



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

Validación de un método de análisis de volátiles
mayoritarios en cerveza y sidra por GC-FID

Autor

Jaime Manau Montorio

Directores

Ricardo López Gómez
Ignacio Ontañón Alonso

Facultad de Ciencias
Departamento de Química Analítica
Curso 2022-2023

ÍNDICE DE CONTENIDO

Resumen/abstract	
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Volátiles presentes en la cerveza y en la sidra	1
1.2 Técnicas de extracción y de análisis de los volátiles mayoritarios.....	2
1.3 Validación de métodos de análisis	3
2. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO	4
3. EXPERIMENTAL.....	4
3.1 Materiales, reactivos, equipos y métodos	4
3.1.1 Reactivos, disolventes y disoluciones usadas.....	4
3.1.2 Patrones químicos	4
3.1.3 Muestras.....	6
3.1.4 Equipo y método cromatográfico.....	6
3.1.5 Procedimiento del método a validar.....	7
3.2 Ampliación del método propuesto para nuevos compuestos	8
3.3 Calibración.....	8
3.4 Estudio de los límites de detección y de cuantificación.....	8
3.5 Estudio de reproducibilidad	9
3.6 Estudio de recuperación.....	9
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	10
4.1 Ampliación del método propuesto para nuevos compuestos	10
4.2 Calibración, rango lineal y límites de detección y de cuantificación.....	13
4.3 Estudio de la recuperación	15
4.4 Estudio de la reproducibilidad.....	18
4.5 Análisis de cervezas y sidras	23
5. Conclusiones.....	25
6. Bibliografía.....	26
Anexos	27

Resumen/abstract

El presente trabajo de fin de grado se centra en la validación de un método analítico, el cual había sido desarrollado y validado originalmente para la determinación cuantitativa de volátiles mayoritarios en vino, para su aplicación en dos bebidas distintas, cerveza y sidra.

El método consiste en una microextracción líquido-líquido dispersiva con diclorometano y sulfato de amonio como agente dispersante. El extracto se inyecta en modo split en un cromatógrafo de gases y su separación se produce en una columna cromatográfica polar. La detección se realiza con un detector de ionización con llama (FID).

El proceso de validación se ha llevado a cabo para la determinación de los 30 cuantificables con el método original para vino y de 4 nuevos compuestos (acetato de feniletilo, 4-etilfenol, 4-etilguaiacol, 4-vinilguaiacol y 1-propanol) característicos de las nuevas bebidas.

Los parámetros de validación estudiados: sensibilidad (límite de detección y cuantificación), linealidad, recuperación y reproducibilidad, han sido estimados tanto en una matriz sintética como en muestras reales. Tras realizar la validación del método, éste se aplicó al análisis de 5 cervezas y 3 sidras de características muy diferentes.

Se concluyó que el método es satisfactorio para la cuantificación de más de 30 compuestos en cerveza y en sidra. Las R^2 obtenidas para la mayor parte de los compuestos se encuentran entre 0.983 y 0.999. La mayoría de los analitos presentan reproducibilidades por debajo del 15% tanto en las cervezas como en las sidras, siendo algo mejor en aquellas muestras en las que los compuestos están en concentración muy superiores a la de los límites de cuantificación. Se han obtenido valores de recuperación óptimos para la mayor parte de los compuestos estudiados.

The present final degree work is focused on the validation of an analytical method, which had been originally developed and validated for the quantitative determination of volatile majorities in wine, for its application in two different beverages, beer and cider.

The method consists of a dispersive liquid-liquid microextraction with dichloromethane and ammonium sulfate as dispersing agent. The extract is injected in split mode in a gas chromatograph and its separation takes place in a polar chromatographic column. Detection is performed with a flame ionization detector (FID).

The validation process was carried out for the determination of the 30 compounds quantifiable with the original method for wine and 4 new compounds (phenylethyl acetate, 4-ethylphenol, 4-ethylguaiacol, 4-vinylguaiacol and 1-propanol) characteristic of the new beverages.

The validation parameters studied: sensitivity (limit of detection and quantification), linearity, recovery and reproducibility, have been estimated both on a synthetic matrix and on real samples. After the validation of the method, it was applied to the analysis of 5 beers and 3 ciders with very different characteristics.

It was concluded that the method is satisfactory for the quantification of more than 30 compounds in beer and cider. The R^2 obtained for most of the compounds are between 0.983 and 0.999. Most of the analytes present reproducibilities below 15% in both beers and ciders, being somewhat better in those samples in which the compounds are in concentrations much higher than the limits of quantification. Optimum recovery values have been obtained for most of the compounds studied.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Volátiles presentes en la cerveza y en la sidra

La cerveza y la sidra son dos de las bebidas fermentadas más populares del mundo, debido a su amplia diversidad de sabores y aromas, los cuales atraen a una amplia variedad de consumidores.^{1,8}

El aroma de estas bebidas es muy complejo desde el punto de vista químico. Esto se debe principalmente al gran número de sustancias volátiles que se encuentran formando parte de su composición química y cuya concentración varía desde los g/L hasta los ng/L. Entre estos volátiles se encuentran los volátiles mayoritarios.^{1,8}

Los volátiles mayoritarios son los compuestos volátiles que se encuentran aproximadamente en concentraciones entre 10 y 200 mg/L. Estos compuestos se originan durante los procesos de producción de estas bebidas y dado que tanto la materia prima como su fabricación es diferente entre cerveza y sidra, los compuestos mayoritarios que pueden aparecer, así como su rango de aparición, son diferentes en ambas matrices.^{1,8}

En la cerveza, tienen origen en las etapas de su elaboración. Muchos de ellos provienen de los ingredientes específicos utilizados como la malta o el lúpulo.

Durante el malteado y el macerado, las primeras etapas de su elaboración, se genera una parte de estos volátiles mayoritarios. En el malteado se germinan y secan los granos de cebada para dar la malta y luego en el macerado, estos granos de malta molidos se mezclan con agua y mediante las enzimas presentes en ellos se descomponen los almidones en azúcares fermentables.^{1,8,12}

Como hemos comentado, los volátiles mayoritarios presentes también dependen de si la cerveza tiene lúpulo o no. El lúpulo es una planta que se utiliza en la elaboración de cerveza y que se añade después de la maceración al líquido resultante conocido como mosto. Durante su proceso de cocción con el mosto, además de sustancias amargas, también se liberan volátiles característicos de esta planta. Debido a esto, las cervezas sin lúpulo y con lúpulo van a presentar distintos tipos de estos volátiles y con distintas concentraciones. Por ejemplo, en un estudio de olfatometría, se compararon estos dos tipos de cerveza y se encontró que se percibieron más intensamente compuestos como el acetato de feniletilo o el 2-feniletilanol en las cervezas con lúpulo que en las sin lúpulo.^{1,8}

Después del enfriamiento y filtrado del mosto, tiene lugar el proceso de fermentación alcohólica del mismo. Es el proceso a partir del cual, las levaduras convierten a los azúcares presentes en etanol y dióxido de carbono. En él se originan la mayor parte de volátiles mayoritarios, entre ellos se encuentran alcoholes, esteres, aldehídos y cetonas.^{1,8,12}

Además de por esto, a medida que la cerveza madura, también pueden producirse reacciones químicas que generan compuestos volátiles adicionales. Es importante destacar que, por tanto, la combinación y concentración de estos volátiles mayoritarios va a variar dependiendo del tipo de cerveza, de las técnicas de elaboración utilizadas y de los procesos de envejecimiento.⁸

El proceso de elaboración de la sidra es más sencillo que el de la cerveza, lo que resulta en una matriz menos compleja. En este caso los volátiles mayoritarios pueden provenir de los siguientes orígenes:

- De compuestos presentes en las propias manzanas. Por eso, dependiendo del tipo de manzana que se utiliza para hacer la sidra, va a haber mucha variedad de estos compuestos.³
- De la fermentación, al igual que en la cerveza, en este proceso se generan muchos volátiles que contribuyen a los aromas y sabores característicos de la sidra. En cuanto a los volátiles mayoritarios, se generan alcoholes superiores (propanol, iso-butanol, isoamílico), ésteres de etilo (acetato y lactato), acetaldehído y metanol.³
- De los procesos de envejecimiento. Al igual que en la cerveza, durante la maduración de la sidra en el tonel, o posteriormente en el embotellado, pueden ocurrir reacciones químicas que generen compuestos volátiles adicionales o evolución de los ya presentes.^{2,3}

Estas diferencias entre ambas bebidas hacen que cada una de ellas tengan unos perfiles de sabores y aromas únicos.

1.2 Técnicas de extracción y de análisis de los volátiles mayoritarios.

Los métodos de análisis que podemos utilizar para el análisis cuantitativo de compuestos volátiles en cervezas y sidras están basados principalmente en cromatografía de gases, acoplada en la mayor parte de los casos a detectores de ionización de llama (GC-FID) o de espectrometría de masas (GC-MS). La elección del detector a utilizar depende principalmente del rango de concentraciones en el que se encuentran los compuestos que se desea analizar. En el caso del análisis de volátiles mayoritarios, se puede utilizar el detector FID porque tienen la concentración suficiente para ser detectados con esta técnica.⁴

El análisis de componentes volátiles en bebidas alcohólicas por cromatografía de gases es complicado debido a que contienen una gran cantidad de compuestos no volátiles que podrían dañar la columna, además, el etanol representa casi el 98-99% del área de los picos cromatográficos, mientras que en el porcentaje restante se encuentra distribuido en más de un centenar de componentes, lo que dificulta su identificación y cuantificación. Por ello, su análisis no se puede hacer por inyección directa, se deben implementar técnicas de extracción y concentración.¹³

Las técnicas de extracción que podemos usar son:

- Microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME): Esta técnica implica la dispersión de un disolvente de extracción en una muestra acuosa, seguida de la separación de la fase de extracción por centrifugación. Es la técnica ampliamente utilizada, ya que sirve para la extracción exitosa de muchos volátiles mayoritarios, aunque el número de compuestos que puede extraer depende mucho del tipo de disolvente y agente dispersante utilizado. Además, como ventaja es una técnica rápida y sencilla que requiere una mínima cantidad de disolvente y de muestra.⁴
- Extracción en fase sólida (SPE): Se basa en la adsorción selectiva de los analitos sobre un soporte sólido, los cuales posteriormente son eluidos con el disolvente orgánico adecuado. Es una técnica que se ha comprobado que funciona bien para la extracción de volátiles en sidra, ya que con esta técnica se pudieron cuantificar por primera vez compuestos como el 1,3-

octanodiol o el 5-octen-1,3-diol. La desventaja de este método es el tiempo de análisis, sobre todo cuando se deben analizar grandes cantidades de muestras.³

- Microextracción en fase sólida (SPME): es una versión de la SPE en la que la retención de los analitos se basa en la absorción y/o adsorción. Consiste en exponer una fibra recubierta con un polímero, insertada en un dispositivo similar a una jeringa, a los vapores de una muestra durante el tiempo necesario hasta alcanzar un equilibrio termodinámico entre la concentración de compuestos volátiles en la matriz y en la fase vapor. No requiere el uso de disolventes orgánicos, lo que reduce el riesgo de contaminación y los costes asociados a la eliminación de residuos, pero para el análisis de volátiles mayoritarios, esta técnica tiene un inconveniente ya que se ha comprobado que este método permite cuantificar pocos tipos de volátiles mayoritarios y a veces falla en el análisis de los compuestos más polares.^{3,4}
- Extracción de espacio de cabeza dinámico (DHS): consiste en la preconcentración de la fase vapor que se desprende de la muestra, que puede ser sólida o líquida, para después ser inyectada directamente en el cromatógrafo. Para ello, se circula un gas inerte en el espacio de cabeza que arrastra los analitos, los cuales son recogidos y concentrados en una trampa fría o sólido adsorbente. Después, los compuestos retenidos son liberados por desorción térmica y liberados en el cromatógrafo. Aunque tenga la ventaja de que se puede hacer una inyección directa al cromatógrafo, es una técnica que depende mucho de la temperatura y del tiempo de equilibrio y durante la extracción puede haber pérdidas parciales de algunos compuestos, lo que puede afectar a la precisión y exactitud de los resultados. Además, esta técnica requiere equipos costosos y complejos y en la cerveza se ha comprobado que tiene poca sensibilidad.
^{6,2}

1.3 Validación de métodos de análisis

Validar un método, es el proceso que hay que seguir para comprobar que un determinado método analítico es adecuado para poder resolver un problema analítico.⁷

El proceso consiste en establecer las características y las limitaciones del método, como pueden ser la precisión, el rango de concentraciones en el que podemos trabajar o el límite de detección y cuantificación. Pero, además, también tenemos que identificar factores que puedan hacer que estas características del método cambien, como por ejemplo, compuestos interferentes o cambios en la matriz.⁷

De esta manera podremos saber que analitos se pueden analizar por este método y en qué matrices funciona correctamente. Es decir, la validación del método nos permite decidir si el método de análisis es adecuado para nuestro propósito.⁷

Para poder llevarlo a cabo, el equipo y la instrumentación utilizada debe funcionar correctamente y estar perfectamente calibrada.⁷

2. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO

El principal objetivo del trabajo consiste en:

Validar un método analítico usado en el vino para la determinación cuantitativa de volátiles mayoritarios para dos matrices distintas (cerveza y sidra).

Para lograr este objetivo principal, se han abordado los siguientes objetivos parciales:

1. Se requiere aprender a manejar el cromatógrafo de gases utilizado, además del software que lo dirige.
2. Ampliación del método para nuevos compuestos.
3. Elaboración de rectas de calibrado para cada compuesto.
4. Realización de estudios de límites de detección, recuperaciones y reproducibilidad.
5. Análisis de muestras de cerveza y sidra

3. EXPERIMENTAL

3.1 Materiales, reactivos, equipos y métodos

3.1.1 Reactivos, disolventes y disoluciones usadas.

Los reactivos y disolventes utilizados durante el desarrollo de este TFG se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Especificaciones de los reactivos/disolventes utilizados

Reactivo/disolvente	Calidad	Suministrador
Diclorometano	GLC-Pesticide residue grade	Fisher Scientific
Etanol absoluto	LiChrosolv, HPLC	Merck
Agua purificada	Milli Q	Milli Q
Sulfato amónico anhidro	ACS-ISO	Panreac

Además, se preparó una cerveza/sidra sintética. Esta cerveza/sidra sintética es una disolución acuosa con un 5% de etanol, que tiene una concentración de 5 g/L de ácido málico y tiene un pH de 4,0, ajustado con NaOH.

3.1.2 Patrones químicos

Se ha llevado a cabo la validación del método de análisis para 34 compuestos diferentes, 29 de ellos ya estaban presentes en el método original aplicado a vino y se incluyeron 5 compuestos nuevos (acetato de feniletilo, 4-etilfenol, 4-etilguaiacol, 4-vinilguaiacol y 1-propanol) por ser encontrados en bibliografía como compuestos mayoritarios característicos de sidra o cerveza.^{8,9,10,11}

Además, utilizamos también 5 estándares internos, 4 del método original utilizado en vino y el 3,4-dimetilfenol, que introdujimos para algunos de los nuevos compuestos añadidos. A partir de estos estándares internos se elaboró una disolución que contenía a todos ellos.

Todos estos compuestos se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Especificaciones y características de los patrones químicos usados.

Analitos	Suministrador	Pureza (%)
Acetaldehido	Aldrich	99,5
Acetato de etilo	PolyScience	99,7
Propanoato etilo	Fluka	97
Diacetilo	Aldrich	97
Butirato etilo	Aldrich	98
Isobutanol	Merck	99
Acetato isoamilo	Chemservice	98
1-Butanol	Panreac	99,5
Alcohol isoamílico	Aldrich	98,5
Hexanoato etilo	PolyScience	99
Acetato hexilo	Chemservice	99
Acetoína	Aldrich	96
Lactato etilo	Aldrich	98
1-Hexanol	Sigma	99
c-3-hexenol	Aldrich	98
Octanoato etilo	PolyScience	98
Ácido acético	Panreac	99,7
Ácido isobutírico	Aldrich	99
γ-butirolactona	Aldrich	99
Ácido butírico	PolyScience	99,5
Decanoato de etilo	PolyScience	99
Ácido isovaleriánico	Lancaster	98
Succinato de dietilo	Fluka	99
Metionol	Aldrich	98
Ácido hexanoico	PolyScience	99,5
Alcohol bencílico	Aldrich	99
β-feniletanol	Fluka	99
Ácido octanoico	Fluka	98
Ácido decanoico	PolyScience	98

Acetato de feniletilo	Sigma	99
4-etilfenol	Aldrich	99
4-etilguaiacol	Lancaster	98
4-vinilguaiacol	Aldrich	98
1-propanol	Panreac	99,5
S.I.	Suministrador	Pureza (%)
4-metil-2-pentanol	Aldrich	99
Heptanoato de etilo	Aldrich	99
2-octanol	Fluka	99,5
Ácido heptanoico	Fluka	99
3,4-dimetilfenol	Aldrich	98

3.1.3 Muestras

Se utilizaron 5 cervezas y 3 sidras adquiridas en un supermercado tanto para algunas etapas del proceso de validación como para conocer el contenido en dichas muestras de los analitos estudiados mediante el método validado. Las muestras fueron las siguientes:

- Cervezas:
 - Ambar especial (5,2% de etanol)
 - Ambar Export (tostada) (7% de etanol)
 - Franziskaner Weissbier (cerveza de trigo) (5,0% de etanol)
 - Guinness (cerveza negra) (4,2% de etanol)
 - El Aguila (cerveza sin filtrar) (5,5 % de etanol)
- Sidras:
 - Camin (sidra natural) (6% de etanol)
 - Ladrón de Manzanas Verde (4,5% de etanol)
 - Magners (sidra irlandesa) (4,5% de etanol)

3.1.4 Equipo y método cromatográfico

INSTRUMENTACIÓN UTILIZADA:

- Cromatógrafo de gases: modelo GC-8890 de Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA), acoplado a un detector de ionización a la llama, FID.
- Columna cromatográfica: una Zebron™ ZB-WAX, GC Cap. Column 30 m x 0.25 mm d.i. x 0.50 µm de espesor de fase, Phenomenex, Inc. La columna está precedida por una precolumna desactivada de 3 m x 0,25 mm de Agilent Technologies.

- **Injector:** Los extractos se inyectan a 250°C con un automuestreador PAL RSI 85 de CTC Analytics (Zwingen, Suiza) en un injector Split-splitless, con un liner de split ultrainerte con lana de vidrio de Agilent Technologies. El modo de inyección en este método es Split 1/20 con pulso de presión de 24.5 psi hasta 1,9 minutos y el volumen inyectado es de 2 µL.

MÉTODO CROMATOGRÁFICO:

El gas portador es hidrógeno a un flujo constante de 2,15 ml/min.

Tabla 3. Programa cromatográfico

temperatura	rampa	Tiempo espera
40 °C	—	3 min
62 °C	8 °C/min	0 min
90 °C	2 °C/min	0 min
98 °C	8 °C/min	0 min
124 °C	2 °C/min	0 min
230 °C	8 °C/min	5 min

3.1.5 Procedimiento del método a validar

El protocolo de análisis de mayoritarios utilizado para el vino se desglosa en las siguientes etapas, que aparecen detalladas a continuación:

1. Se saca a atemperar la disolución de estándares internos comentada en el apartado 3.1.2, durante un mínimo de 30 minutos antes de su utilización.
2. Se vierte el vino en un matraz de 5 mL de capacidad, hasta aproximadamente la mitad.
3. Se adiciona un volumen de 38 µL de la disolución de estándares internos, haciendo uso de una microjeringa de 100 µL. Esta adición debe realizarse con mucho cuidado, manteniendo la microjeringa en sentido vertical y asegurando que la adición tiene lugar directamente sobre el líquido y no se toca ninguna de las paredes del recipiente. Finalmente, se enrasa con vino con la ayuda de una pipeta Pasteur de plástico, arrastrando bien todas las paredes del matraz.

La microjeringa empleada para la adición de los estándares internos se tiene que limpiar un mínimo de 5 veces antes y después de su uso con disolución agua/etanol al 40% v/v.

4. Se pesa 4,1 g de sulfato amónico y se vierte la sal en un tubo de fondo cónico de centrífuga de 10 mL de capacidad.
5. Se trasvaza el vino de los matraces de 5 mL a vasos de precipitado de 25 mL y de ahí se toman 2,7 mL de la muestra de vino con pipetas de plástico desechables de 5 mL de capacidad y un pipeteador automático y se vierte en el mismo tubo donde previamente se ha añadido el sulfato amónico.

6. Se cogen 6,3 mL de agua Milli-Q de nuevo con una pipeta de plástico de 10 mL y con el pipeteador automático y se vierte en el mismo tubo.
7. Por último se añade al mismo tubo de centrifuga 250 μ L de diclorometano con la ayuda de otra microjeringa, cuyo uso debe ser específico para este paso.
8. Se cierra bien el tubo y se pone a agitar en un agitador horizontal durante 90 minutos a una velocidad de 90 r.p.m.
9. Una vez transcurridos los 90 minutos, se quita el tapón de los tubos y se recubren bien con parafilm. Se centrifugan a 2500 r.p.m. durante 10 minutos, asegurándose previamente que el sistema está equilibrado.
10. Una vez concluida la etapa de centrifugado, se lava otra microjeringa, cuyo uso debe ser exclusivo para llevar a cabo la extracción, con diclorometano un mínimo de 10 veces y con la jeringa ya limpia se retira con pipeta de plástico la fase acuosa, (situada en la parte superior del tubo). A continuación, y con mucho cuidado se recoge la fase orgánica (situada en la parte inferior del tubo) con la microjeringa, asegurándose de no coger nada de fase acuosa que previamente no haya sido retirada. Para ello, retirar 150 μ L aproximadamente del extracto a un vial de inserto. Si no fuera posible trasvasar el volumen indicado sin arrastrar nada de fase acuosa, esta etapa se debe repetir tantas veces como sea necesario. Se debe lavar esta microjeringa con diclorometano 10 veces entre muestra y muestra.
11. El vial de inserto se coloca en el muestrador automático del cromatógrafo de gases CG-FID cuando llegue el momento del análisis de la muestra.

3.2 Ampliación del método propuesto para nuevos compuestos

Para ello, se prepararon disoluciones madre de aproximadamente 1000 mg/L de cada uno de los 5 compuestos diferentes a los que se analizan en el método del vino (acetato de feniletilo, 4-etilfenol, 4-etilguaiacol, 4-vinilguaiacol, 1-propanol y 3,4-dimetilfenol) y a partir de ellas se elaboraron disoluciones de aproximadamente 10 mg/L para cada uno de ellos, que fueron las que se inyectaron en el cromatógrafo.

3.3 Calibración

En primer lugar, se llevó a cabo un estudio bibliográfico ^{8,9,10,11} para conocer cuál era el rango aproximado de aparición de estos compuestos tanto en sidras como en cervezas y poder elegir los puntos de concentración más adecuados para hacer las rectas de calibrado.

Para conseguir las rectas de calibrado se prepararon 6 disoluciones de concentraciones perfectamente conocidas con todos los analitos a partir de disoluciones patrón de estos, una para cada punto de las rectas, cada una con mayor concentración de los analitos que la anterior. Como matriz de las disoluciones utilizamos la cerveza sintética comentada anteriormente en el apartado 3.1.1.

Cada una de las 6 disoluciones se realizó por triplicado y por lo tanto cada recta de calibrado tiene 18 puntos de distinta concentración

3.4 Estudio de los límites de detección y de cuantificación

El cálculo de los límites de detección y de cuantificación se llevó a cabo mediante el uso de las disoluciones de calibrado de concentración más baja.

Para cada uno de los compuestos medimos la altura media de los picos del ruido (R) y la altura del pico del analito (S).

Con la ayuda de estos valores y la concentración exacta del analito en esa disolución ($C_{analito}$), aplicando las ecuaciones 1 y 2 podemos obtener los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) respectivamente.

$$LD = 3 \times C_{analito} \times \frac{R}{S} \quad (1)$$

$$LC = 10 \times C_{analito} \times \frac{R}{S} \quad (2)$$

3.5 Estudio de reproducibilidad

Se realizó por triplicado un dopaje a las 5 cervezas y a las 3 sidras con los 34 compuestos elegidos mencionados en la tabla 2.

Además, se dopó también a la cerveza sintética y se analizó 8 veces distintas.

Las concentraciones teóricas de dopaje añadidas a estas cervezas y sidras se pueden ver en la tabla 1 de los anexos.

Para completar este estudio se analizaron también por triplicado las 5 cervezas y las 3 sidras, pero esta vez sin dopar.

El análisis de estas cervezas dopadas y sin dopar comentadas en este punto se realizó con el método a validar, anteriormente explicado en el punto 3.1.5.

3.6 Estudio de recuperación

El cálculo de la recuperación se lleva a cabo mediante la ecuación 3, donde los términos ($Conc\ dop$) y ($Conc\ sin\ dopar$) son las concentraciones calculadas a partir de las interpolaciones en las rectas de calibrado de los analitos de las cervezas y sidras, dopadas y sin dopar respectivamente, analizadas en el estudio de reproducibilidad (punto 3.5) y el término ($Creal\ añadida$) se obtiene a partir de las concentraciones exactas de los analitos añadidas para hacer las disoluciones dopadas.

$$\%Recuperación = \frac{Conc\ dop - Conc\ sin\ dopar}{Creal\ añadida} \times 100 \quad (3)$$

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Ampliación del método propuesto para nuevos compuestos

A continuación, se muestran los picos del cromatograma de los nuevos compuestos añadidos al método del vino comentados en el punto 3.2.

Figura 1. Pico del acetato de feniletilo.

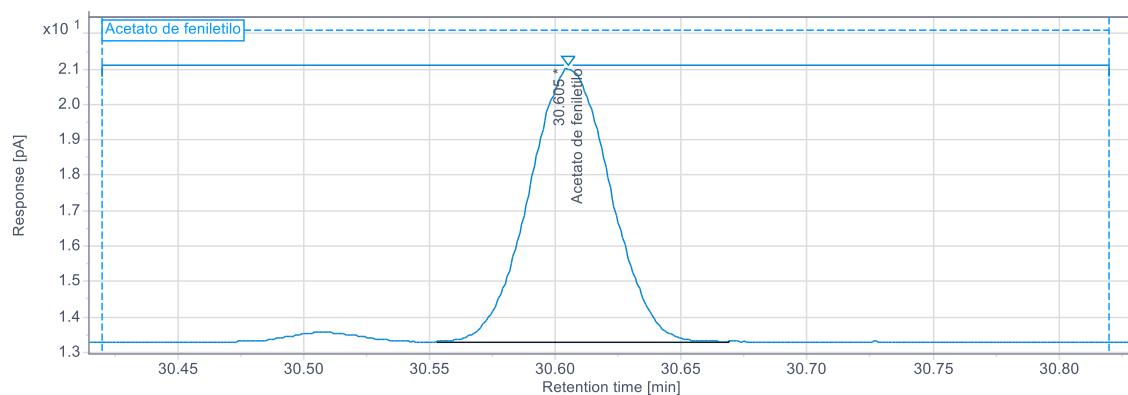


Figura 2. Pico del 4-etilguaiacol.

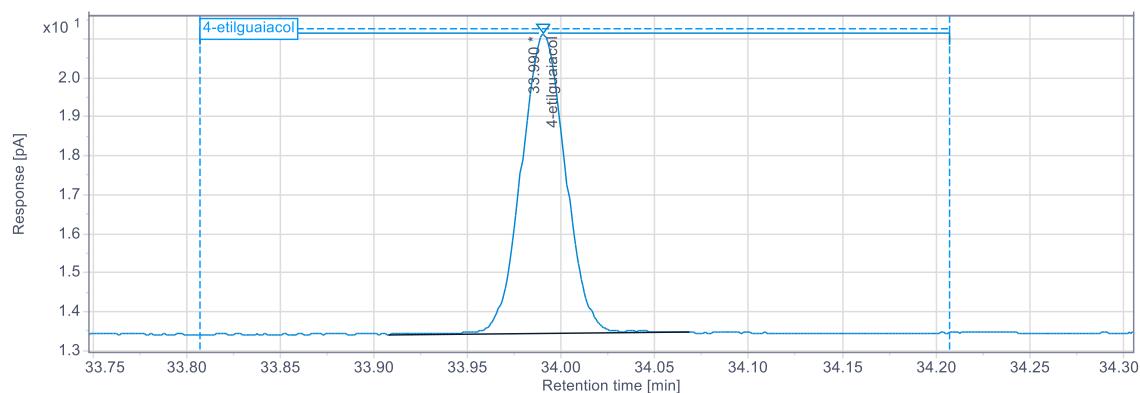


Figura 3. Pico del 4-vinilguaiacol.

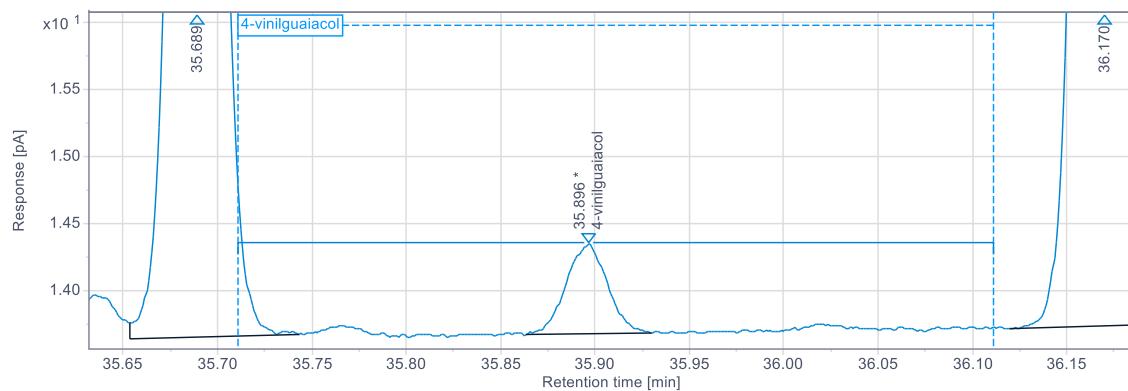


Figura 4. Pico del 1-propanol.

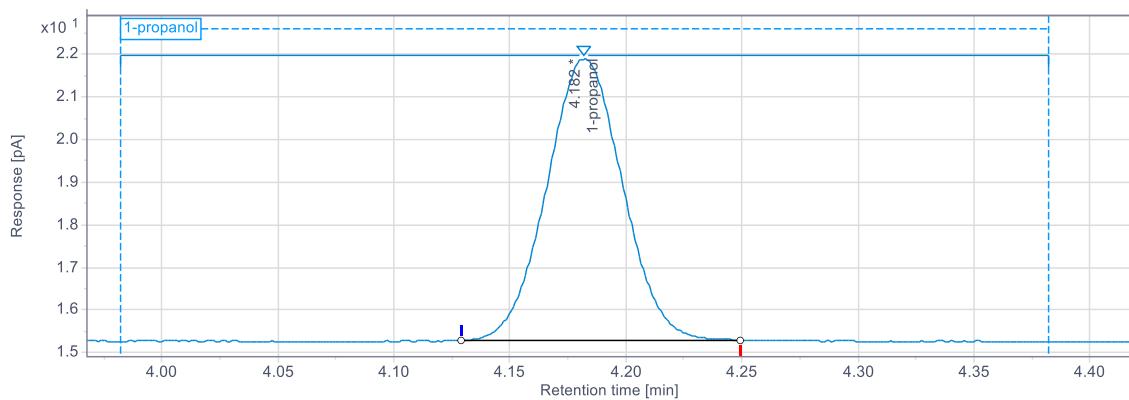


Figura 5. Pico del 4-etilfenol.

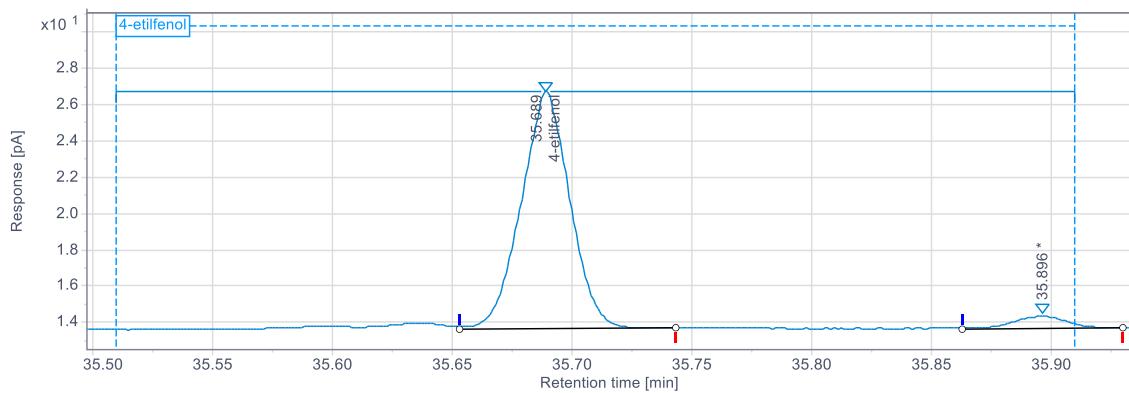
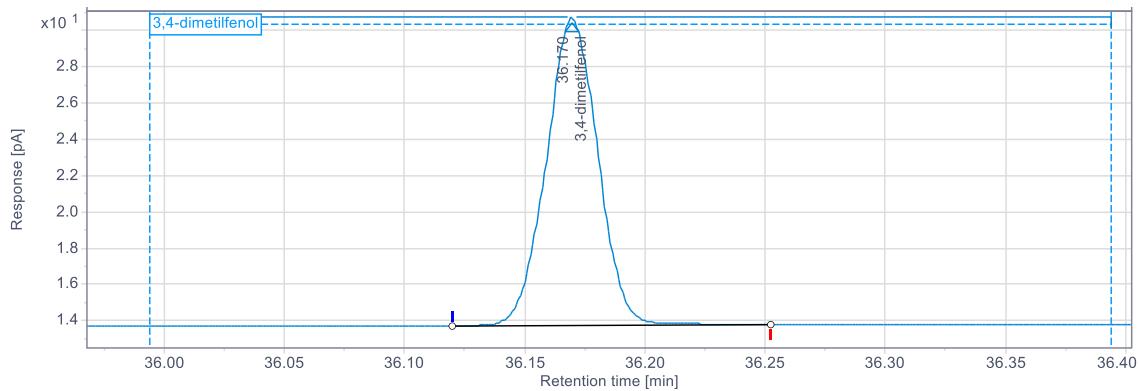


Figura 6. Pico del estándar interno 3,4-dimetilfenol.



Con el objetivo de conocer previamente el tiempo aproximado al cuál aparecían los nuevos analitos se hizo uso de los índices de retención lineal de dichos compuestos y se compararon entre ellos y con algunos de los analitos ya presentes en el método original. Estos índices son un método de predicción de los tiempos de elución relativos de cada compuesto en cromatografía de gases. El método relaciona el volumen de retención V_R o el tiempo de retención t_R de un determinado compuesto con otro que contiene n-átomos de carbono y que eluye antes y después que él, de manera que permite identificar el compuesto en cualquier chromatograma ya que estos índices no dependen de las condiciones chromatográficas, únicamente del tipo de fase estacionaria de la columna chromatográfica utilizada.

La fórmula teórica que permite calcular los índices de retención es la siguiente:

$$LRI = 100 \cdot z + 100 \cdot \frac{\log t_R(x) - \log t_R(z)}{\log t_R(z+1) - \log t_R(z)}$$

LRI: índice de retención lineal (linear retention index)

t_R : tiempo de retención

x: compuesto cuyo índice de retención se quiere determinar

z: número de carbonos del hidrocarburo que aparece antes del compuesto x

z+1: número de carbonos del hidrocarburo que aparece después del compuesto x.

Los índices de retención de los nuevos compuestos se buscaron en la librería NIST obteniéndose los siguientes valores: 1037 para el 1-propanol, 1800 para el acetato de feniletilo, 2033 para el 4-etilguaiacol, 2195 para el 4-etilfenol, 2203 para el 4-vinilguaiacol y 2225 para el 3,4-dimetilfenol. Por tanto, de esta forma podemos saber que el orden de elución de los nuevos compuestos en una columna de tipo polar es el siguiente: 1-propanol, acetato de feniletilo, 4-etilguaiacol, 4-etilfenol, 4-vinilguaiacol, 3,4-dimetilfenol

Como podemos ver en las imágenes, los nuevos compuestos introducidos (acetato de feniletilo, 4-etilguaiacol, 4-vinilguaiacol, 1-propanol, 4-etilfenol y 3,4-dimetilfenol) pueden analizarse mediante el método cromatográfico original, ya que no coeluyen con ninguno de los otros compuestos presentes en el método y además eluyen de la columna cromatográfica a un tiempo de retención en el cual no es necesario ni aumentar la temperatura final del programa ni tampoco el tiempo final de permanencia a esa temperatura.

4.2 Calibración, rango lineal y límites de detección y de cuantificación

En la tabla 4 se muestran las ecuaciones, el rango lineal y los valores de R^2 de las rectas de calibrado que elaboramos para cada analito, mencionadas en el apartado 3.3. Además, también se incluyen los valores de los límites de detección y de cuantificación calculados mediante las ecuaciones explicadas en el punto 3.4.

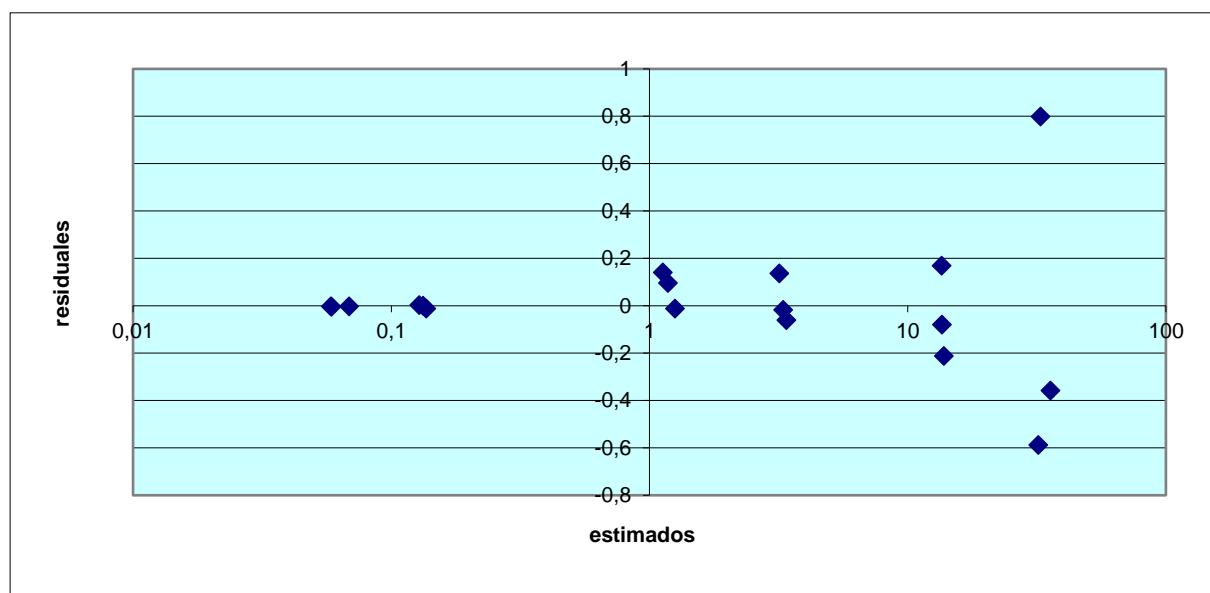
Tabla 4. Rango lineal, ecuaciones y valores de R^2 de las rectas de calibrado y límites de detección y de cuantificación.

COMPUESTOS	RANGO LINEAL (mg/L)	R^2	Ecuación de la recta	n	LD(mg/L)	LC(mg/L)
Acetaldehido	1,77- 365	0,983	y=0,0273x+0,0517	17	0,0874	0,291
Acetato de etilo	1,54- 252	0,997	y=0,3927x-0,0557	18	0,0342	0,114
Propanoato de etilo	0,0398- 24,3	0,998	y=0,5228x-0,0138	18	0,0212	0,0706
Diacetilo	0,487- 298	0,994	y=0,1034x-0,0124	18	0,0713	0,238
Butirato de etilo	0,0436- 26,7	0,997	y=0,6119x-0,001	18	0,0110	0,0367
1-propanol	0,880- 47,8	0,984	y=0,0626x-0,0077	17	0,0960	0,320
Isobutanol	1,43-233	0,990	y=0,297x-0,037	18	0,0307	0,102
Acetato de isoamilo	0,520- 315	0,997	y=0,5776x+0,0364	18	0,0122	0,0407
1-butanol	0,428- 240	0,990	y=0,3144x-0,202	18	0,0329	0,109
Alcohol isoamílico	3,60-589	0,997	y=0,5892+0,0622	18	0,0140	0,0467
Hexanoato de etilo	0,102-62,7	0,999	y=0,6875x+0,0223	18	0,0116	0,0388
Acetato de hexilo	0,0324-19,8	0,994	y=1,0339x+0,0044	18	0,00517	0,0172
Acetoína	0,493-37,5	0,992	Y=0,049x+0,0051	17	0,221	0,737
Lactato de etilo	4,6-750	0,996	Y=0,191x+0,0492	18	0,0554	0,184
1-hexanol	0,436-245	0,999	Y=0,7879x+0,0493	18	0,0130	0,0432
c-3-hexenol	0,0439-26,8	0,999	Y=1,4523x-0,0013	18	0,00849	0,0283
Octanoato de etilo	0,280-157	0,998	Y=0,5149x-0,0346	17	0,0305	0,102
Ácido acético	45,4-1060	0,908	Y=0,0023x-0,1218	12	25,5	43,2
Ácido isobutírico	0,182-18,6	0,945	Y=0,1298x-0,0234	18	0,146	0,486
g-butirolactona	0,445-72,7	0,997	Y=0,1886x+0,0295	18	0,0455	0,152
Decanoato de etilo	0,0502-28,1	0,993	Y=0,6633x-0,0249	17	0,0500	0,167
Ácido butírico	0,641-6,92	0,959	Y=0,1316x-0,0667	12	0,183	0,609
Succinato de dietilo	0,202-33,0	0,996	Y=0,4673x+0,0298	18	0,0239	0,0796
Ácido isovalerianico	0,0889-9,11	0,981	Y=0,3095x-0,0198	18	0,0521	0,173
Metionol	0,258-157	0,992	Y=0,2019x+0,0017	18	0,0604	0,201
Acetato de feniletilo	0,0583-35,6	0,999	Y=0,794x+0,0085	18	0,00861	0,0287
Ácido hexanoico	0,152-15,5	0,998	Y=0,6106x+0,003	18	0,0129	0,0431
Alcohol bencílico	0,586-358	0,997	y=0,6961+0,0022	18	0,0109	0,0365
β -feniletanol	1,64-268	0,998	Y=0,85x+0,2258	18	0,00763	0,0254
4-etilguaiacol	0,0418-4,91	0,990	Y=0,4932x+0,0116	17	0,00626	0,0208
Ácido octanoico	0,106- 10,9	0,998	Y=0,7538x+0,0315	18	0,00894	0,0298
4-etilfenol	0,0353-5,00	0,999	Y=0,8249x+0,0018	18	0,00394	0,0131
4-vinilguaiacol	0,427- 5,52	0,937	Y=0,0263x+0,0152	8	0,0405	0,135
Ácido decanoico	0,0464-4,75	0,990	Y=0,6588x+0,0204	16	0,00668	0,0223

n: número de puntos de la recta. LD: límite de detección. LC: límite de cuantificación

En primer lugar, se llevó a cabo un estudio de homocedasticidad para comprobar que la varianza de los errores era constante a lo largo de todo el rango de concentración y ver si el ajuste por mínimos cuadrados era correcto. Todos los compuestos presentaban el mismo comportamiento que es el que puede observarse en la Figura 7, en la que se observa que el error aumentaba conforme aumentaba la concentración de los puntos de calibrado (forma de embudo), es decir, existe heterocedasticidad y por tanto es necesario llevar a cabo un ajuste de mínimos cuadrados ponderados. El tipo de ponderación que utilizamos usa como factor de ponderación el inverso de la concentración ($1/x$). Estos factores de ponderación dan más peso a los datos más precisos, es decir a los de menor concentración, debido a que el centroide de la regresión de mínimos cuadrados se encuentra más cerca de estos y además escoge la pendiente que, pasando por dicho centroide, hace mínima la suma de los residuos ponderados al cuadrado, lo que garantiza que la recta está igualmente ajustada en todo el rango de trabajo.

Figura 7. Residuales de la recta de calibrado de acetato de feniletilo.



Puede decirse que la linealidad es casi perfecta para todos los compuestos excepto para el ácido acético, el ácido butírico, el 4-vinilguaiacol y el ácido decanoico.

El ácido acético, el 4-vinilguaiacol y el ácido butírico son los analitos que presentan los peores valores de R^2 , 0.908, 0.937 y 0.959 respectivamente.

Además, las rectas del ácido acético, 4-vinilguaiacol y ácido butírico tienen menos puntos que el resto porque mediante el test Q de Dixon pudimos determinar que eran anómalos. Esto se debe a que el rango de concentraciones en el que habíamos pensado que aparecerían estos compuestos no ha sido el esperado, y los puntos de concentraciones más bajos elegidos para hacer la recta estaban por debajo del límite de cuantificación.

El ácido decanoico no tiene una mala linealidad ($R^2=0.990$), pero al ser un compuesto que eluye al final del cromatograma, la resolución de sus picos no era muy buena y por ese motivo algunos puntos salieron anómalos.

El que tiene el mayor rango lineal es el ácido acético (1014.6) seguido por el lactato de etilo (745.4) y el de menor es el ácido decanoico (4.70) seguido por el 4-etilguaiacol (4.868). El Alcohol isoamílico

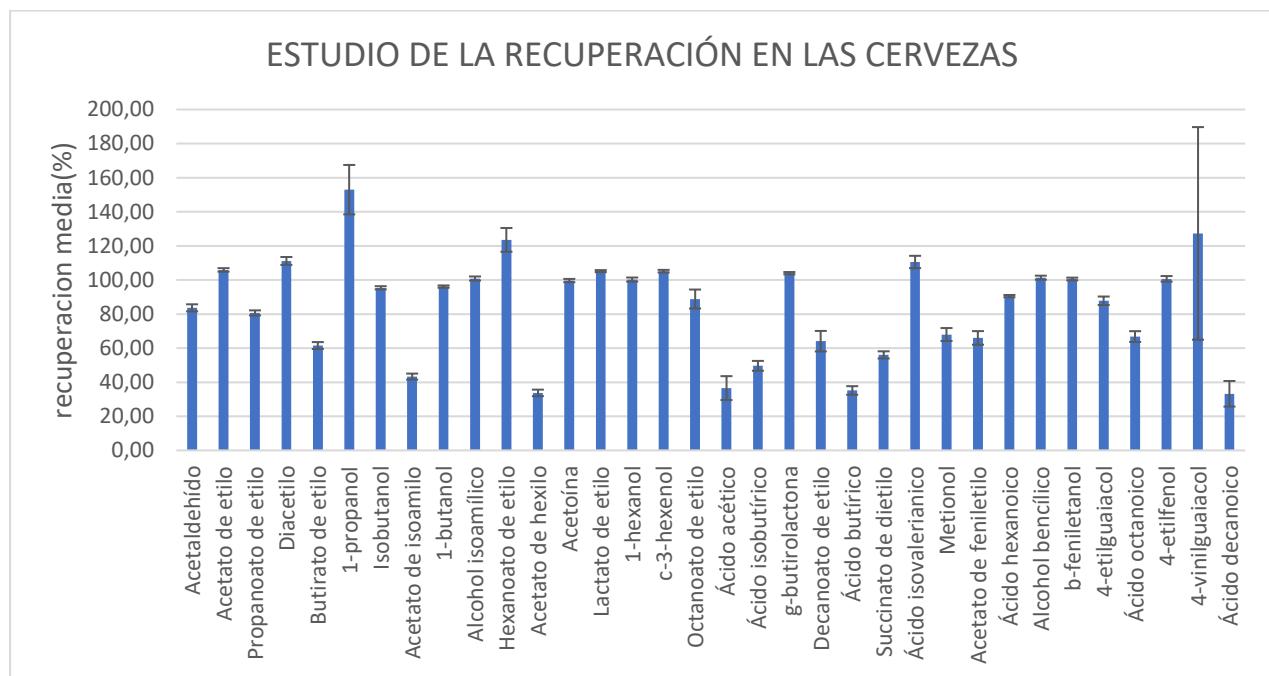
(585,4) no difiere tanto del máximo, pero el Acetaldehido (363,2), que es el siguiente compuesto con mayor rango lineal sí. Hay compuestos con rangos lineales bajos cercanos al mínimo, como puede ser el caso del 4-vinilguaiacol (5,09) o el 4-etilfenol (4.96) pero el resto tienen valores más alejados.

Los analitos con el menor y mayor valor del límite de detección y de cuantificación, son el 4-etilfenol y la acetoína, respectivamente. El 4-etilfenol, tiene un valor de 0.00394 como límite de detección y la Acetoína 0.221. Estos valores no difieren mucho del resto de compuestos, no están muy alejados de los siguientes valores, que son 0.00517 (Acetato de hexilo) y 0.183 (Ácido butírico).

4.3 Estudio de la recuperación

En las siguientes figuras se presentan las recuperaciones calculadas mediante la fórmula 3, vista en el punto 3.6, para cada uno de los analitos de interés en los dos tipos de muestras analizadas.

Figura 8. Valores de la recuperación media en las 5 cervezas con sus respectivas barras de error.

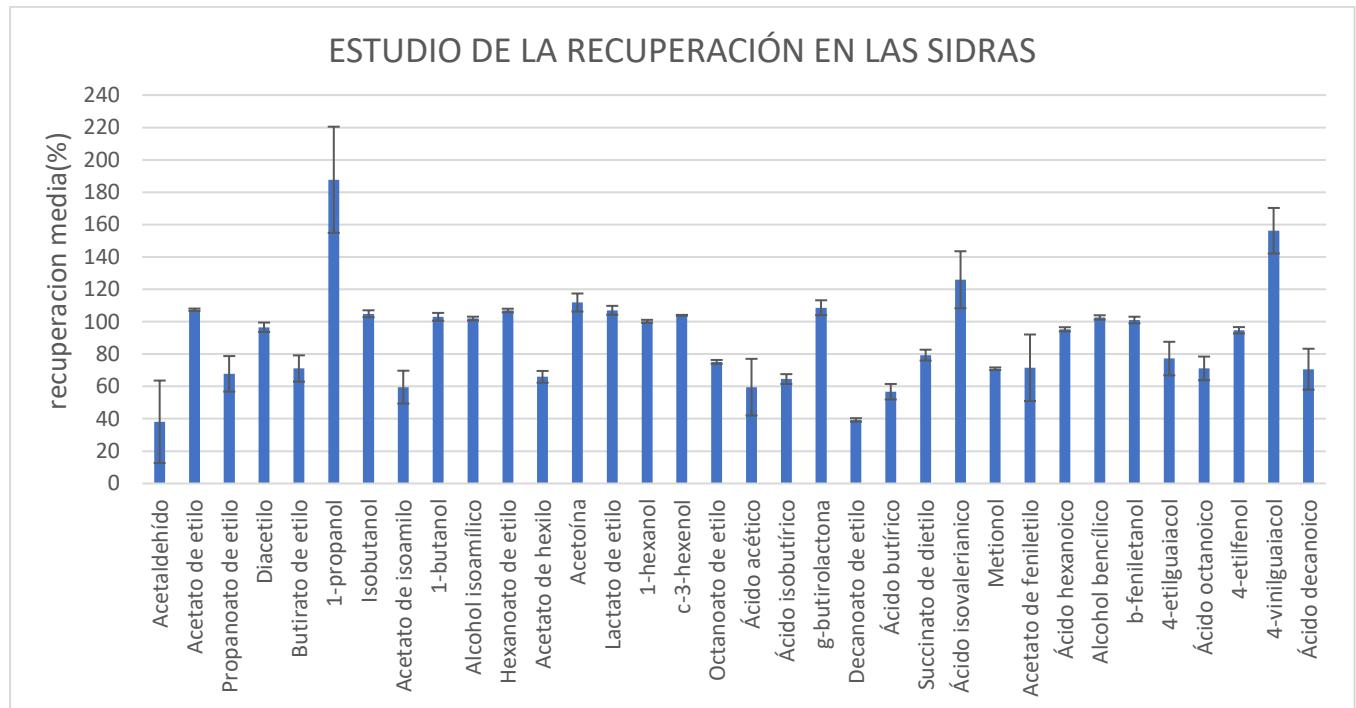


Las barras de error representan la desviación estándar del promedio de las recuperaciones.

En la figura 8 se puede observar cómo la recuperación media en las cervezas es satisfactoria para 19 de los 34 compuestos analizados, ya que sus valore se encuentra entre 100 ± 20 . En el caso de dos de los compuestos 1-propanol y 4-vinilguaiacol, el valor obtenido de recuperación media es superior a 120, aunque cabe destacar que en el caso del 4-vinilguaiacol existe una gran irreproducibilidad en el valor calculado. Los valores de recuperación en el 4-vinilguaiacol son muy parecidos en 4 de las cervezas, pero en una de ellas, la Franziskaner, es muy diferente ya que tiene un valor negativo (ver tabla 2 de los anexos). Este valor negativo, se debe a que la concentración de este compuesto en esta cerveza es mucho mayor que en las demás, como podemos ver en la tabla 5 y la concentración de dopaje añadida era muy pequeña para este caso (0.954 mg/L). En el caso del 1- propanol las recuperaciones están fuera del rango aceptable en todas las cervezas menos en la Export, que es la cerveza que más concentración tiene de este compuesto (25 mg/L), las concentraciones en el resto de las cervezas son muy parecidas (en torno a 17 mg/L menos una que tiene 22 mg/L).

En el resto de los compuestos las recuperaciones no son satisfactorias porque sus valores de recuperación se encuentran por debajo de 80%, pero encontramos dos tipos de comportamiento. Hay compuestos que tienen una recuperación que es más o menos igual en las 5 cervezas analizadas, estos compuestos son el butirato de etilo, Acetato de isoamilo, Acetato de hexilo, succinato de dietilo. Por otro lado, en el hexanoato de etilo, decanoato de etilo, metionol, Acetato de feniletilo, ácido octanoico, ácido acético, ácido isobutírico, ácido butírico, ácido decanoico las recuperaciones individuales de cada una de las cervezas no son parecidas.

Figura 9. Valores de la recuperación media en las 3 sidras con sus respectivas barras de error.



Las barras de error representan la desviación estándar del promedio de las recuperaciones

En la figura 9 se puede ver cómo la recuperación media en las cervezas es satisfactoria para 15 de los 34 compuestos analizados, ya que sus valores se encuentran entre 100 ± 20 . En el caso de tres de los compuestos 1-propanol, ácido isovaleriánico y 4-vinilguaiacol, el valor obtenido de recuperación media es superior a 120. Como hemos comentado, en el caso del 4-vinilguaiacol existe una gran irreproducibilidad en el valor calculado. Las recuperaciones difieren mucho en las tres sidras y en dos de las tres sidras analizadas el 4-vinilguaiacol se encuentra por debajo del límite de detección, solo está por encima en la Ladrón de Manzanas. En el ácido isovaleriánico, 2 de las 3 sidras tienen recuperaciones dentro del rango de 100 ± 20 (113 y 103 %), menos la Ladrón de Manzanas que tiene un valor de 160%. En el 1- propanol las recuperaciones de las tres sidras están fuera del rango aceptable.

En el resto de los compuestos las recuperaciones no son satisfactorias porque sus valores de recuperación se encuentran por debajo de 80%, pero encontramos también dos tipos de comportamiento. Hay compuestos que tienen una recuperación que es más o menos igual en las 3 sidras analizadas, estos compuestos son: Octanoato de etilo, ácido isobutírico, decanoato de etilo, succinato de dietilo, metionol.

Por otro lado, en el Acetaldehido, Propanoato de etilo, butirato de etilo, Acetato de isoamilo, Acetato de hexilo, Acetato de feniletilo, 4-etilguaiacol, ácido octanoico, Ácido acético, ácido butírico, ácido decanoico las recuperaciones individuales de cada una de las cervezas no son parecidas.

Ahora, poniendo en común las dos bebidas, las recuperaciones del Acetaldehido, propanoato de etilo, octanoato de etilo, ácido isoálico y 4-etilguaiacol son satisfactorias en las cervezas, pero no en las sidras y la del hexanoato de etilo, es satisfactoria en la sidra pero no en la cerveza. Esto no se puede explicar con las concentraciones en las que aparecen estos compuestos en las bebidas, ya que en todos estos casos las concentraciones en los dos tipos de bebidas son muy parecidas. (ver tabla 5 y 6). A excepción de estos compuestos mencionados, el resto de los compuestos que no tienen recuperaciones satisfactorias son los mismos en las dos bebidas, es decir se recuperan mal en las dos bebidas.

Es difícil saberlo, pero podemos intentar explicar las malas recuperaciones obtenidas en estos compuestos de la siguiente forma:

El comportamiento esperado sería que los compuestos más polares (menor logP) se extrajeran peor con el diclorometano y por lo tanto tuvieran menores recuperaciones. Pero esto no es así, no hay correlación entre las bajas recuperaciones y el coeficiente de partición octanol-agua (logP). Esto se puede ver en las tablas 2 y 3 de los anexos.

En los compuestos mencionados que tienen unas recuperaciones más o menos constante en cada una de las cervezas o sidras podemos decir que posiblemente la mala recuperación se deba a que existen efectos matriz en la cerveza. Sabiendo esto, podemos aplicar factores de recuperaciones para corregir las concentraciones obtenidas, ya que en la cerveza sintética presenta un buen comportamiento. Esto quiere decir que podemos utilizar este método para analizar cuantitativamente ese compuesto y podemos utilizar las rectas de calibrado obtenidas.

Aun así, no podemos estar seguros de esto porque deberíamos hacer un estudio de los efectos matriz, realizando rectas de calibrado en otra matriz distinta a la sintética y comparando las pendientes de las rectas obtenidas en esta nueva matriz con las de la sintética.

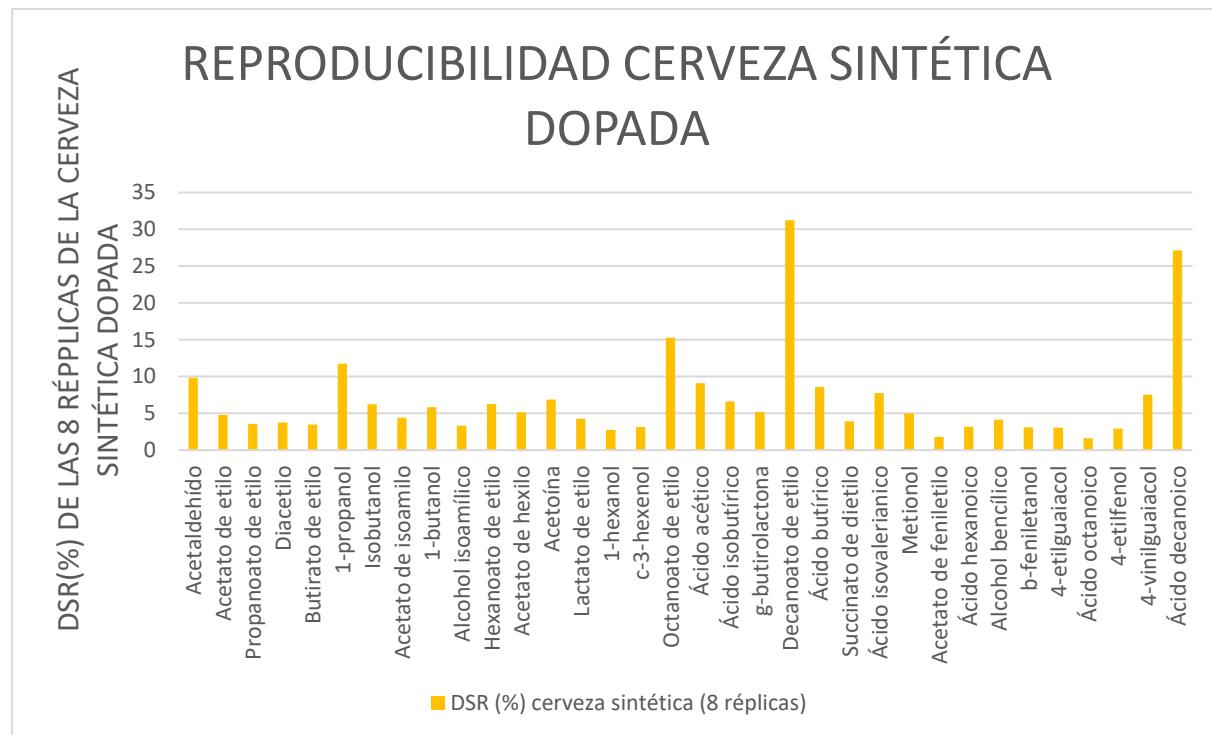
Por último, en el caso de los compuestos vistos en los cuales las recuperaciones en todas las cervezas o sidras no son parecidas también se pueden deben a efectos matriz, pero en este caso, no podemos aplicar factores de recuperación y deberemos realizar una adición estándar si queremos saber la concentración real de estos compuestos.

4.4 Estudio de la reproducibilidad

En las siguientes gráficas se representan el promedio de las reproducibilidades obtenidas en el análisis de las cervezas y sidras analizadas tanto dopadas como sin dopar. En estas gráficas también aparecen unas barras de error, que representan la desviación estándar de este promedio de las DSR en cada caso.

Reproducibilidad de la cerveza sintética dopada:

Figura 14. Valores de la reproducibilidad media en el análisis de la cerveza sintética dopada.

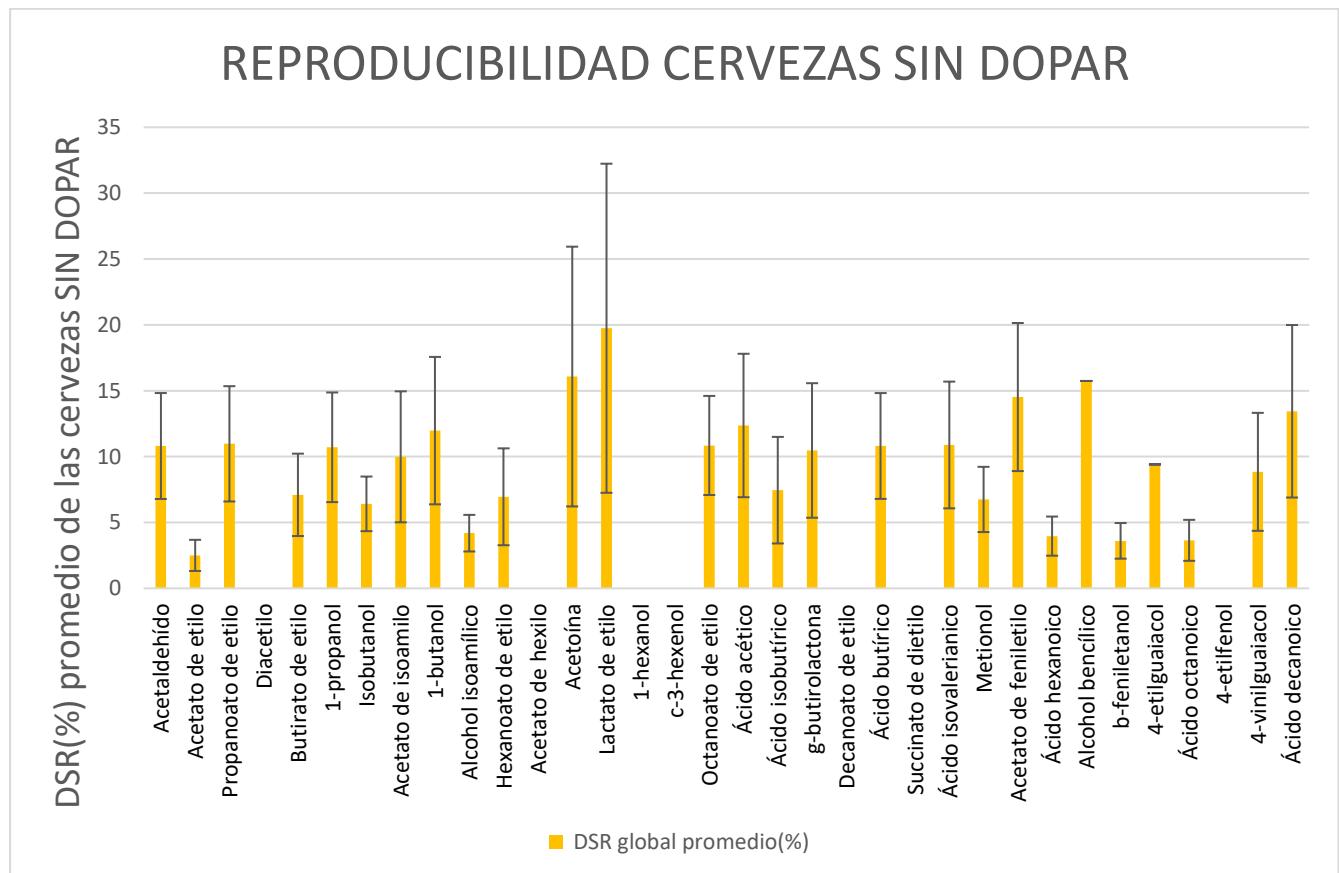


Estas 8 réplicas fueron analizadas en días distintos, analizamos 3 el primer día, 3 el segundo y dos el tercero. En la cerveza sintética dopada, todos los compuestos presentan promedios de DSR muy bajos menos el ácido decanoico y el decanoato de etilo, que presentan los peores valores.

En el ácido decanoico esta poca reproducibilidad se debe a que es el último compuesto en eluir y los cromatogramas tienen mucho ruido de fondo.

Reproducibilidad de las cervezas analizadas sin dopar:

Figura 10. Valores de la reproducibilidad media en el análisis de las 5 cervezas sin dopar con sus correspondientes barras de error.



Los siguientes compuestos: diacetilo, acetato de hexilo, 1-hexenol, c-3-hexenol, decanoato de etilo, succinato de dietilo y 4-etilfenol se encuentran en las cervezas analizadas por debajo de su LD por lo que no pudo calcularse la reproducibilidad para dichos analitos. Por ello, aparecen en la gráfica, pero sin valores en el eje Y.

Para el resto de los compuestos, el promedio de las DSR es bajo (menores del 15 %) en todos los compuestos menos en la acetoína, el lactato de etilo y el alcohol bencílico. Además, la acetoína y el lactato de etilo tienen también las barras de error más grandes, lo que quiere decir que estos compuestos son poco reproducibles en los distintos tipos de cerveza.

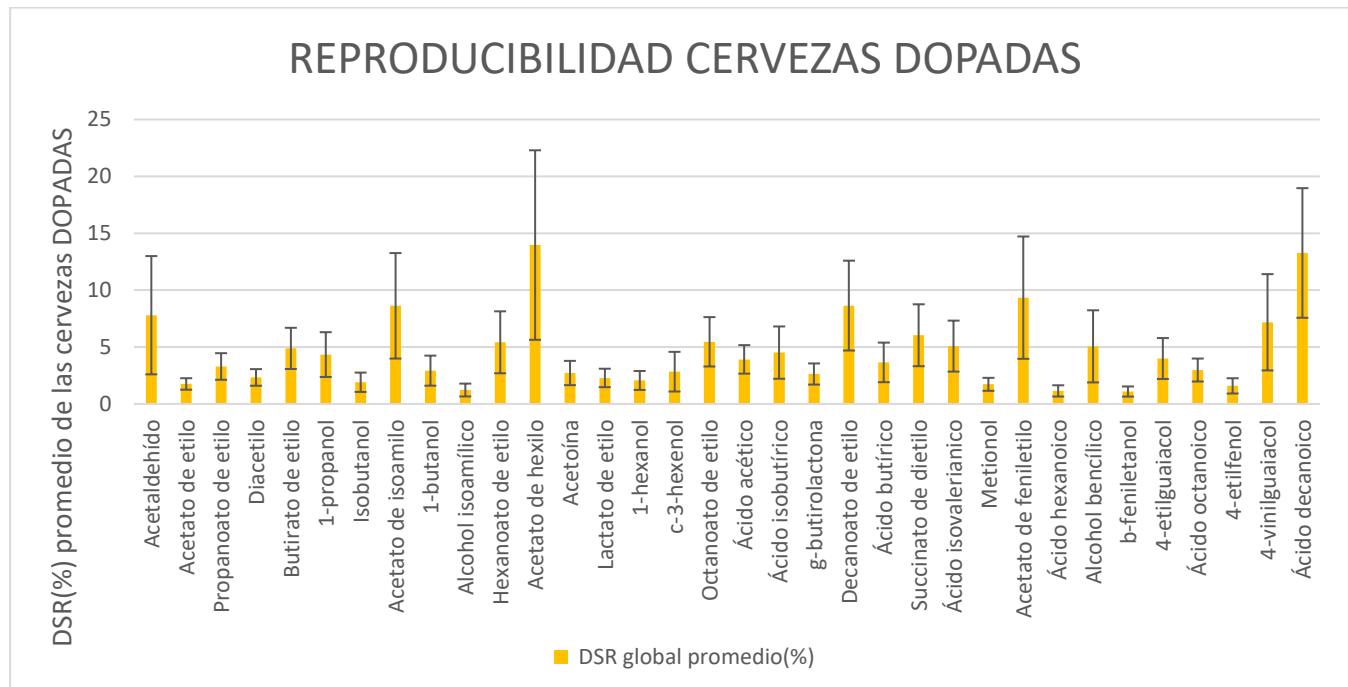
Para la acetoína las DSR en cada una de las cervezas son 11% (Ambar Especial) y 20% (Franziskaner), en la Ambar Export, la Guinness y La Aguilá la concentración de la acetoína está por debajo del límite de cuantificación.

Para el lactato de etilo, este analito solo está por debajo del límite de cuantificación en la cerveza El Águila, pero para el resto de las cervezas tiene los siguientes valores: 36% (Ambar Especial), 8.9% (Ambar Export), 10% (Franziskaner) y 7.4% (Guinness). Como podemos ver la DSR en la cerveza Especial es muy grande y de ahí el motivo por el cual está por encima del 15% y la barra de error es tan grande en ese caso.

El analito con menor valor de promedio de DSR es el acetato de etilo (2.5%) seguido por el alcohol isoamílico, el ácido hexanoico, el β -feniletanol, y el ácido octanoico.

Reproducibilidad de las cervezas analizadas dopadas:

Figura 11. Valores de la reproducibilidad media en el análisis de las 5 cervezas dopadas con sus correspondientes barras de error.

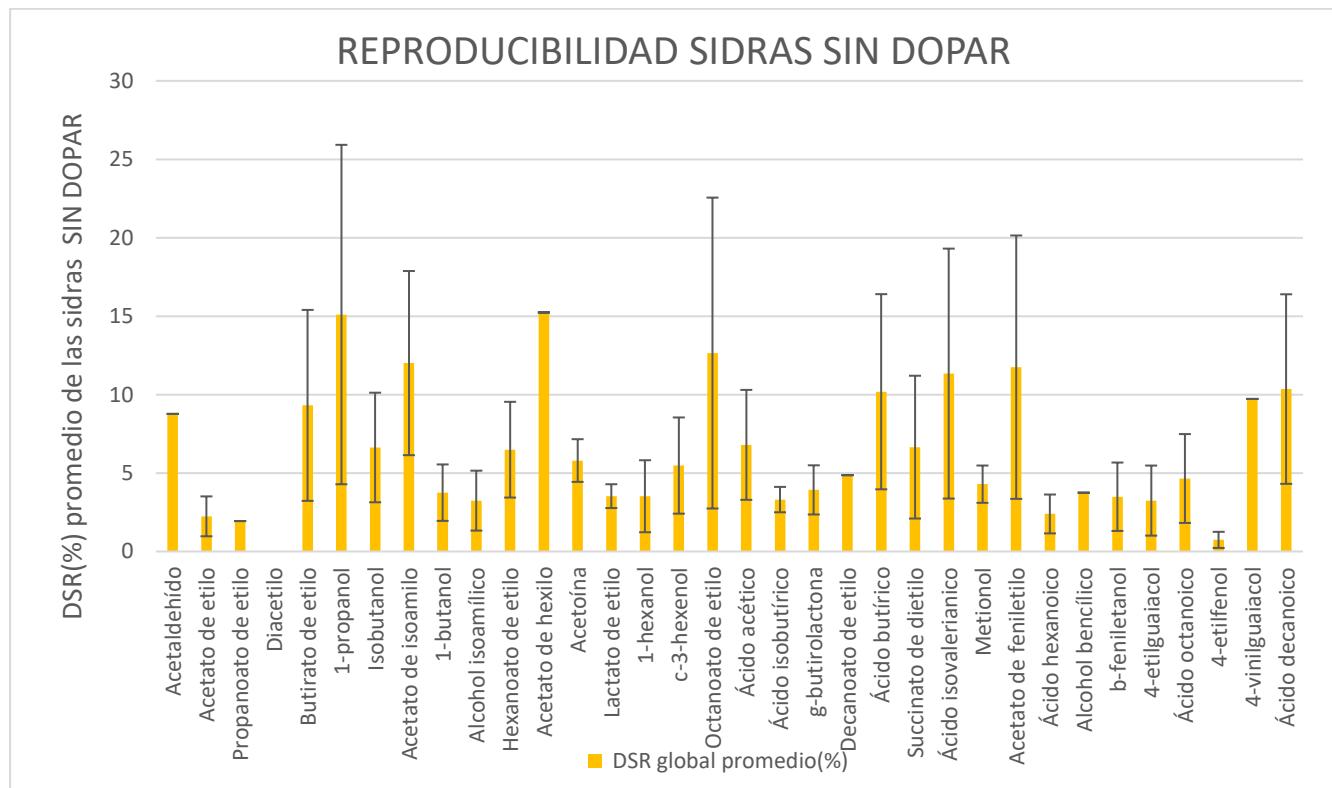


Para las cervezas dopadas, el promedio de las DSR es menor del 15 % en todos los compuestos y presentan valores mucho más pequeños que en las cervezas sin dopar. El acetato de hexilo tiene la mayor barra de error respecto del resto de compuestos. Podemos ver que la reproducibilidad es mejor en las cervezas dopadas que en las sin dopar, es decir a mayor concentración de los analitos hay una mayor reproducibilidad. Cabe destacar que para muchos de los compuestos está por debajo del 5%.

En el caso del Acetato de hexilo las DSR en cada una de las cervezas son las siguientes: 8.1% (Ambar Especial), 8.8% (Ambar Export), 1.4% (Franziskaner), 4.1% (Guinness), 29% (El Águila). Como podemos ver la DSR en la cerveza El Águila es un valor mucho mayor comparado con el resto y por eso hace que la barra de error de la DSR promedio sea muy grande.

Reproducibilidad de las sidras analizadas sin dopar:

Figura 12. Valores de la reproducibilidad media en el análisis de las 3 sidras sin dopar con sus correspondientes barras de error.



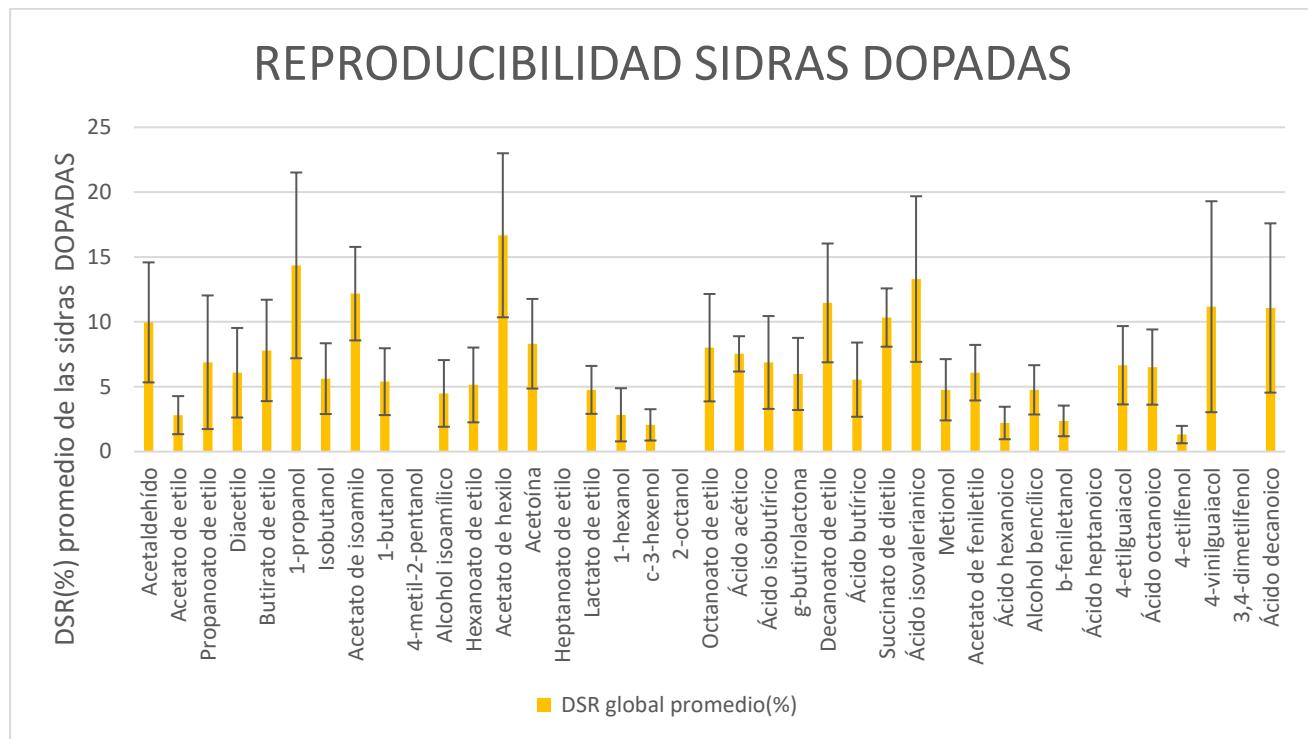
El diacetilo se encuentra en todas las sidras analizadas por debajo de su LC por lo que no pudo calcularse la reproducibilidad para dichos analitos.

En las sidras sin dopar, el promedio de las DSR es menor del 15 % en todos los compuestos, a excepción también del acetato de hexilo. Los analitos que presentan los menores valores son el acetato de etilo, el propanoato de etilo, el ácido hexanoico y el 4-etilfenol con el menor de todos ellos (0.74%).

En el caso del Acetato de hexilo al promedio de las DSR solo contribuye una sidra con un valor de 15%, ya que en las demás sidras este compuesto está por debajo del LC. Es por esto por lo que no tiene barra de error y tiene un valor tan alto de DSR.

Reproducibilidad de las sidras analizadas dopadas:

Figura 13. Valores de la reproducibilidad media en el análisis de las 3 sidras dopadas con sus correspondientes barras de error.



En las sidras dopadas, el promedio de las DSR es menor del 15 % en todos los compuestos, a excepción también del acetato de hexilo. Presentan menores valores que en la sidra sin dopar, pero en comparación de lo que ocurría en la cerveza las diferencias no son tan notables.

Los compuestos que tienen los menores valores son el acetato de etilo (2.8%), 1-hexanol (2.8%), c-3-hexenol (2.1%), ácido hexanoico (2.2%), b-feniletanol (2.4%) y 4-etylfenol (1.3%).

4.5 Análisis de cervezas y sidras

En las tablas 5 y 6, se exponen las concentraciones en las que están presentes los analitos en los distintos tipos de cervezas y sidras analizadas.

Tabla 5. Concentraciones de los volátiles mayoritarios analizados en las cervezas.

COMPUESTOS	Concentración media en la cerveza AMBAR (mg/L)	Concentración media en la cerveza AMBAR EXPORT (mg/L)	Concentración media en la cerveza FRANZISKANER (mg/L)	Concentración media en la cerveza GUINNESS (mg/L)	Concentración media en la cerveza EL ÁGUILA (mg/L)	FOLD CHANGE (valor max/valor min)
Acetaldehído	6,15±0,02	4,94±0,01	6,07±0,01	52,97±0,08	6,019±0,004	10,7
Acetato de etilo	15,60±0,07	31,1±0,3	27,7±0,1	12,30±0,04	16,56±0,04	2,5
Propanoato de etilo	<LC ¹	0,120±0,003	<LC	0,078±0,001	<LC	1,5
Diacetilo	<LC	<LC	<LC	<LC	<LC	
Butirato de etilo	0,0626±0,0025	0,0979±0,0024	0,0587±0,0011	0,0637±0,0005	0,0669±0,0013	1,7
1-propanol	17,40±0,08	25,26±0,13	22,30±0,06	17,50±0,04	17,30±0,05	1,4
Isobutanol	14,20±0,21	22,98±0,24	24,56±0,24	16,3±0,1	17,9±0,2	1,7
Acetato de isoamilo	0,946±0,030	1,70±0,03	1,47±0,04	0,389±0,029	1,21±0,02	4,4
1-butanol	0,412±0,008	0,410±0,005	0,282±0,008	0,188±0,001	0,309±0,002	2,2
Alcohol isoamílico	80,6±1,2	104±2	71,56±0,74	53,6±0,5	77,7±1,2	1,9
Hexanoato de etilo	0,181±0,004	0,215±0,001	0,133±0,004	0,153±0,009	0,200±0,003	1,6
Acetato de hexilo	<LD ²	<LD	<LD	<LD	<LD	
Acetoína	6,80± 0,02	<LC	1,17±0,01	<LC	<LC	5,8
Lactato de etilo	2,88± 0,12	0,518±0,007	1,041±0,014	0,358±0,005	<LD	8,0
1-hexanol	<LC	<LD	<LC	<LD	<LD	
c-3-hexenol	<LC	<LD	<LC	<LD	<LD	
Octanoato de etilo	0,290± 0,008	0,305±0,001	0,332±0,008	0,182±0,005	0,262±0,007	1,8
Ácido acético	81,889± 0,002	87,000±0,001	85,620±0,005	69,300±0,004	72,766±0,004	1,2
Ácido isobutírico	<LC	0,513±0,003	0,678±0,002	0,595±0,001	<LC	1,3
g-butirolactona	<LC	0,409±0,006	0,301±0,008	0,603±0,004	0,272±0,004	2,2
Decanoato de etilo	<LC	<LC	<LC	<LC	<LC	
Ácido butírico	0,662± 0,002	1,090±0,006	0,699±0,001	0,635±0,001	0,980±0,002	1,7
Succinato de dietilo	<LC	<LD	<LD	<LD	<LD	
Ácido isovalerianico	1,067± 0,023	1,39±0,04	1,130±0,006	0,718±0,002	1,05±0,02	1,9
Metionol	3,18± 0,03	2,86±0,02	4,53±0,02	1,180±0,005	1,02±0,01	4,4
Acetato de feniletilo	0,224± 0,015	0,629±0,025	0,542±0,030	0,123±0,013	0,519±0,031	5,1
Ácido hexanoico	1,79± 0,04	1,836±0,028	1,596±0,019	0,990±0,006	1,57±0,02	1,8
Alcohol bencílico	0,221± 0,014	<LD	<LC	<LC	<LC	
b-feniletanol	23,5± 0,6	46±1	25,6±0,3	23,2±0,2	33,7±0,5	2,0
4-etilguaiacol	<LD	<LD	<LD	0,0350±0,0015	<LD	
Ácido octanoico	3,33± 0,05	3,04±0,07	3,610±0,005	1,77±0,01	3,39±0,07	2,0
4-etilfenol	<LC	<LC	<LC	<LD	<LD	
4-vinilguaiacol	2,11± 0,01	2,740±0,005	31,300±0,004	0,3140±0,0005	2,460±0,002	99,7
Ácido decanoico	0,873± 0,081	0,396±0,016	1,39±0,061	0,186±0,007	0,768±0,021	7,5

¹ <LC (su concentración se encuentra por debajo del límite de cuantificación)

² <LD (su concentración se encuentra por debajo del límite de detección)

Tabla 6. Concentraciones de los volátiles mayoritarios analizados en las sidras.

COMPUESTOS	Concentración media en la sidra CAMIN (mg/L)	Concentración media en la sidra LADRÓN DE MANZANAS (mg/L)	Concentración media en la sidra MAGNERSS (mg/L)	FOLD CHANGE (valor max/valor min)
Acetaldehído	<LC	57,80±0,08	<LD	
Acetato de etilo	57,74±0,26	11,84±0,08	13,50±0,02	4,9
Propanoato de etilo	5,06±0,03	<LC	<LC	
Diacetilo	<LC	<LC	<LC	
Butirato de etilo	0,137±0,002	0,0486±0,0024	0,0536±0,0010	2,8
1-propanol	34,68±0,08	18,02±0,16	5,360±0,005	6,5
Isobutanol	30,48±0,24	18,42±0,29	36,18±0,30	2,0
Acetato de isoamilo	0,538±0,010	1,003±0,052	0,149±0,009	6,7
1-butanol	4,76±0,04	0,374±0,001	0,815±0,006	12,7
Alcohol isoamílico	204,4±1,4	80,08±1,31	85,23±0,58	2,5
Hexanoato de etilo	0,193±0,003	0,0841±0,0033	0,101±0,004	2,3
Acetato de hexilo	<LD	0,706±0,064	<LD	
Acetoína	4,02±0,01	<LC	14,37±0,02	3,6
Lactato de etilo	129,3±0,5	0,981±0,004	53,58±0,22	131,8
1-hexanol	4,30±0,03	0,646±0,018	0,945±0,008	6,6
c-3-hexenol	0,0974±0,0022	0,0581±0,0022	0,0347±0,0022	2,8
Octanoato de etilo	0,497±0,006	<LC	0,207±0,007	2,4
Ácido acético	611,80±0,02	76,905±0,002	118,020±0,008	7,9
Ácido isobutírico	1,263±0,002	<LC	0,604±0,001	2,1
g-butirolactona	8,021±0,041	1,090±0,003	4,12±0,02	7,4
Decanoato de etilo	0,207±0,003	<LC	<LC	
Ácido butírico	1,270±0,002	0,700±0,001	0,679±0,002	1,9
Succinato de dietilo	1,32±0,01	<LC	0,741±0,018	1,8
Ácido isovalerianico	2,308±0,022	1,004±0,031	0,636±0,008	3,6
Metionol	1,66±0,01	0,338±0,001	0,899±0,005	4,9
Acetato de feniletilo	0,0885±0,0014	0,576±0,052	0,0396±0,0011	14,5
Ácido hexanoico	2,83±0,01	1,005±0,011	1,05±0,01	2,8
Alcohol bencílico	0,513±0,008	<LC	<LC	
b-feniletanol	116,6±0,8	9,49±0,25	12,2±0,1	12,3
4-etilguaiacol	0,868±0,005	<LD	0,407±0,005	2,1
Ácido octanoico	4,65±0,05	1,42±0,04	1,53±0,02	3,3
4-etilfenol	1,437±0,006	<LC	0,377±0,001	3,8
4-vinilguaiacol	<LD	0,374±0,001	<LD	
Ácido decanoico	2,23±0,05	0,633±0,018	0,590±0,036	3,8

Solo unos pocos de los compuestos analizados no pudieron ser cuantificados. Los siguientes compuestos: diacetilo, acetato de hexilo, 1-hexenol, c-3-hexenol, decanoato de etilo, succinato de dietilo y 4-etilfenol, están en todas las cervezas por debajo de los límites de cuantificación. En las sidras esto solo ocurre con el diacetilo. Aunque el número de muestras es relativamente limitado, estos resultados parecen indicar que el método necesitaría un poco más de sensibilidad para estos compuestos (sobre todo en el caso de la cerveza). Sin embargo, el balance general de la sensibilidad

del método es muy positivo ya que permite cuantificar la mayor parte de los volátiles mayoritarios en ambas matrices.

Respecto a el análisis de los distintos tipos de cervezas, podemos ver, mirando los valores de *fold change*, que relacionan el valor más grande de concentración con el valor más pequeño, que por lo general en todos los tipos de cervezas las concentraciones de los compuestos son parecidas. A excepción del acetaldehído que está en una concentración mucho mayor en la cerveza Guinness que en el resto de las cervezas y del 4-vinilguaiacolque está en una concentración más alta en la Franziskaner que en el resto (valor de fold change de 10.7 y 99.7 respectivamente). Este resultado era esperable dado el diferente sustrato (trigo) sobre el que se realiza la fermentación.¹⁴

En cambio, en las sidras, como podemos ver en la tabla 6, las concentraciones de los compuestos varían mucho entre los tipos analizados, sobre todo en el caso del lactato de etilo y del acetato de feniletilo (valores de fold change de 131.8 y 14.54 respectivamente).

5. Conclusiones

Podemos concluir que el método se ha validado con éxito, ya que permite la determinación cuantitativa de casi los 34 compuestos analizados en la cerveza y en la sidra. En cuanto a la reproducibilidad del método, el promedio de las DSR es baja, menores del 15 % en la práctica totalidad de los compuestos tanto en las cervezas como en las sidras, y tanto a baja como a alta concentración. El método se puede considerar lineal para todos los compuestos, excepto para 4 de los compuestos estudiados. La recuperación, en general, es también satisfactoria, teniendo que aplicar para algunos de los compuestos factores de recuperación para su cuantificación. A pesar de que los límites de detección estimados son aceptables para la determinación de compuestos mayoritarios, algunos de los analitos estudiados no han sido detectados en ninguna de las cervezas o sidras analizadas, por lo que sería necesario desarrollar un método de cuantificación más sensible para estos compuestos en estas matrices.

6. Bibliografía

- (1) López, R., Cacho, J., & Ferreira, V. *El análisis del aroma de la cerveza*. Aragón institute of engineering research, Universidad de Zaragoza, 2011.
- (2) Kobayashi, M., Shimizu, H., & Shioya, S. *Beer Volatile Compounds and Their Application to Low-Malt Beer Fermentation*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 106(4), 317-323, 2008.
- (3) Antón, M.J. *Influencia del Origen y la Tecnología de Elaboración sobre el Perfil Aromático y Olfatométrico de la Sidra*. Dto de Química Física y Analítica, Universidad de Oviedo, 2015.
- (4) Ortega, C; López, R; Cacho, J; Ferreira, V. *Fast analysis of important wine volatile compounds development and validation of a new method based on gas chromatographic-flame ionisation detection analysis of dichloromethane microextracts*; *Journal of Chromatography, Spain*, 205–214, 2001
- (6) Rando, M. F. *Aplicaciones del Espacio de Cabeza Dinámico al Análisis Farmacéutico*. Universidad de Sevilla, 2017.
- (7) Wenclawiak, B. W., Koch, M., & Hadjicostas, E. *Validation of Analytical Methods. Quality Assurance in Analytical Chemistry*, Springer Berlin Heidelberg, (Eds.). (2010), 215-243, 2004
- (8) Dresel. M. *Beer*. Part B, 7, 130-139
- (9) Antón, M. J., Suárez Valles, B., García Hevia, A., & Picinelli Lobo, A. *Aromatic Profile of Ciders by Chemical Quantitative, Gas Chromatography-Olfatometry and Sensory Analysis*. Journal of Food Science, Vol 79, 2014
- (10) Antón-Díaz, M. J., Suárez Valles, B., Mangas-Alonso, J. J., Fernández-García, O., & Picinelli-Lobo, A. *Impact of different techniques involving contact with lees on the volatile composition of cider*. Food chemistry ,190, 1116-1122, 2016
- (11) Qin, Z., Petersen, M. A., & Bredie, W. L. P. *Flavour Profiling of Apple Ciders from the UK and Scandinavian region*. Food Research International, 105, 713-723, 2018
- (12) D2Dspuma. (2023). El proceso de elaboración de la cerveza. 2D2Dspuma Tienda Online.
<https://www.2d2dspuma.com/blog/hacer-cerveza/el-proceso-de-elaboracion-de-la-cerveza>
- (13) Molina-Guerrero, J. A., Botello-Álvarez, J. E., Estrada-Baltazar, A., Navarrete-Bolaños, J. L., Jiménez-Islas, H., & Cárdenas-Manríquez, M. *Compuestos volátiles en el mezcal volatile components in mezcal*. 6(1), 2007.
- (14) Langos, D., Granvogl, M., & Schieberle, P. Characterization of the Key Aroma Compounds in Two Bavarian Wheat Beers by Means of the Sensomics Approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(47), 11303-11311, 2013.

Anexos

Tabla 1 Anexo. Concentraciones teóricas de dopaje en mg/L añadidas a las cervezas y las sidras.

Nombre	concentraciones teóricas añadidas
Acetaldehido	75,55
Acetato de etilo	55,97
Propanoato de etilo	0,7122
Diacetilo	8,717
Butirato de etilo	0,7805
1-propanol	7,529
Isobutanol	51,8
Acetato de isoamilo	9,234
1-butanol	7,654
Alcohol isoamílico	130,8
Hexanoato de etilo	1,834
Acetato de hexilo	0,5805
Acetoína	18,48
Lactato de etilo	166,7
1-hexanol	7,81
c-3-hexenol	0,7854
Octanoato de etilo	5,005
Ácido acético	269,3
Ácido isobutírico	4,724
g-butirolactona	16,14
Decanoato de etilo	0,8976
Ácido butírico	1,756
Succinato de dietilo	7,331
Ácido isovalerianico	2,312
Metionol	4,62
Acetato de feniletilo	1,044
Ácido hexanoico	3,946
Alcohol bencílico	10,49
b-feniletanol	59,5
4-etilguaiacol	0,9214
Ácido octanoico	2,76
4-etilfenol	0,9071
4-vinilguaiacol	0,9541
Ácido decanoico	1,207

Tabla 2 Anexo. Valores de recuperación de los volátiles mayoritarios analizados en las cervezas.

Name	Ambar (%)	Export (%)	Franziskaner (%)	Guiness (%)	ElÁguila (%)	Recuperación Media (%)	logp
Acetaldehido	87,03	77,07	86,60	12,50	83,90	83,65	-0,34
Acetato de etilo	107,02	105,10	102,71	108,93	105,70	105,89	0,73
Propanoato de etilo	83,48	82,51	75,04	81,11	81,26	80,68	1,21
Diacetilo	113,51	115,30	115,48	103,72	107,79	111,16	-1,34
Butirato de etilo	62,44	65,64	53,86	61,60	64,04	61,52	1,85
1-propanol	141,04	118,11	192,35	181,86	131,54	152,98	0,25
Isobutanol	96,84	94,62	98,28	94,17	93,10	95,40	0,76
Acetato de isoamilo	45,90	48,52	38,53	42,41	41,16	43,30	2,25
1-butanol	97,97	96,22	96,64	95,90	93,80	96,11	0,88
Alcohol isoamilico	100,86	98,48	104,49	102,35	98,07	100,85	1,16
Hexanoato de etilo	110,09	119,99	109,11	145,36	133,01	123,51	2,823
Acetato de hexilo	37,68	38,98	31,80	29,97	30,29	33,74	2,87
Acetoína	100,03	101,65	101,70	97,14	97,72	99,65	-0,36
Lactato de etilo	106,24	104,46	106,91	104,63	103,63	105,18	-0,18
1-hexanol	98,30	101,33	96,66	102,82	102,12	100,25	2,03
c-3-hexenol	103,66	104,71	105,54	107,90	103,91	105,15	1,61
Octanoato de etilo	73,34	104,46	81,51	87,18	97,61	88,82	3,842
Ácido acético	62,39	40,12	29,50	24,99	25,75	36,55	-0,17
Ácido isobutírico	57,46	55,69	46,58	43,41	44,99	49,62	0,94
g-butilrolactona	105,74	101,97	103,48	105,19	103,50	103,98	-0,64
Decanoato de etilo	49,32	84,69	59,11	58,46	68,81	64,08	4,861
Ácido butírico	39,60	25,71	38,02	34,21	38,23	35,16	0,79
Succinato de dietilo	57,64	60,87	49,12	53,65	58,90	56,04	1,2
Ácido isovalerianico	108,38	109,91	121,57	113,57	99,30	110,55	1,16
Metionol	58,08	81,56	67,17	66,85	66,30	67,99	0,417
Acetato de feniletilo	71,89	69,50	71,45	66,64	50,46	65,99	2,3
Ácido hexanoico	89,49	93,08	90,50	89,93	89,59	90,52	1,92
Alcohol benzílico	100,26	99,78	100,94	106,00	99,72	101,34	1,1
b-feniletanol	99,70	98,28	102,06	102,59	100,23	100,57	1,36
4-etilguaiacol	83,85	94,77	81,21	87,16	91,92	87,78	2,434
Ácido octanoico	63,25	76,26	57,37	67,66	69,45	66,80	3,05
4-etylfenol	96,14	104,95	98,05	103,39	100,72	100,65	2,58
4-vinilguaiacol	175,05	208,75	-120,67	173,86	199,60	189,32	2,4
Ácido decanoico	13,34	48,61	52,37	29,01	22,79	33,22	4,09

Tabla 3 Anexo. Valores de recuperación de los volátiles mayoritarios analizados en las sidras.

Name	CAMIN (%)	LM (%)	MAGNERS (%)	Recuperación media (%)	LogP
Acetaldehído	88,70	4,35	21,91	38,32	-0,34
Acetato de etilo	108,63	107,38	106,12	107,37	0,73
Propanoato de etilo	45,92	80,35	77,02	67,76	1,21
Diacetilo	100,35	98,44	90,87	96,56	-1,34
Butirato de etilo	84,45	56,40	72,31	71,05	1,85
1-propanol	189,53	243,55	129,93	187,67	0,25
Isobutanol	101,17	108,62	104,78	104,86	0,76
Acetato de isoamilo	74,40	40,08	64,09	59,52	2,25
1-butanol	99,96	107,78	101,23	102,99	0,88
Alcohol isoamílico	101,78	99,98	104,00	101,92	1,16
Hexanoato de etilo	108,93	106,58	105,13	106,88	2,823
Acetato de hexilo	70,37		61,45	65,91	2,87
Acetoína	101,77	121,05	112,66	111,83	-0,36
Lactato de etilo	102,13	111,71	107,14	107,00	-0,18
1-hexanol	101,73	98,56	100,38	100,22	2,03
c-3-hexenol	103,54	103,77	104,43	103,91	1,61
Octanoato de etilo	75,28	77,14	73,01	75,14	3,842
Ácido acético	94,47	40,10	44,00	59,53	-0,17
Ácido isobutírico	68,34	66,71	58,52	64,52	0,94
g-butirolactona	101,24	117,05	107,60	108,63	-0,64
Decanoato de etilo	41,32	37,77	38,76	39,28	4,861
Ácido butírico	65,15	56,39	48,58	56,71	0,79
Succinato de dietilo	83,42		75,18	79,30	1,2
Ácido isovalerianico	113,13	160,72	103,86	125,90	1,16
Metionol	69,92	72,53	70,26	70,90	0,417
Acetato de feniletilo	90,47	30,40	93,62	71,50	2,3
Ácido hexanoico	97,60	93,21	95,06	95,29	1,92
Alcohol bencílico	100,25	104,93	102,61	102,60	1,1
b-feniletanol	96,98	102,73	103,36	101,02	1,36
4-etilguaiacol	97,02	72,56	62,04	77,21	2,434
Ácido octanoico	73,11	57,59	82,67	71,12	3,05
4-etilfenol	91,04	97,75	95,25	94,68	2,58
4-vinilguaiacol	180,29	156,77	131,55	156,20	2,4
Ácido decanoico	85,57	45,47	80,81	70,62	4,09