

MÉTODO DE MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA PARA EL ANÁLISIS DE COMPUESTOS VOLÁTILES EN CERVEZAS

Isabel Thorndike* y Jorge A. Pino

Instituto de Investigaciones para la Industria Alimentaria.

Carretera al Guatao, km 3 1/2, La Habana, Cuba, C.P. 19200.

RESUMEN

Se desarrolló un método por microextracción en fase sólida para la determinación de compuestos volátiles en cerveza mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas. Se evaluaron tres fibras comerciales comúnmente empleadas en cerveza: PDMS, PDMS/DVB y CAR/PDMS, cuatro concentraciones de cloruro de sodio (0; 12,5; 25 y 37,5 % m/v), tres tiempos de pre-extracción (5, 10 y 15 min). Para la optimización del tiempo y temperatura de extracción se utilizó un diseño de superficie de respuesta. Los valores optimizados fueron fibra de CAR-PDMS (85 μ m), adición de 2 g de cloruro de sodio a 8 mL de muestra, 10 min de pre-extracción, extracción a 35 °C por 30 min y 2 min de desorción.

Palabras clave: cerveza, SPME, compuestos volátiles.

ABSTRACT

A solid-phase microextraction method for the analysis of beer volatiles

A solid-phase microextraction method for the determination of beer volatile compounds in combination with gas chromatography-mass spectrometry was developed. Three commercial fibers commonly used for evaluated beer: PDMS, PDMS/DVB and CAR/PDMS, four sodium chloride concentrations (0; 12.5; 25 and 37.5% m/v), three pre-extraction times, (5, 10 and 15 min) were evaluated. The optimization of the extraction time and extraction temperature was done by response surface design. The optimized parameters were fiber of CAR-PDMS (85 μ m), addition of 2 g of sodium chloride to 8 mL sample, 10 min pre-extraction, extraction to 35°C for 30 min and 2 min desorption.

Keyword: beer, SPME, volatile compounds.

INTRODUCCIÓN

En la cerveza existen diferentes compuestos volátiles que caracterizan o le confieren determinadas características aromáticas deseadas o no deseadas al producto final (1). La escasa concentración e inestabilidad de muchos de estos compuestos dificulta la obtención de un concentrado a partir del alimento, que sea representativo del aroma original y que esté libre de contaminantes u otras sustancias producidas durante el aislamiento. De ahí que se han desarrollado técnicas especiales para su aislamiento y concentración, generalmente basados en la destilación a vacío, técnicas del espacio de cabeza, extracción con disolventes (2, 3).

El desarrollo de métodos analíticos más sensibles y selectivos se encamina a detectar componentes en los alimentos. El desarrollo de la técnica de microextracción en fase sólida (SPME por sus siglas en inglés) ha sido el mayor avance en el área de los análisis de los microcomponentes orgánicos volátiles realizados en la

***Isabel Thorndike Brossard:** Licenciada en Química (UH, 1999). Investigador Agregado del IIIA. Se ha especializado en el análisis de bebidas alcohólicas y no alcohólicas. Ha sido tutora de tesis de grado correspondientes al análisis de compuestos volátiles por cromatografía de gases y publicado en el tema de análisis de cerveza por microextracción en fase sólida en la revista *Ciencia y Tecnología de Alimentos*.

última década, principalmente cuando se analiza el progreso del análisis instrumental y la cuantificación de las muestras concentradas (4). Dentro de las principales ventajas que presenta este método se encuentran su simplicidad operacional, el poco tiempo de manipulación de la muestra, lo cual permite eliminar los errores de este tipo, presenta gran sensibilidad, pues para la determinación existen parámetros específicos, así como su rapidez a la hora de ejecutar la determinación (2).

Por tanto el objetivo de este trabajo fue optimizar un método por SPME para la determinación de compuestos volátiles en cerveza.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la estandarización del método se utilizaron fibras para SPME, viales de 15 mL con rosca y membrana de silicona/PTFE y un porta-fibra manual (holder), todos comercializados por Supelco (Bellefonte, EE.UU.). La extracción de los compuestos volátiles mediante HS-SPME fue realizada evaluando cada una de las condiciones en un baño de agua termostataado, con agitación magnética. Posteriormente la fibra fue retirada del vial e insertada en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases.

Las condiciones iniciales se prefijaron de acuerdo a los reportes encontrados y las experiencias del laboratorio (5-7). Los viales fueron herméticamente cerrados con una membrana de silicona. Al inicio del análisis fueron prefijadas algunas condiciones: 2 g de cloruro de sodio, 8 mL de cerveza, 15 min de extracción a 35 °C, agitación a 100 min⁻¹ y tiempo de desorción de 2 min. Posteriormente se realizó la extracción de los volátiles en muestras de cerveza Bucanero, con las condiciones prefijadas de HS-SPME y se identificaron los componentes de la fracción volátil de la cerveza por cromatografía de gases acoplada a GC-MS.

Se evaluó la capacidad de extracción de tres fibras comerciales reportadas como las más utilizadas en la extracción de compuestos volátiles (PDMS 100 μ m; CAR/PDMS 85 μ m y PDMS/DVB 65 μ m).

Se estudiaron tres tiempos de pre-extracción según reportes encontrados, (5, 10 y 15 min), (2). La cantidad utilizada de cerveza se estableció en función de lograr el mínimo volumen del espacio de cabeza con relación

a la muestra, pero conservando la altura del espacio de cabeza que permitiese la exposición de la fibra a los volátiles, sin contacto directo con la muestra. Por esta razón, dado que los viales utilizados fueron de 15 mL, se adicionaron 8 mL de cerveza previamente filtrada para desgasificar la muestra. Además se evaluó el tiempo de desorción de los volátiles retenidos por la fibra de PDMS (2 y 4 min) en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases, configurado en modo *splitless*.

La extracción de los compuestos volátiles se hizo a tres temperaturas controladas y tres tiempos de extracción, mediante un diseño de superficie de respuesta con un modelo factorial de tres niveles. Períodos de tiempo de 10, 15 y 20 min fueron evaluados a temperaturas de 20, 30 y 40 °C.

El análisis se realizó en un cromatógrafo de gases con detector de ionización por llama de hidrógeno Konik 4000A HRGC con una columna DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 mm) J & W Scientific, Products GMBH Köln). La temperatura del inyector fue de 250 °C para las fibras de PDMS, PDMS/DVB y CW/DVB, así como 280 °C para la fibra de CAR/PDMS según las temperaturas recomendadas por el fabricante (Supelco, Bellefonte, EE.UU.). Se utilizó un inserto de 0,75 mm en el inyector del equipo para favorecer la desorción rápida de los analitos. La temperatura del detector fue de 250 °C. El horno se programó desde 50 °C por 2 min e incremento hasta 250 °C a 4 °C/min y sostenido por 8 min. El gas portador empleado fue hidrógeno con un flujo de 1 mL/min. Los índices de retención cromatográficos de los compuestos volátiles se calcularon a partir de una serie homóloga de n-parafinas (C8-C24).

En el trabajo experimental se utilizó un equipo Shimadzu GCMS QP-5000 (Tokio) con una columna XTI-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m) (Restek, EE.UU.). El horno se programó de forma similar a GC-FID. Las temperaturas del inyector y la interfase fueron 280 y 250 °C, respectivamente. El gas portador fue helio con un flujo de 1 mL/min. Los parámetros de adquisición del detector de masas fueron por ionización electrónica a 70 eV y con un rango de m/z de 35 a 45 Dalton.

Se aplicó la estadística descriptiva que incluyó el valor promedio y desviación estándar. Se aplicó la prueba de Bartlett para comprobar la homogeneidad de varianza

en todos los casos. La diferencia entre los valores promedios de las variables dependientes se examinó mediante análisis de varianza de clasificación simple. En caso de existir diferencias significativas se aplicó la prueba de rangos múltiples de Duncan (8). Para el procesamiento se usó el programa Statistica ver. 6 (StatSoft Inc., Tulsa, EE.UU.).

La optimización de la temperatura y tiempo de extracción de la HS-SPME se realizó mediante las técnicas de superficie de respuesta. Estas técnicas son una combinación de análisis de regresión y diseño experimental para proporcionar medios económicos de localizar un conjunto de condiciones experimentales, o sea una combinación de niveles de factor que proporcionen una respuesta máxima o mínima. Estas técnicas poseen un rasgo muy distintivo a diferencia de otras técnicas estadísticas y es su naturaleza secuencial, lo que las hace apropiadas para la mayoría de las investigaciones que son de tipo continuo (y por consiguiente secuencial).

Se utilizó un modelo de diseño factorial de tres niveles (modelo 32), lo que equivale a dos factores con tres niveles. Los factores fueron la temperatura y tiempo de extracción, mientras que las variables de respuesta fueron el área total del cromatograma y el número total de picos cromatográficos detectados (siempre que no fueran contaminantes o posible producto de degradación de la fibra). Los datos experimentales de área total se transformaron a su valor logarítmico para garantizar la suposición de aditividad en el análisis de varianzas (8).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La eficiencia de la extracción de los componentes volátiles depende, en gran medida, del tipo de fibra a utilizar (4). Se utilizó la técnica HS-SPME debido a que es una técnica simple y de bajo costo. Dentro de la misma se seleccionó la variante de espacio de cabeza para evitar la contaminación de la fibra con la muestra de cerveza.

La Fig. 1 presenta los resultados de la comparación de las fibras con distintos tiempos de desorción. El procesamiento estadístico de los datos de área total de los diferentes experimentos indicó que fueron significativos la fibra, el tiempo y su interacción para $p \leq 0,05$, lo

que indica que el área total no se comportó igual para cada tiempo y fibra. Con la fibra de CAR-PDMS y 2 min de desorción se logró la mayor área total. Este resultado concuerda con los reportados por otros autores (9,10). Sin embargo, otros estudios informan que la fibra de PDMS es más selectiva para el análisis de cervezas (7).

No se encontraron diferencias significativas en las variables de respuesta área total y número de picos cromatográficos para los dos tiempos de desorción evaluados con las fibras de CAR/PDMS, PDMS y PDMS/DVB. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos se seleccionó la fibra de CAR/PDMS y tiempo de desorción de 2 min para continuar el estudio de optimización al lograr en la extracción un máximo en las dos variables de respuesta.

Para estudiar este efecto se realizaron experiencias con diferentes concentraciones de cloruro de sodio (0; 12,5; 25 y 37,5 % m/v), las que corresponden a la adición de 0, 1, 2 y 3 g de sal común a los 8 mL de cerveza. Sin la adición de cloruro de sodio solo se apreciaron 15 picos cromatográficos; mientras que la adición de la sal, independientemente de la concentración, arrojó la presencia de 20, 25 y 24 picos con el gradiente de concentración. La adición en la cerveza de 25 y 37,5 % en peso de cloruro de sodio logró un máximo en la eficiencia de la extracción para $p \leq 0,05$.

La Fig. 2 muestra los resultados del análisis estadístico, en el cual se obtuvieron las mayores áreas totales para las concentraciones de cloruro de sodio de 25 y 37,5 % y estas no se diferenciaron entre sí. Por tanto, se seleccionó la concentración de cloruro de sodio de 25 % m/v para continuar las experiencias.

Otro de los parámetros estudiados fue el tiempo de pre-extracción debido a su relación directa con la eficiencia del método de SPME. Para ello se evaluaron tres tiempos: 5, 10 y 15 min. Los resultados indicaron que con los tiempos de 10 y 15 min se logró un mayor número de picos con respecto a 5 min.

La Fig. 3 refleja el cálculo del área total. Al comparar estadísticamente los valores de áreas totales para 10 y 15 min de pre-extracción no se encontraron diferencias significativas para $p \leq 0,05$. Por tal razón, se seleccionaron 10 min para continuar la optimización.

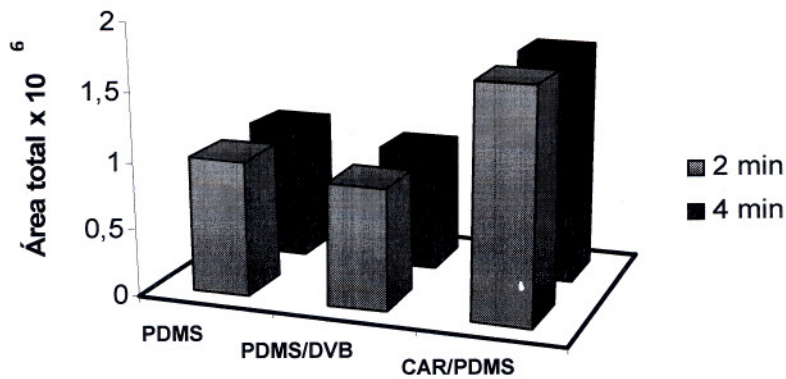


Fig. 1. Efecto en el área total del tipo de fibra y tiempo de desorción. Letras distintas indican diferencias significativas para $p \leq 0,05$.

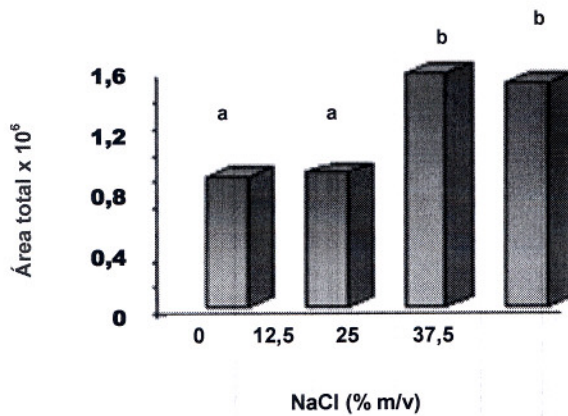


Fig. 2. Influencia de la concentración salina en el área total de los picos. Fibra CAR/PDMS, 8 mL de cerveza, 15 min de pre-extracción y 2 min de desorción. Letras distintas indican diferencias significativas para $p \leq 0,05$.

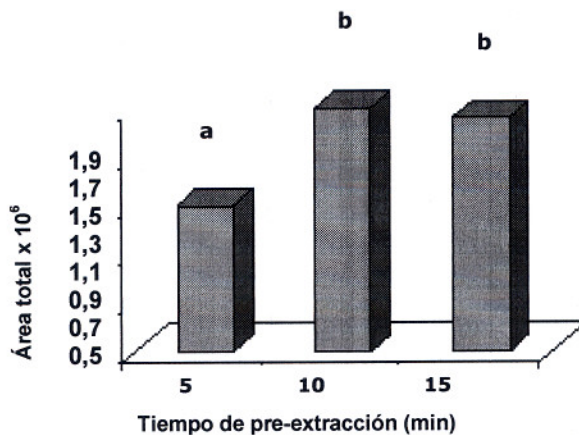


Fig. 3. Influencia del tiempo de pre-extracción en el área total. Fibra CAR/PDMS, 8 mL de cerveza, 2 g de NaCl y 2 min de desorción. Letras distintas indican diferencias significativas para $p \leq 0,05$.

La selección de las variables que afectan el desarrollo de métodos por HS-SPME se ha realizado sobre la base de no tener en cuenta sus interacciones, suponiendo que existe independencia entre los factores o variables que intervienen en los análisis. La interacción es la respuesta diferencial a un factor en combinación con niveles variables de un segundo factor aplicado simultáneamente, es decir, es un efecto adicional debido a la influencia combinada de dos o más factores.

El tiempo y la temperatura de extracción son dos de los factores más importantes que afectan la presión de vapor y el equilibrio del sistema. Como consecuencia la repetitividad y la reproducibilidad de los compuestos volátiles en el espacio de cabeza, serán grandemente afectadas si existen cambios en la presión de vapor. Por tanto, para lograr un buen desempeño del método se optimizaron estos dos parámetros. Para el estudio se seleccionó un diseño de superficie de respuesta con un modelo factorial de tres niveles para dos factores: temperatura y tiempo, en el que se emplearon como

variables de respuesta el área total de los picos expresado como su logaritmo y el número de picos cromatográficos.

A partir del logaritmo de las áreas totales se obtuvo un modelo de regresión múltiple. En el gráfico de contorno, la zona definida por los rangos de temperatura de 30 a 42 °C y tiempo de 24 a 37 min fue sugerida como la más adecuada para el análisis de los componentes volátiles en cerveza.

La Fig. 4 refleja que en esta zona se obtuvieron valores superiores a 0,85 (de un máximo posible de 1), para la función objetivo (desirability function). El hecho de que las temperaturas óptimas sean relativamente bajas resulta ventajoso pues mantener la fibra a bajas temperaturas es una condición favorable para el procedimiento de SPME (4). El programa arrojó como solución óptima 30,9 min a 37 °C (desirability = 0,983). Teniendo en cuenta facilitar el control de los parámetros de la técnica se decidió seleccionar 30 min a 35 °C, (desirability = 0,957) para los factores de tiempo y temperatura de extracción.

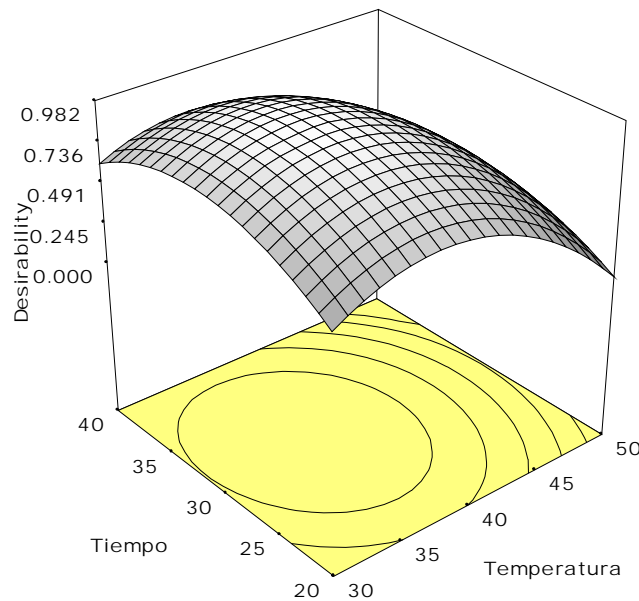


Fig. 4 Superficie de respuesta para la optimización del tiempo y temperatura de extracción.

CONCLUSIONES

Se optimizó y validó parcialmente un método de HS-SPME para el análisis de compuestos volátiles en cerveza. Los valores optimizados fueron los siguientes: fibra de CAR-PDMS (85 μ m), adición de 2 g de cloruro de sodio a 8 mL de muestra, tiempo de pre-extracción 10 min, 30 min de extracción a 35 °C y 2 min de desorción.

REFERENCIAS

1. Augusto, F.; Pires, A.; Dos Santos, E. y Revellino, S. J. *Chromatogr. A* 889, 3-14, 2000.
2. Kataoka, H.; Lord, H. y Pawliszyn, J. J. *Chromatogr. A* 880, 35-39, 2000.
3. Beattie, S.; Devine, S. y Kirk, L.L. *Food Chem.* 86, 234-240, 2004.
4. Pawliszyn, J. *Applications of Solid-Phase Microextraction*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1999, pp. 3-21.
5. Christopher, J.; Scarlata, C. y Ebeler, S. J. *Agric. Food Chem.* 47, 2502-2507, 1999.
6. Smith, R. y Hill, G. J. *Chromatogr. A* 872, 203-213, 2000.
7. Wardencki, W.; Sowinski, P. y Curyo, J. J. *Chromatogr. A* 984, 89-96, 2003.
8. Baird, D. *Experimentación: Una Introducción a la Teoría de las Mediciones y al Diseño de Experimento*, México, D.F., Prentice-Hall Hispanoamericana S.A., 1991.
9. Jelén, H.; Dabrowska, A.; Klensporf, D.; Nawrocki, J. y Wasowicz, E. *Chem. Anal. (Warsaw)* 49, 869-872, 2004.
10. Liu, M.; Zerg, Z. y Xiong, B. *Chromatogr. A* 1065, 287-299, 2005.