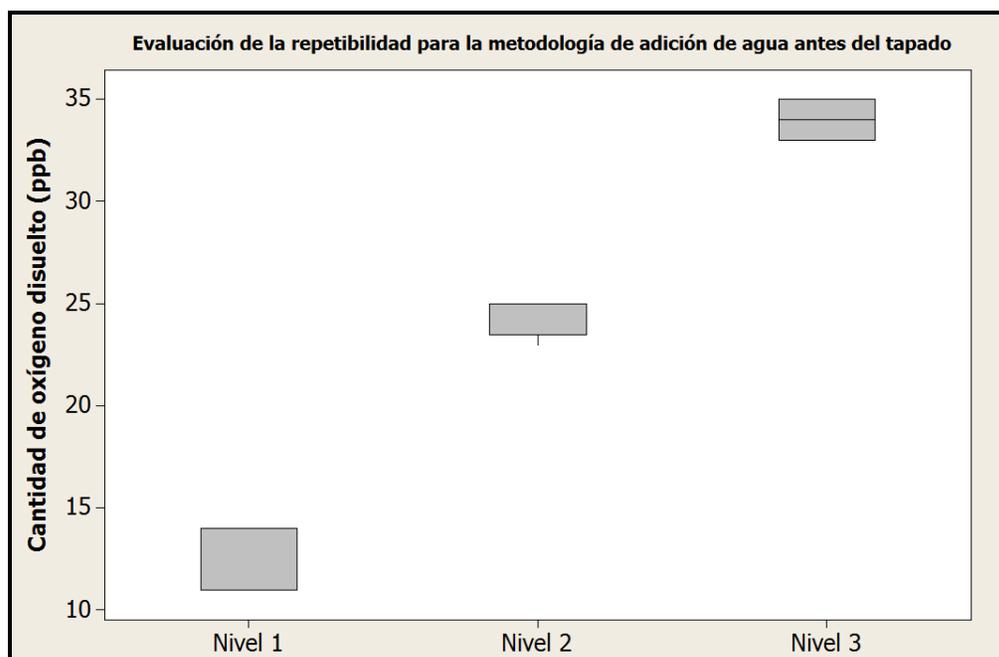


FIGURA 13. Evaluación de la repetibilidad para la metodología de adición de agua antes del tapado. Fuente: Propia

TABLA N° 5: Estabilidad. Metodología de adición de agua antes del tapado

| Semana      | 1          |        | 2          |        |
|-------------|------------|--------|------------|--------|
| Temperatura | 5°C        |        |            |        |
| Nivel       | (X±SD)ppb  | RD (%) | (X±SD)ppb  | RD (%) |
| 1           | 11,33±0,58 | 5,09   | 8,83±0,38  | 4,29   |
| 2           | 21,33±0,58 | 2,71   | 19,33±0,58 | 2,99   |
| 3           | 31,00±1,00 | 3,23   | 30,67±0,58 | 1,88   |
| Temperatura | 28°C       |        |            |        |
| Nivel       | (X±SD)ppb  | RD (%) | (X±SD)ppb  | RD (%) |
| 1           | 11,67±0,58 | 4,95   | 9,63±0,32  | 3,34   |
| 2           | 23,67±1,53 | 6,45   | 20,67±0,58 | 2,79   |
| 3           | 31,67±0,58 | 1,82   | 30,67±0,58 | 1,88   |

En cuanto a la estabilidad de las muestras en la Tabla N° 5 se observa que el patrón es estable en el tiempo para las dos temperaturas evaluadas.

En todas las pruebas de estabilidad la cantidad de oxígeno disuelto disminuye de manera progresiva con el paso del tiempo, manteniendo desviaciones relativas bajas en todos los casos.

En cuanto a las dispersiones, en la Figura 14 se muestra la evaluación de la estabilidad a las temperaturas de 5 y 28°C por el periodo de dos semanas. Se puede observar claramente la existencia de dispersiones bajas con la aplicación de este método.

Con basamento en estos resultados se puede decir que ésta metodología permite obtener muestras homogéneas y estables que pueden ser utilizadas en la realización de estudios interlaboratorios del método de medición de oxígeno.

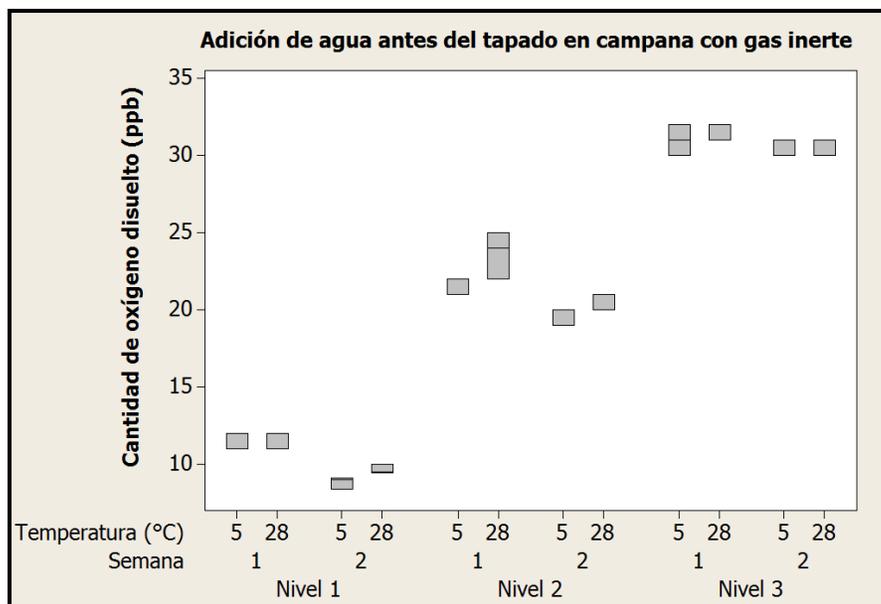


FIGURA 14. Metodología de adición de agua antes del tapado en campana con gas inerte. Fuente: Propia

#### 4.2.2. Generación de niveles por inyección de agua después del tapado en campana con gas inerte

En la Tabla N°6 se presentan los resultados para la evaluación de la repetibilidad de las muestras según esta metodología, evaluadas en el momento de su preparación (semana 0):

TABLA N° 6: Repetibilidad. Metodología inyección de agua después del tapado

| Nivel de concentración de oxígeno | Repetibilidad |        |
|-----------------------------------|---------------|--------|
|                                   | (X±SD)ppb     | RD (%) |
| 1                                 | 13,40±1,34    | 10,01  |
| 2                                 | 25,60±6,95    | 27,15  |
| 3                                 | 63,40±21,23   | 33,49  |

Es posible visualizar la obtención de tres niveles diferentes. Sin embargo, las desviaciones relativas son considerablemente altas, como se puede constatar al observar la Figura 15. Esto pudo deberse a la dificultad que se presentó al momento de inyectar el agua o a fugas presentadas a través del septum por algunas muestras, lo que aumentó la variabilidad del patrón.

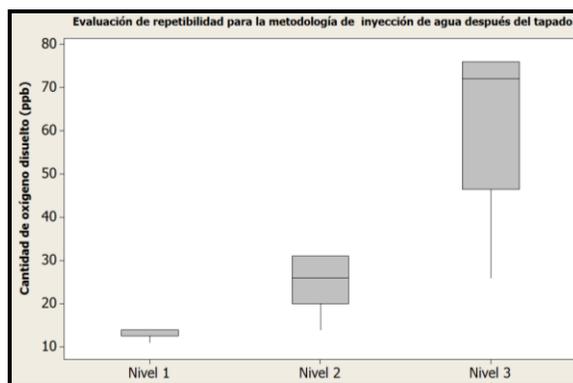


FIGURA 15. Evaluación de repetibilidad para la metodología de inyección de agua después del tapado en campana con gas inerte. Fuente: Propia

TABLA N° 7: Estabilidad. Metodología inyección de agua después del tapado

| Semana      | 1          |        | 2          |        |
|-------------|------------|--------|------------|--------|
| Temperatura | 5°C        |        |            |        |
| Nivel       | (X±SD)ppb  | RD (%) | (X±SD)ppb  | RD (%) |
| 1           | 11,33±0,58 | 5,09   | 8,83±0,38  | 4,29   |
| 2           | 21,33±0,58 | 2,71   | 19,33±0,58 | 2,99   |
| 3           | 31,00±1,00 | 3,23   | 30,67±0,58 | 1,88   |
| Temperatura | 28°C       |        |            |        |
| Nivel       | (X±SD)ppb  | RD (%) | (X±SD)ppb  | RD (%) |
| 1           | 11,67±0,58 | 4,95   | 9,63±0,32  | 3,34   |
| 2           | 23,67±1,53 | 6,45   | 20,67±0,58 | 2,79   |
| 3           | 31,67±0,58 | 1,82   | 30,67±0,58 | 1,88   |

En cuanto a la estabilidad de las muestras en la Tabla N° 7 se observa que el patrón es estable en el tiempo para las dos temperaturas evaluadas. En todas las pruebas de estabilidad la cantidad de oxígeno disuelto disminuyó de manera progresiva con el paso del tiempo, al igual que mejoraron las desviaciones relativas. Por lo que se puede inferir que en la evaluación de la repetibilidad, los resultados fueron afectados enormemente por algunas muestras que presentaron problemas durante la inyección y que fueron utilizadas para la realización de la medición de oxígeno disuelto en este ensayo.

En cuanto a las dispersiones, en la Figura 16 se observa la gran variabilidad obtenida durante la medición de oxígeno disuelto en cerveza, durante la evaluación de la estabilidad de las muestras. Se puede decir, que la metodología de preparación de muestras a partir de la adición de agua después del tapado en campana con gas inerte permite obtener muestras homogéneas y estables, sin embargo debido a la dificultad que se presenta al momento de realizar la inyección de

agua, no se recomienda utilizar las muestras en estudios interlaboratorios del método de medición de oxígeno en cerveza debido a que no se puede garantizar una baja variabilidad durante la preparación de las muestras.

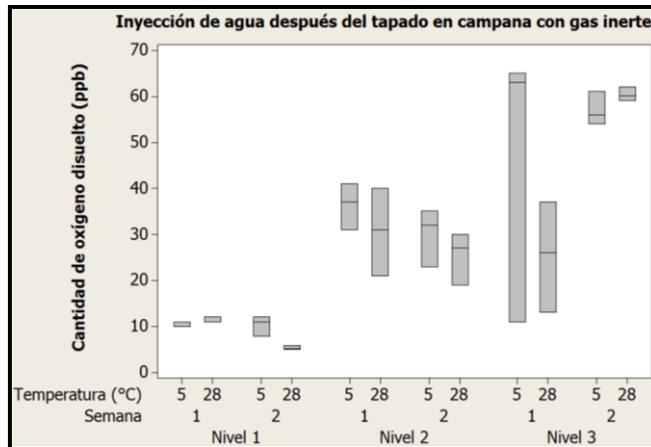


FIGURA 16. Metodología de inyección de agua después del tapado. Fuente: Propia

#### 4.2.3. Generación de niveles según la metodología actual

En la Tabla N°8 se presentan los resultados para la evaluación de la repetibilidad de las muestras según esta metodología:

TABLA N° 8: Repetibilidad. Metodología actual

| Nivel de concentración de oxígeno | Repetibilidad           |        |
|-----------------------------------|-------------------------|--------|
|                                   | ( $\bar{X} \pm SD$ )ppb | RD (%) |
| 1                                 | 16,40 $\pm$ 1,67        | 10,20  |
| 2                                 | 34,80 $\pm$ 7,95        | 22,84  |
| 3                                 | 57,00 $\pm$ 1,58        | 2,77   |

Es evidente la obtención de tres niveles diferentes. Sin embargo, las desviaciones relativas se consideran altas como se observa en la Figura 17. Esto pudo deberse a pequeños movimientos del embolo durante la inyección del aire o a fugas presentadas a través del septum por algunas muestras, lo que aumentó considerablemente la variabilidad del patrón.

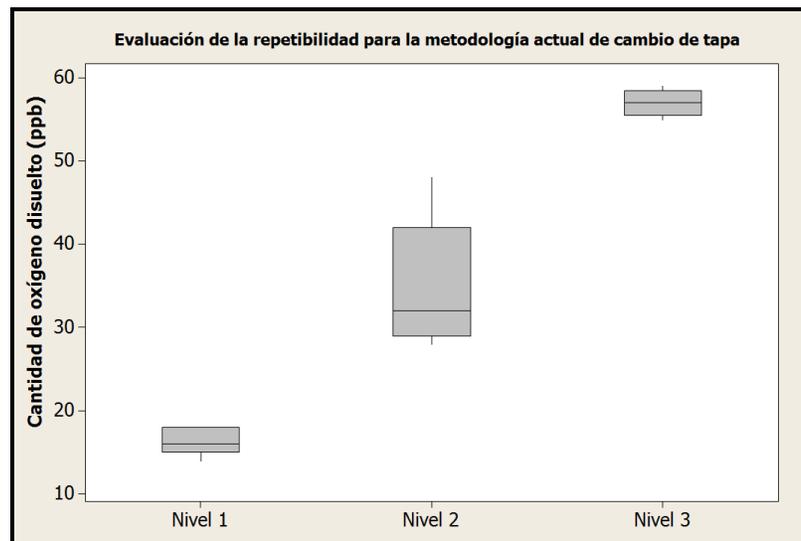


FIGURA 17. Evaluación de la repetibilidad para la metodología actual de cambio de tapa. Fuente: Propia

En cuanto a la estabilidad de las muestras en la Tabla N° 9 se observa que el patrón es estable en el tiempo para las dos temperaturas evaluadas. En todas las pruebas de estabilidad la cantidad de oxígeno disuelto disminuyó de manera considerable y progresiva con el paso del tiempo, y las desviaciones relativas permanecieron con valores altos en especial, aquellos valores reportados para el nivel 2, evidenciando poca efectividad en el proceso de inyección de aire.

TABLA N° 9: Estabilidad. Metodología actual

| Semana      | 1          |        | 2          |        |
|-------------|------------|--------|------------|--------|
| Temperatura | 5°C        |        |            |        |
| Nivel       | (X±SD)ppb  | RD (%) | (X±SD)ppb  | RD (%) |
| 1           | 13,00±1,00 | 7,69   | 8,57±0,38  | 4,42   |
| 2           | 34,67±7,23 | 20,87  | 30,00±6,08 | 20,28  |
| 3           | 52,00±1,00 | 1,92   | 45,00±1,00 | 2,22   |
| Temperatura | 28°C       |        |            |        |
| Nivel       | (X±SD)ppb  | RD (%) | (X±SD)ppb  | RD (%) |
| 1           | 12,33±0,58 | 4,68   | 9,57±0,40  | 4,22   |
| 2           | 36,67±7,23 | 19,73  | 32,67±5,51 | 16,86  |
| 3           | 55,00±2,00 | 3,64   | 49,00±4,58 | 9,35   |

En la Figura 18, se observa las dispersiones asociadas a la aplicación de esta metodología donde se evidencian grandes desviaciones para la evaluación de la estabilidad de las muestras.

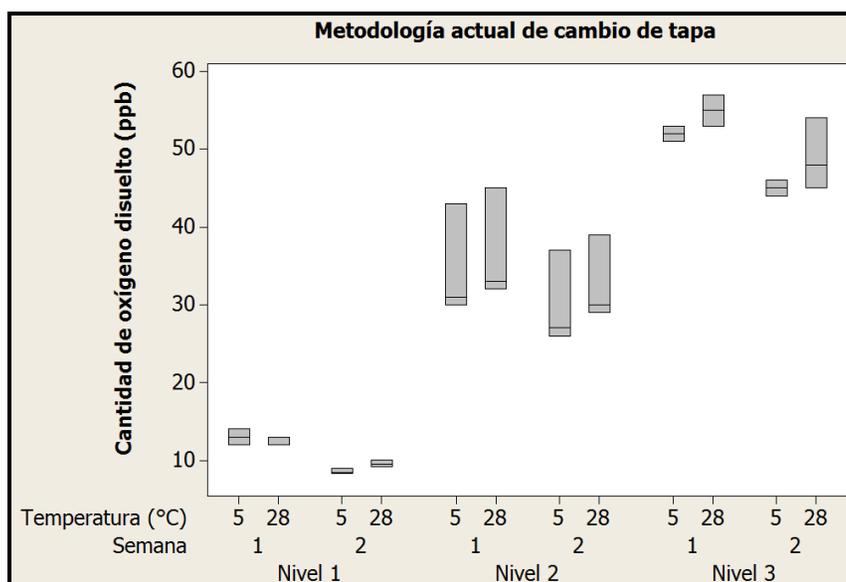


FIGURA 18. Metodología actual de cambio de tapa. Fuente: Propia

Con basamento en estos resultados, se constata que la metodología actual permite la preparación de muestras homogéneas y estables capaces de generar tres niveles diferentes de concentración de oxígeno disuelto, con una variabilidad entre muestras que se considera alta y que puede ser mejorada mediante afinaciones del método o desarrollo de nuevas metodologías.

#### 4.2.4. Generación de niveles a partir de la Implementación de campana a la metodología actual

En la Tabla N°10 se presentan los resultados para la evaluación de la repetibilidad (semana 0) de las muestras según esta metodología:

TABLA N° 10: Repetibilidad. Implementación de campana a la metodología actual

| Nivel de concentración de oxígeno | Repetibilidad     |        |
|-----------------------------------|-------------------|--------|
|                                   | ( $X \pm SD$ )ppb | RD (%) |
| 1                                 | 14,20 $\pm$ 0,45  | 3,15   |
| 2                                 | 26,20 $\pm$ 1,64  | 6,27   |
| 3                                 | 38,80 $\pm$ 1,48  | 3,82   |

Mediante la implementación de esta metodología se obtienen tres niveles diferentes y desviaciones relativas bajas, esto se debe a que al trabajar bajo una atmósfera inerte se evita la adición de aire durante el cambio de tapa, que si ocurre cuando se aplica sólo la metodología actual. Trabajando según esta metodología se garantiza que el único contacto que va a tener la muestra con aire va a ser durante la inyección y no por interacciones con el ambiente, disminuyendo de esta manera la variabilidad como se aprecia en la Figura 19.

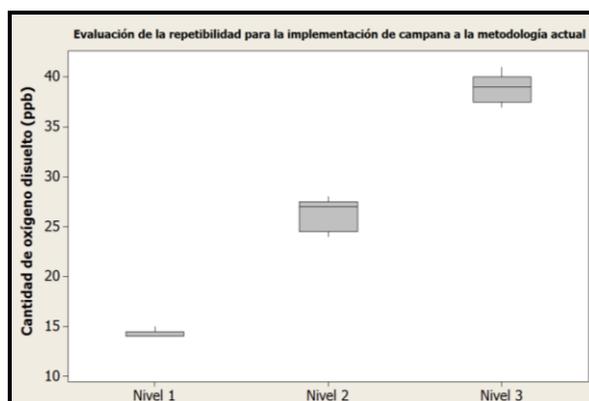


FIGURA 19. Evaluación de la repetibilidad para la implementación de campana a la metodología actual. Fuente: Propia

En cuanto a la estabilidad de las muestras en la Tabla N° 11 se observa que el patrón es estable en el tiempo para las dos temperaturas evaluadas. En todas las pruebas de estabilidad la cantidad de oxígeno disuelto disminuyó ligeramente y de manera progresiva con el paso del tiempo, y las desviaciones relativas permanecieron con valores bajos.

TABLA N° 11: Estabilidad. Implementación de campana a la metodología actual

| Semana      | 1          |        | 2          |        |
|-------------|------------|--------|------------|--------|
| Temperatura | 5°C        |        |            |        |
| Nivel       | (X±SD)ppb  | RD (%) | (X±SD)ppb  | RD (%) |
| 1           | 11,67±0,58 | 4,95   | 9,33±1,15  | 12,37  |
| 2           | 23,00±1,73 | 7,53   | 21,33±2,08 | 9,76   |
| 3           | 36,33±2,08 | 5,73   | 36,00±1,00 | 2,78   |
| Temperatura | 28°C       |        |            |        |
| Nivel       | (X±SD)ppb  | RD (%) | (X±SD)ppb  | RD (%) |
| 1           | 11,67±0,58 | 4,95   | 6,33±0,58  | 9,12   |
| 2           | 24,67±1,53 | 6,19   | 21,67±2,08 | 9,61   |
| 3           | 37,33±1,53 | 4,09   | 36,33±0,58 | 1,59   |

En la Figura 20 se observa las dispersiones asociadas a la aplicación de esta metodología donde se evidencian pequeñas desviaciones para la evaluación de la estabilidad de las muestras. Esto permite concluir que la implementación de campana a la metodología actual permite disminuir las dispersiones de las muestras.

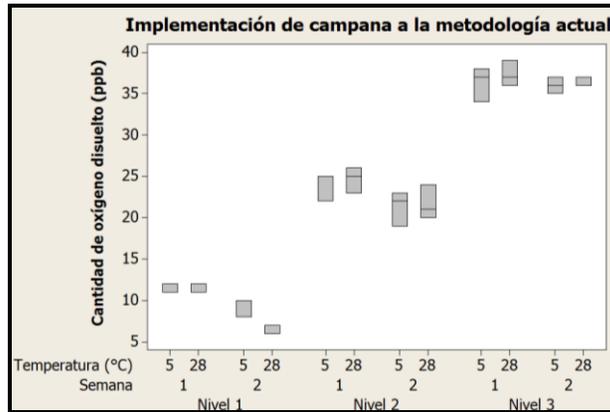


FIGURA 20. Implementación de campana a la metodología actual. Fuente: Propia

### 4.3 Análisis de las pruebas realizadas para el desarrollo de la metodología de preparación de muestras sintéticas

Para desarrollar la metodología de preparación de muestras sintéticas se realizó previamente el estudio de la estabilidad de la muestra propuesta (patrón sintético). Adicionalmente fue necesario realizar pruebas preliminares para la evaluación del método de llenado, temperatura de calentamiento, concentración del ácido y catalizadores a utilizar. A continuación se presentan estos resultados seguidos de la evaluación de la metodología propuesta.

### 4.3.1. Estabilidad del patrón

La estabilidad del patrón fue evaluada durante varios días con la finalidad de determinar el tiempo necesario que debía transcurrir desde la preparación de la muestra sintética hasta la realización de la medición de oxígeno disuelto, para que el contenido de oxígeno no continúe variando en el tiempo. En la Figura 21 se muestran los resultados obtenidos para las evaluaciones realizadas durante 7 días, en horas de la mañana (A) y las realizadas en horas la tarde (B). Se puede apreciar que para los dos primeros días de evaluación las muestras presentan las mayores dispersiones, disminuyendo a partir del día 3 y estabilizándose a partir del día 4 (Ver apéndice C). Se concluye a partir de estos resultados, que la medición de oxígeno disuelto en muestras sintéticas debe realizarse a partir del cuarto día contando como día 1, el de preparación de la muestra.

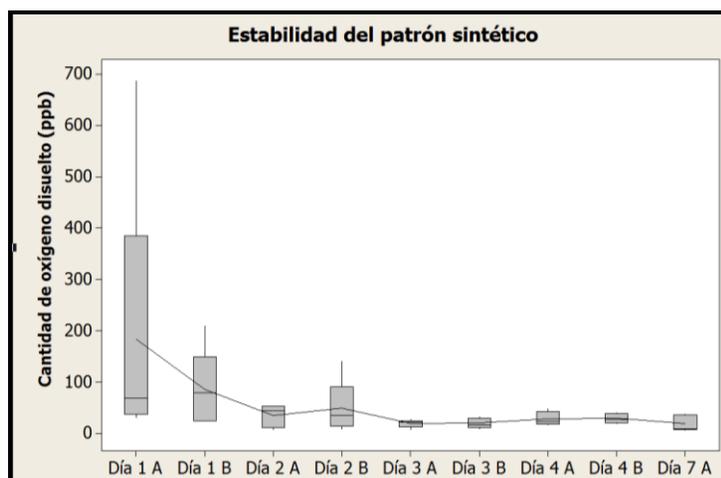


FIGURA 21. Estabilidad del patrón sintético. Fuente: Propia

### 4.3.2. Evaluación del método de llenado

En la Tabla N°12 se puede observar que los valores más bajos de oxígeno disuelto se obtienen cuando se utiliza como agente reductor el sulfito de sodio, esto debido a que presenta un potencial redox mayor

que el nitrito de sodio. En cuanto al método de llenado es claramente visible que el llenado por rebose permite obtener una desviación relativa menor entre las muestras, como se puede evidenciar para el caso del sulfito de sodio en la Figura 22, la misma tendencia se repite para el caso del nitrito de sodio (Ver apéndice B)

TABLA N° 12: Evaluación del método de llenado

| Método de llenado | Sulfito de sodio        |        |
|-------------------|-------------------------|--------|
|                   | ( $\bar{X} \pm SD$ )ppb | RD (%) |
| Por peso          | 41,80±1,79              | 4,28   |
| Por rebose        | 30,80±1,10              | 3,56   |
| Método de llenado | Nitrito de sodio        |        |
|                   | ( $\bar{X} \pm SD$ )ppb | RD (%) |
| Por peso          | 7050,80±464,68          | 6,59   |
| Por rebose        | 6243,40±134,15          | 2,15   |

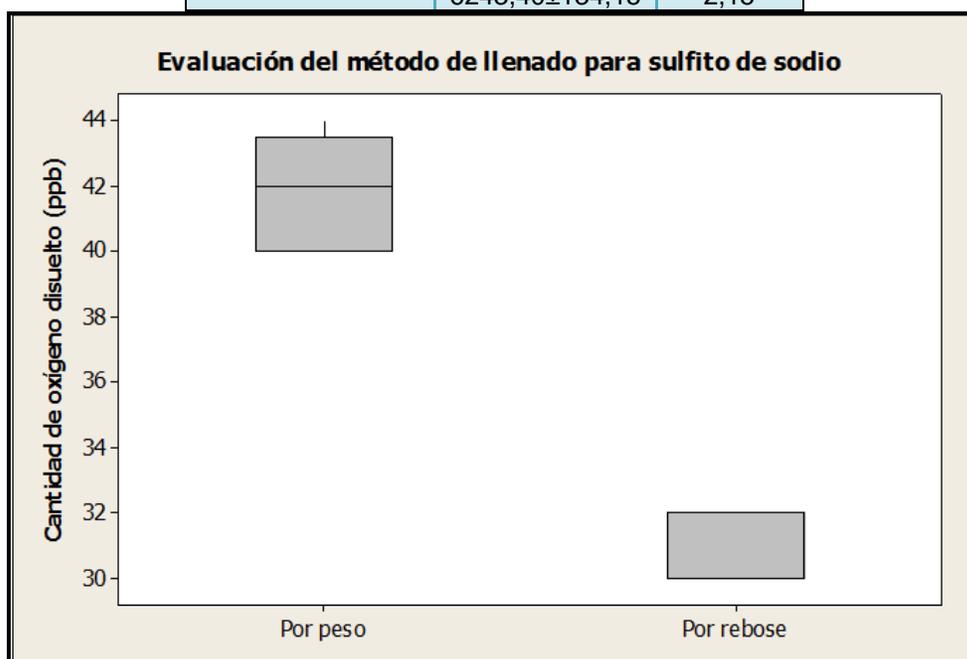


FIGURA 22. Evaluación del método de llenado para el sulfito de sodio. Fuente: Propia

### 4.3.3. Evaluación de la temperatura de calentamiento

TABLA N° 13: Evaluación de la temperatura de calentamiento

| Temperatura de calentamiento (°C) | Sulfito de sodio |        |
|-----------------------------------|------------------|--------|
|                                   | (X±SD)ppb        | RD (%) |
| 40                                | 18,10±11,28      | 62,34  |
| 50                                | 158,78±141,47    | 89,10  |
| 60                                | 79,40±78,55      | 98,93  |
| Temperatura de calentamiento (°C) | Nitrito de sodio |        |
|                                   | (X±SD)ppb        | RD (%) |
| 40                                | 6516,60±124,87   | 1,92   |
| 50                                | 6741,80±408,75   | 6,06   |
| 60                                | 6931,00±511,59   | 7,38   |

En la Tabla N°13 se presentan los resultados para la evaluación de la temperatura de calentamiento. Se puede apreciar que en el caso del sulfito de sodio las desviaciones relativas son muy altas, aun cuando los valores reportados se encuentran dentro del rango de medición de oxígeno. Esto pudo deberse a que la dosificación utilizada de 250 µL de sulfito de sodio posiblemente fue muy baja, y no se logró completar la reacción entre el agente reductor y el oxígeno. En el caso del nitrito de sodio, para la misma dosificación, se reportan valores de oxígeno disuelto que se encuentran fuera del rango de evaluación deseado, presentando altas dispersiones por encima de los 100 ppb para todas las temperaturas. Por lo que preliminarmente podemos descartar el uso de este agente para el desarrollo de muestras sintéticas. Por otra parte, se observa claramente que los valores reportados para la temperatura de 40°C, presenta las menores

desviaciones en ambas pruebas bajo las mismas condiciones de estudio, por lo que se decidió que de las temperaturas evaluadas esta temperatura de calentamiento era la más favorable para el desarrollo de la muestra sintética. En cuanto a las dispersiones en la Figura 23 se puede observar que se presentan pequeñas variaciones entre los valores reportados, en especial para el caso del sulfito de sodio.

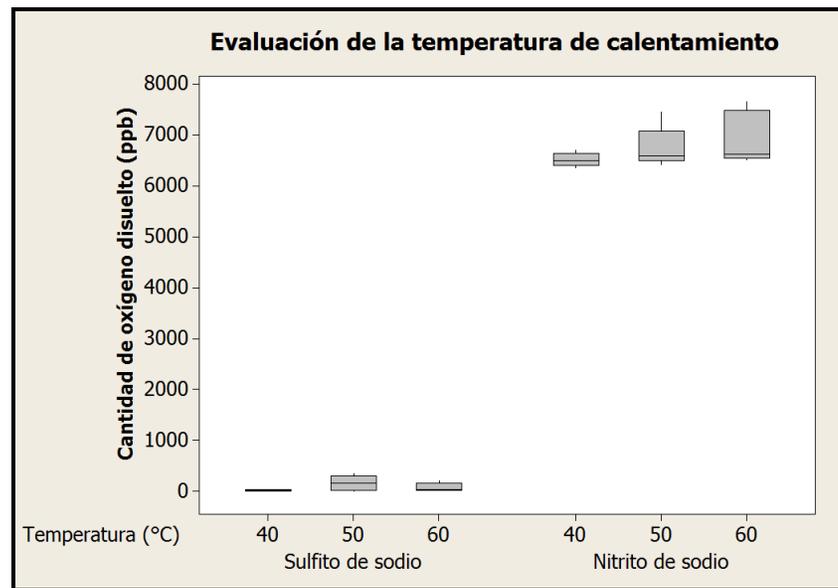


FIGURA 23. Evaluación de la temperatura de calentamiento. Fuente: Propia

#### 4.3.4. Análisis de la concentración del ácido a utilizar

En la Tabla N°14 se presentan las dos concentraciones de ácido evaluadas, se puede apreciar que mediante la utilización de HCl 0,01 N se logra obtener los valores de medición de oxígeno disuelto más bajos y con menor desviación relativa para sulfito de sodio. Como se puede observar en la Figura 24 la misma tendencia es observada cuando se utiliza nitrito de sodio, por lo que se evidencia que la concentración del ácido adecuada para realizar la adición durante la preparación de las muestras sintéticas es 0,01 N.

TABLA N° 14: Análisis de la concentración del ácido

| Concentración del ácido | Sulfito de sodio |        |
|-------------------------|------------------|--------|
|                         | (X±SD)ppb        | RD (%) |
| 0,01 N                  | 20,60±0,55       | 2,66   |
| 2 N                     | 1460,80±710,50   | 48,64  |
| Concentración del ácido | Nitrito de sodio |        |
|                         | (X±SD)ppb        | RD (%) |
| 0,01 N                  | 6056,00±125,17   | 2,07   |
| 2 N                     | 6837,00±1246,29  | 18,23  |

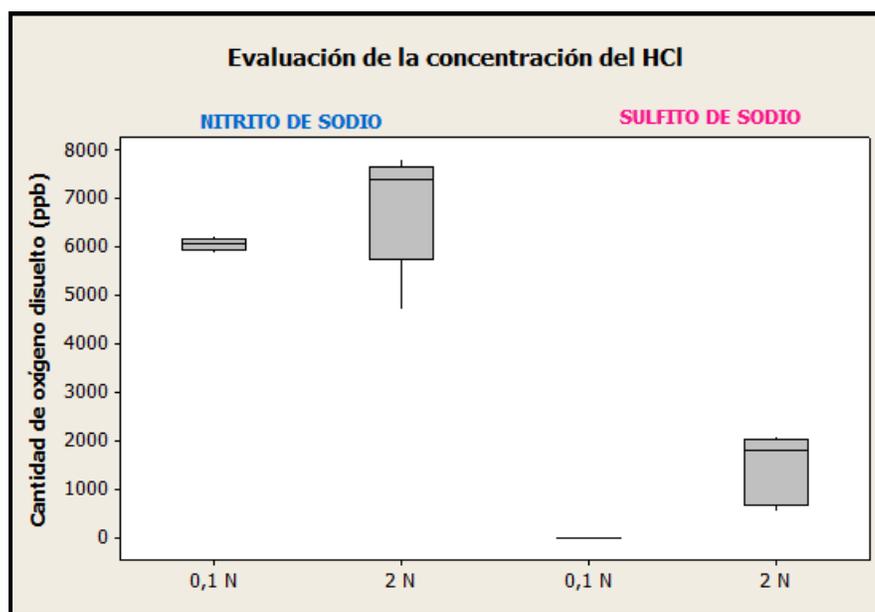


FIGURA 24. Evaluación de la concentración del HCl. Fuente: Propia

#### 4.3.5. Análisis de la evaluación de los catalizadores (HCl y calor)

TABLA N° 15: Análisis de la evaluación de catalizadores

| Agente reductor  | ( $X \pm SD$ )ppb    | RD (%) |
|------------------|----------------------|--------|
| Sulfito de sodio | 72,80 $\pm$ 2,05     | 2,82   |
| Nitrito de sodio | 3998,20 $\pm$ 363,28 | 9,09   |

En la Tabla N° 15 se presenta la evaluación de la utilización de los catalizadores de manera conjunta: adición de ácido y calor. Se puede observar que utilizando ácido clorhídrico de concentración 0,01 N y adicionando calor de manera constante a una temperatura de 40°C, se obtienen valores dentro del rango de medición de oxígeno y con una baja desviación relativa para el caso del sulfito de sodio. Se sigue observando la misma tendencia para el nitrito de sodio, de reportar valores fuera del rango de medición de oxígeno y con altas dispersiones, como se puede apreciar en la Figura 25, donde evidentemente las menores variaciones son presentadas para el caso del sulfito de sodio y las mayores para el nitrito de sodio.

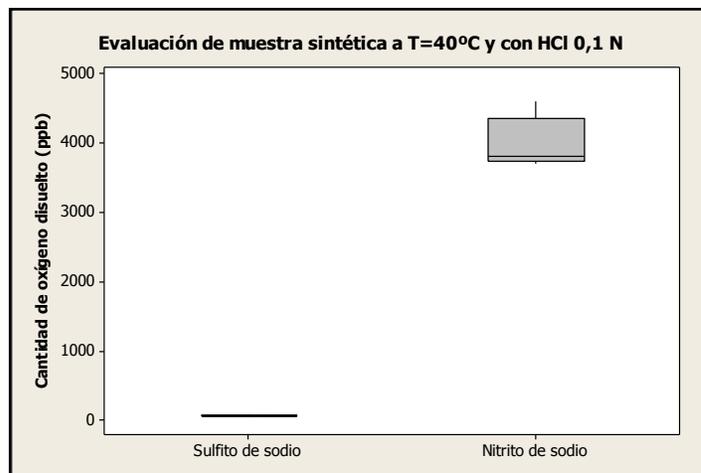


FIGURA 25. Evaluación de catalizador T=40°C y [HCl]=0,01 N. Fuente: Propia

Al comparar con las evaluaciones de los catalizadores de manera individual se concluye que los mejores resultados durante la medición de oxígeno disuelto se reportan cuando se utiliza solamente HCl 0,01 N, y en segundo lugar se posicionan los resultados obtenidos cuando se utilizan HCl 0,01 N y T= 40 °C. Por otra parte, con base en todas las pruebas realizadas se selecciona finalmente al sulfito de sodio, como agente reductor más adecuado para utilizar durante el desarrollo de la muestra sintética, debido a que permite obtener los mejores resultados bajo las mismas condiciones.

#### **4.3.6. Análisis de los resultados a partir de la aplicación de la metodología de muestras sintéticas**

A partir de las pruebas preliminares se determinó que el método de llenado a utilizar era por rebose, que se utilizaría como catalizador solamente ácido clorhídrico 0,01 N, debido a que permitía obtener los valores más bajos de oxígeno disuelto y con menor dispersión, y que el agente reductor adecuado era el sulfito de sodio. Posteriormente, se evaluó la dosificación del agente reductor. Para ello se realizaron pruebas empíricas que permitieron determinar la dosificación a utilizar 3000, 2000 y 1000 µL para los niveles de concentración de oxígeno 1, 2 y 3 respectivamente. En la Tabla N° 16 se presentan las primeras dosificaciones utilizadas para la generación de los tres niveles de concentración de oxígeno. Se muestra una separación entre los niveles de aproximadamente 5 ppb. Esta separación es considerada pequeña por lo que cualquier variación puede conllevar a un solapamiento de los niveles y por lo tanto se considera que estas dosificaciones generan un mismo nivel.

TABLA N° 16: Prueba 1. Generación de niveles de concentración de oxígeno

| Dosificación (μL)  | (X±SD)ppb  | RD (%) |
|--------------------|------------|--------|
| <b>Nivel 1 480</b> | 20,80±2,17 | 10,42  |
| <b>Nivel 2 440</b> | 25,80±2,17 | 8,40   |
| <b>Nivel 3 400</b> | 30,00±1,00 | 3,33   |

Con base en estos resultados, se realizó una segunda prueba en donde el nivel más alto de concentración de oxígeno era determinado por la dosificación de 440 μL. Se escogió esta dosificación debido a que representa el promedio de las dosificaciones utilizadas, los resultados obtenidos se muestran en la Tabla N°17.

TABLA N° 17: Prueba 2. Generación de niveles de concentración de oxígeno

| Dosificación (μL)  | (X±SD)ppb  | RD (%) |
|--------------------|------------|--------|
| <b>Nivel 1 640</b> | 13,80±1,79 | 12,96  |
| <b>Nivel 2 540</b> | 19,20±1,79 | 9,32   |
| <b>Nivel 3 440</b> | 28,40±1,95 | 6,86   |

Se evidencia nuevamente la posibilidad de solapamiento entre los niveles debido a la mínima separación existente entre ellos. Por lo tanto, se decide aumentar las dosificaciones a 3000 μL para el nivel 1, 2000 μL para el nivel 2 y 1000 μL para el nivel 3; basados en que posiblemente la utilización de pequeñas cantidades y con poca separación en cuanto a cantidad dosificada (100 μL) de la solución de sulfito de sodio no permitió la diferenciación de los niveles por el sistema de medición.

TABLA N° 18: Repetibilidad. Muestra sintética

| Nivel de concentración de oxígeno | Repetibilidad           |        |
|-----------------------------------|-------------------------|--------|
|                                   | ( $\bar{X} \pm SD$ )ppb | RD (%) |
| 1 (3000 $\mu$ L)                  | 15,40 $\pm$ 3,21        | 20,84  |
| 2 (2000 $\mu$ L)                  | 21,80 $\pm$ 0,84        | 3,84   |
| 3 (1000 $\mu$ L)                  | 36,40 $\pm$ 3,85        | 10,57  |

En la Tabla N° 18 se observa los resultados obtenidos mediante la utilización de esta nueva dosificación para la generación de los niveles de concentración de oxígeno. Se evidencia una clara diferenciación entre los niveles 2 y 3. Y una diferencia no tan marcada para el nivel 1 y 2. Las dispersiones asociadas a la prueba se muestran en la Figura 26, siendo consideradas altas, exceptuando el nivel 2.

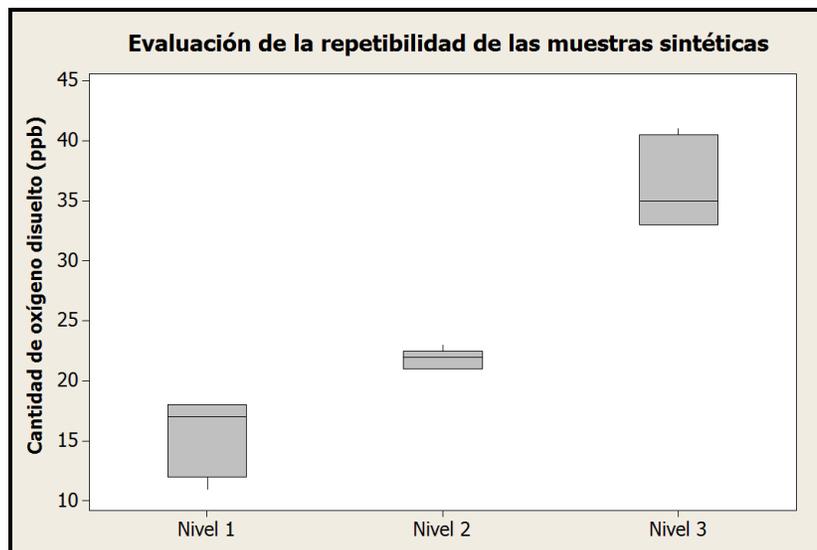


FIGURA 26. Evaluación de la repetibilidad de las muestras sintéticas. Fuente: Propia

TABLA N° 19: Estabilidad. Muestras sintéticas

| Semana      | 1          |        | 2          |        |
|-------------|------------|--------|------------|--------|
| Temperatura | 5°C        |        |            |        |
| Nivel       | (X±SD)ppb  | RD (%) | (X±SD)ppb  | RD (%) |
| 1           | 9,56±0,69  | 7,25   | 3,67±0,35  | 9,58   |
| 2           | 15,00±1,00 | 6,67   | 8,07±0,95  | 11,78  |
| 3           | 19,67±1,53 | 7,77   | 18,33±1,53 | 8,33   |
| Temperatura | 28°C       |        |            |        |
| Nivel       | (X±SD)ppb  | RD (%) | (X±SD)ppb  | RD (%) |
| 1           | 10,00±1,00 | 10,00  | 3,33±0,29  | 8,66   |
| 2           | 15,33±1,15 | 7,53   | 8,53±0,45  | 5,28   |
| 3           | 20,00±1,00 | 5,00   | 18,67±1,53 | 8,18   |

En cuanto a la estabilidad de las muestras sintéticas, en la Tabla N°19 se observa que la cantidad de oxígeno disuelto disminuye con el tiempo para las dos temperaturas evaluadas, evidenciándose la estabilidad del patrón desarrollado. La variabilidad de las muestras se presentan en la Figura 27, siendo considerada en general dispersiones muy altas.

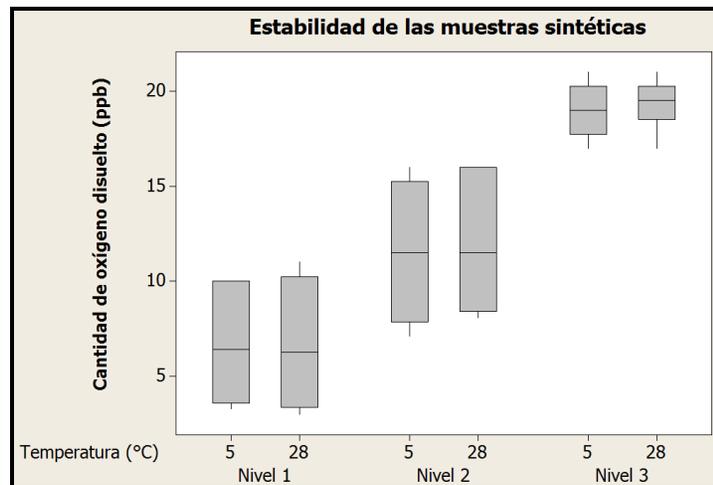


FIGURA 27. Estabilidad de las muestras sintéticas. Fuente: Propia

#### **4.4. Comparación de las metodologías desarrolladas con respecto a la metodología actual**

En la Tabla N° 20 se presenta un resumen de los resultados obtenidos para cada una de las metodologías evaluadas, se puede observar claramente que la inyección de agua después del tapado en campana con gas inerte, no representa una mejora con respecto a la metodología actual debido a que presenta desviaciones relativas mucho mayores. En cuanto a las demás metodologías se puede afirmar que todas representan una mejora real con respecto a la metodología actual, debido a que permiten generar tres niveles de concentración diferentes. Siendo la mejor muestra la obtenida a partir de la aplicación de la metodología de adición de agua antes del tapado en campana con gas inerte.

En la Figura 28 se muestran las 5 metodologías evaluadas, siendo identificadas de la siguiente manera:

**Metodología 1:** Generación de niveles por adición de agua antes del tapado en campana con gas inerte.

**Metodología 2:** Generación de niveles por inyección de agua después del tapado en campana con gas inerte.

**Metodología 3:** Generación de niveles según la metodología actual.

**Metodología 4:** Generación de niveles a partir de la Implementación de campana a la metodología actual.

**Metodología 5:** Muestras sintéticas.

Se evidencia claramente bajas dispersiones para el caso de las metodologías 1,4 y 5; y muy altas dispersiones en el caso de las metodologías 2 y 3.

TABLA N° 20: Comparación de metodologías desarrolladas con respecto a la metodología actual

| Nivel de concentración de oxígeno | Metodología actual                                |        |                                      |        |
|-----------------------------------|---|--------|--------------------------------------|--------|
|                                   | (X±SD)ppb   |        | RD (%)                               |        |
| 1                                 | 16,40±1,67  |        | 10,20                                |        |
| 2                                 | 34,80±7,95  |        | 22,84                                |        |
| 3                                 | 57,00±1,58  |        | 2,77                                 |        |
| Nivel de concentración de oxígeno | Adición de agua antes del tapado                  |        | Inyección de agua después del tapado |        |
|                                   | (X±SD)ppb   | RD (%) | (X±SD)ppb                            | RD (%) |
| 1                                 | 12,80±1,64  | 12,84  | 13,40±1,34                           | 10,01  |
| 2                                 | 24,40±0,89  | 3,67   | 25,60±6,95                           | 27,15  |
| 3                                 | 34,00±1,00  | 2,94   | 63,40±21,23                          | 33,49  |
| Nivel de concentración de oxígeno | Implementación de campana a la metodología actual |        | Muestra sintética                    |        |
|                                   | (X±SD)ppb   | RD (%) | (X±SD)ppb                            | RD (%) |
| 1                                 | 14,20±0,45  | 3,15   | 15,40±3,21                           | 20,84  |
| 2                                 | 26,20±1,64  | 6,27   | 21,80±0,84                           | 3,84   |
| 3                                 | 38,80±1,48  | 3,82   | 36,40±3,85                           | 10,57  |

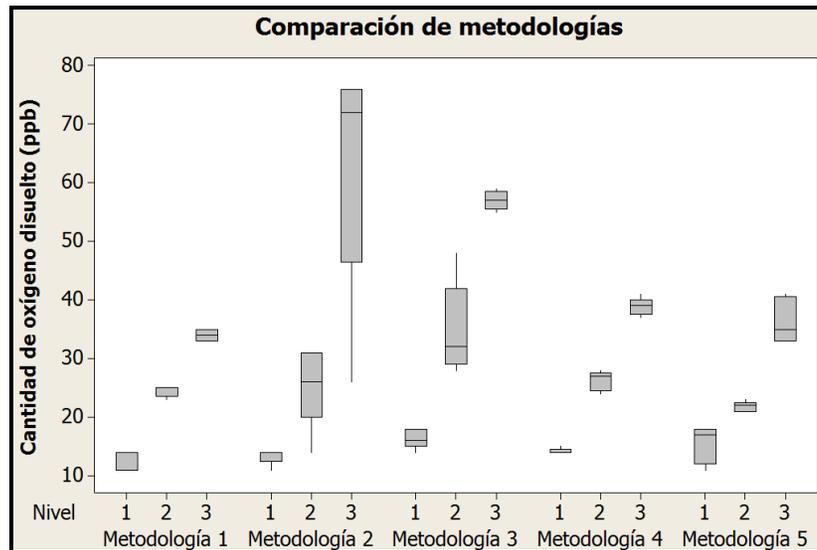


FIGURA 28. Comparación de metodologías. Fuente: Propia

#### 4.5. Estudio de repetibilidad y reproducibilidad

Los resultados finales del presente estudio arrojaron que tres de las 4 metodologías desarrolladas: adición de agua antes del tapado en campana inerte, implementación de campana a la metodología actual y muestras sintéticas; representan una mejora con respecto a la metodología actual de preparación de muestras desarrollada por De Amorín. Obteniendo los mejores resultados mediante la aplicación de la metodología de adición de agua antes del tapado en campana con gas inerte. Para realizar el estudio de reproducibilidad y repetibilidad (r&R) de la mejor muestra obtenida se realizó una lista de las ventajas y desventajas de estas 3 metodologías, de manera de discriminar entre ellas y escoger la mejor para la realización del análisis:

#### 4.5.1. Comparación de metodologías adición de agua antes del tapado en campana con gas inerte, implementación de campana a la metodología actual y muestras sintéticas

A continuación se presenta la Tabla N°21 donde se compara las tres metodologías propuestas para la realización del análisis r&R:

TABLA N° 21: Comparación de metodologías propuestas para el estudio r&R

| Metodología de preparación                               | Ventajas   | Desventajas   |
|--|--|---|
| <b>Adición de agua antes del tapado</b>                  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- No requiere el uso de reactivos</li> <li>- La preparación de las muestras es de muy bajo costo</li> <li>- El tiempo de preparación de las muestras es muy rápido.</li> <li>- Pueden ser utilizadas muestras de planta</li> <li>- Disminuye el error debido a reproducibilidad y repetibilidad con respecto al error de referencia (24%).</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Se ve afectada por variabilidad del proceso.</li> <li>- Se debe emplear tiempo en la logística para retirar las muestras de planta.</li> </ul>       |
| <b>Implementación de campana a la metodología actual</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Pueden ser utilizadas muestras de planta.</li> <li>- Disminución del error debido a la repetibilidad y reproducibilidad con respecto al de referencia (24%).</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Se ve afectada por variabilidad del proceso</li> <li>- Tiene un costo agregado debido a la utilización de N<sub>2</sub> como gas de purga</li> </ul> |

Continuación Tabla N°21: Comparación de metodologías propuestas para el estudio r&R

|                                   |  |   |
|-----------------------------------|--|---|
| <p><b>Muestras sintéticas</b></p> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Las muestras son preparadas en el laboratorio, no dependen de planta por lo que representan un ahorro de tiempo en cuanto a logística para su obtención.</li> <li>- La preparación es rápida, se necesitan 1 hora para la preparación de 45 muestras.</li> <li>- Disminuye el error debido a reproducibilidad y repetibilidad con respecto al error de referencia (24%).</li> <li>- No se necesitan tapas horadadas con septum lo que representa un menor costo en la preparación de las muestras.</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Uso de químicos y materiales de vidrio (pipetas volumétricas) que hacen necesario el uso de implementos de seguridad.</li> <li>- Debe esperarse que el patrón sintético alcance su tiempo de estabilidad (4días) antes de realizar la medición de oxígeno disuelto.</li> </ul> |
|-----------------------------------|--|---|

Con base en las ventajas y desventajas desglosadas anteriormente se concluye que debido a su bajo costo, rápida preparación y posibilidad de utilizar muestras de planta, definitivamente la metodología de adición de agua antes de enchapar es la escogida para la realización del estudio r&R.

En la Tabla N° 22 se encuentran los resultados del estudio de reproducibilidad y repetibilidad para la metodología de adición de agua antes del tapado en campana con gas inerte, se observa la obtención de resultados altamente satisfactorios al lograr disminuir el error en un 4,33% con respecto al error de referencia de 24%. Basados en la

premisa de que para que un sistema de medición logre la diferenciación entre niveles, el número de categorías diferentes debe ser mayor a 5, queda constatado que para esta metodología el sistema de medición logra diferenciar los niveles en 7 categorías diferentes.

TABLA N° 22. Resultados del estudio r&R

| <b>Parámetro</b>                    | <b>Resultado</b> | <b>Interpretación</b>   |
|-------------------------------------|------------------|---|
| <b>% Contribución r&amp;R total</b> | 3,87             | Este valor representa la proporción de varianza debida al sistema de medición       |
| <b>% Contribución parte a parte</b> | 96,13            | Este valor representa la proporción de la varianza debida a los diferentes niveles. |
| <b>Repetibilidad</b>                | 18,32            | Error debido un mismo operador al analizar múltiples veces una misma parte          |
| <b>Reproducibilidad</b>             | 7,15             | Error debido a diferentes operadores que analizan una misma parte                   |
| <b>r&amp;R</b>                      | 19,67            | Efecto combinado de los errores debido a repetibilidad y reproducibilidad.          |
| <b>Nº de categorías diferentes</b>  | 7                | Indica si el sistema de medición es capaz de diferenciar entre niveles.             |

Con la disminución del error debido a la reproducibilidad y repetibilidad, se permitió realizar un cambio en la categoría del método a través de los criterios mostrados en el Apéndice E, de la categoría “marginal, casi inaceptable” a la categoría de “bueno”.

## CONCLUSIONES

- El tipo de agitación adecuado para la medición de oxígeno disuelto en cerveza es la agitación mecánica.
- El rango de temperaturas ( $20\pm 3$ ) °C es adecuado para la medición de oxígeno disuelto en cerveza.
- El nitrógeno es el gas de purga adecuado para la implementación de campana.
- La metodología de implementación de campana a la metodología actual, permite obtener 3 niveles de concentración de oxígeno diferentes.
- La metodología de adición de agua antes del tapado en campana con gas inerte, permite obtener 3 niveles de concentración de oxígeno diferentes, de manera efectiva y eficiente.
- La metodología de inyección de agua después del tapado en campana con gas inerte, no representa una mejora con respecto a la metodología actual.
- La metodología para el desarrollo de muestras sintéticas permite obtener 3 niveles de concentración de oxígeno diferentes.
- Las metodologías de adición de agua antes del tapado en campana con gas inerte, implementación de campana a la metodología actual y muestras sintéticas representan una mejora real con respecto a la metodología actual.
- La metodología de adición de agua antes del tapado con gas inerte, permite disminuir el error r&R en un 4,33% (de 24 a 19,67 %) cambiando la categoría del método de “marginal” a “bueno”. Por lo cual, se considera la mejor metodología de preparación de muestras homogéneas y estables para estudios interlaboratorios del método de medición de oxígeno en cerveza.

## RECOMENDACIONES

- Evaluar la metodología de adición de agua antes del tapado en campana con gas inerte, utilizando muestras provenientes de Planta Piloto, con la finalidad de disminuir la variabilidad obtenida en este estudio al utilizar muestras de Planta Los Cortijos.
- Realizar un estudio interlaboratorios utilizando la metodología de adición de agua antes del tapado en campana con gas inerte, para validar los resultados obtenidos.
- Se recomienda la realización de estudios más profundos para el desarrollo de muestras sintéticas a partir de la metodología desarrollada, con la finalidad de disminuir las dispersiones obtenidas y lograr una diferenciabilidad más notable entre todos los niveles de concentración de oxígeno, para ello se sugiere:
  1. Realizar pruebas de preparación de las muestras, utilizando sulfito de sodio y como catalizadores, adición de calor a una temperatura constante de 40°C y adición de HCl a una concentración de 0,01 N, debido a que las pruebas preliminares definieron estas condiciones como una alternativa aplicable a la metodología.
  2. Refrigerar las muestras a 5°C después de su preparación, para evitar interacciones con el ambiente que puedan afectar las mediciones posteriores.

3. Realizar la medición de oxígeno disuelto al séptimo día de realizada la preparación de las muestras para garantizar la estabilidad del patrón sintético.

## BIBLIOGRAFÍA

- **American Society of Brewing Chemists (2007).** Report of the Subcommittee on Method for Reference Standard for Total Package Oxygen.
- **Balestrini, Miriam (2006).** Como se elabora el proyecto de investigación. BL consultores asociados; Caracas.
- **Botero M., Arbeláez O. & Mendoza J. (2007).** Método Anova utilizado para realizar el estudio de repetibilidad y reproducibilidad dentro del control de calidad de un sistema de medición. Universidad Tecnológica de Pereira; Colombia.
- **De Amorín, Carlos. (2005).** Desarrollo de una muestra homogénea y estable para estudios interlaboratorios del método de medición de oxígeno. Trabajo especial de grado. Universidad Simón Bolívar, Sartenejas.
- **García, Félix (2001).** Estudios interlaboratorios en química analítica. Visión Tecnológica. México.
- **Gutiérrez H. & De La Vara R. (2004).** Control estadístico de la calidad y seis sigma. McGraw Hill Interamericana Editores, S.A de C.V, Desarrollo Santa Fé, México.
- **Instructivo llenadora de botellas (2012).** Empresas Polar C.A, Venezuela.
- **Instructivo de medición de oxígeno en cerveza (2007).** Empresas Polar C.A, Venezuela.
- **Instructivo de preparación de muestras para interlaboratorios de oxígeno (2006).** Empresas Polar C.A, Venezuela.
- **Instructivo para la realización de interlaboratorios del método de medición de oxígeno (2007).** Empresas Polar C.A, Venezuela.

- **Izarra, E. (2001).** Herramientas para el control estadístico de calidad básico. Universidad de Los Andes; Mérida.
- **Norma Covenin ISO-9000:2000 (2000).** Sistema de gestión de la calidad. Fundamentos y vocabulario. Fondonorma 2000, Venezuela.
- **Norma Covenin 91:2002 (2002).** Cerveza. Fondonorma 2002, Venezuela.
- **Norma ISO/IEC 17025:2005 (2005).** Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración.
- **O2 Gehaltemeter (2006).** Manual de instrucciones O-DGM Haffmans.
- **Soprano, María (2010).** Evaluación del desempeño de todos los equipos operativos de oxígeno en cerveza, en las 4 plantas cerveceras. Empresas Polar, Los cortijos; Caracas.
- **Velazco A. (2011).** Tecnología química aplicada a la fabricación de cerveza. Chemquímica C.A, Venezuela.
- **Vilachá, C. y Uhlig, K. (1985).** The measurement of low levels of oxygen in bottled beer. Brauwelt International.
- **Wehrmann C., De Amorín C. & Zufall C. (2007).** A novel method for interlaboratory analysis of total package oxygen. Empresas Polar C.A, Venezuela.

## **APENDICES**

### **Apéndices A. Metodología de referencia desarrollada por la ASBC**

1. Se debe medir y tabular el valor de la presión atmosférica.
2. Se llena una jeringa hermética con un volumen conocido de aire.
3. Se Destapa una botella de cerveza pasteurizada.
4. Se golpea suavemente un lado de la botella con una varilla, para inducir el espumeo.
5. Cuando el flujo de espuma disminuya, se inyecta el aire contenido en ella.
6. Inmediatamente se procede a tapar la botella.

Se deben preparar 6 muestras por cada nivel de concentración de oxígeno (nivel 2 y 3). Para el nivel 1 se sugiere utilizar muestras sin inyección de aire como blancos comparativos.

## Apéndice B. Evaluación del método de llenado para nitrito de sodio

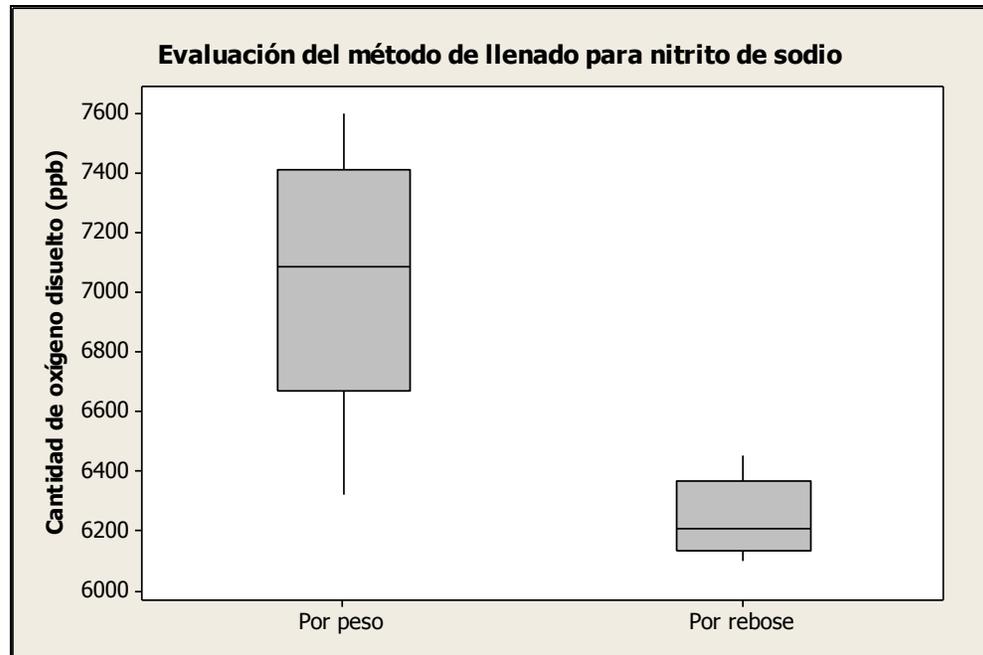


FIGURA 29. Evaluación del método de llenado para nitrito de sodio. Fuente: Propia

## Apéndice C. Estabilidad del patrón

TABLA N° 23: Estabilidad del patrón

| Día de evaluación | Momento de medición | ( $X \pm SD$ )ppb  | RD (%) |
|-------------------|---------------------|--------------------|--------|
| 1                 | Mañana              | 282,3 $\pm$ 153,90 | 153,90 |
| 1                 | Tarde               | 75,4 $\pm$ 87,68   | 87,68  |
| 2                 | Mañana              | 21,2 $\pm$ 60,78   | 60,78  |
| 2                 | Tarde               | 52,5 $\pm$ 105,00  | 105,00 |
| 3                 | Mañana              | 7,7 $\pm$ 38,23    | 38,23  |
| 3                 | Tarde               | 9,6 $\pm$ 46,38    | 46,38  |
| 4                 | Mañana              | 13,5 $\pm$ 46,35   | 46,35  |
| 4                 | Tarde               | 9,0 $\pm$ 30,27    | 30,27  |
| 7                 | Mañana              | 5,7 $\pm$ 48,42    | 48,42  |

## Apéndice D. Estudio de repetibilidad y reproducibilidad de las muestras

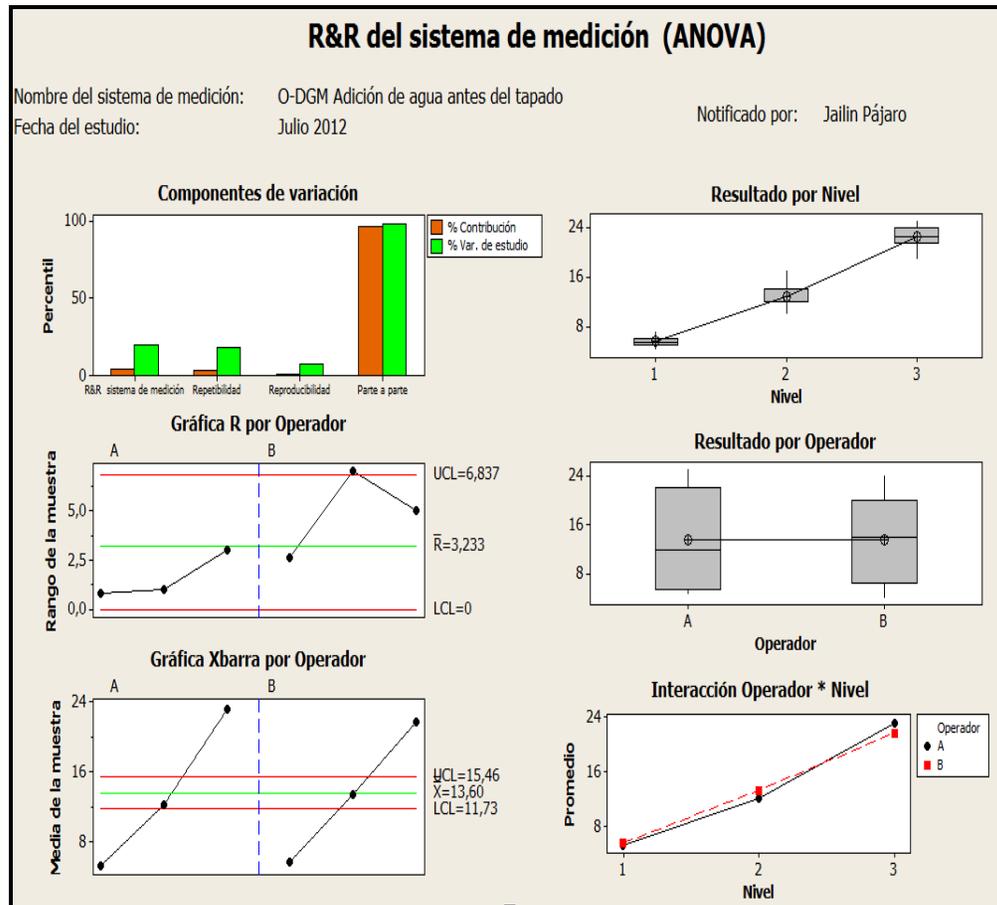


FIGURA 30. Estudio R&R metodología adición de agua antes de enchapar. Fuente: Propia

## Apéndice E. Criterios para la evaluación de métodos de ensayo

TABLA N° 24: Criterios para la evaluación de métodos de ensayo

| <b>Categoría del método</b> | <b>Rango de r&amp;R</b> |
|-----------------------------|-------------------------|
| Excelente                   | $r\&R < 10$             |
| Bueno                       | $10 \leq r\&R < 20$     |
| Marginal, casi inaceptable  | $20 \leq r\&R < 30$     |
| Inaceptable                 | $r\&R \geq 30$          |