

# Universidad Católica de Santa María

## Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas

### Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica



## DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO VOLTAMPEROMÉTRICO PARA LA DETERMINACIÓN DE ACETALDEHÍDO EN CERVEZA

Tesis Presentada por las Bachilleres:

**León Choque, Jimena Carolina**  
**Niño de Guevara Zegarra, Marcia Lucia**

Para optar el Título Profesional de  
Ingeniero Biotecnólogo

**Asesor: Jaime Cárdenas, PhD**

**AREQUIPA – PERÚ**

**2018**

UNIVERSIDAD CATOLICA SANTA MARIA  
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas  
y Biotecnológicas  
Programa Profesional de Ingeniería Biotecnológica

Expediente N°. 13048275  
N° Trámite en Fac. 196-2013  
Fecha Recep. Fac. 29-11-2013

FORMATO UNICO PARA TRAMITACIÓN DE TÍTULO PROFESIONAL

DE: **LEON CHOQUE, Jimena Carolina**  
**NIÑO DE GUEVARA ZEGARRA, Marcia Lucía**

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO BIOTECNOLOGO

"DETERMINACION VOLTAMPEROMETRICA DE ALDEHIDOS RELACIONADO AL ENVEJECIMIENTO DE LA CERVEZA"

DICTAMINADORES: 1) *Dr. José Villanueva Salas* 2) *Ing. Cinthia Córdova Barrios*

**DICTAMEN DE PLAN:** Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, según lo encargado, hemos procedido a revisar el Plan de Tesis intitulado: "DETERMINACION VOLTAMPEROMETRICA DE ALDEHIDOS RELACIONADO AL ENVEJECIMIENTO DE LA CERVEZA", y habiendo sido realizadas las correcciones y sugerencias correspondientes, consideramos se encuentra APTO para continuar con el trámite de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.  
Atentamente

FIRMAS:   (Devolver antes de 8 días hábiles) FECHA *09/12/2013*

ASESOR: *Dr. Jaime Cárdenas García*

**DICTAMEN ASESORÍA:** Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación como asesor del trabajo de investigación presentado por las recurrentes, tengo a bien informar que luego de verificado el cumplimiento de los objetivos y la redacción del informe con los resultados, discusión y conclusiones correspondientes y debiendo cambiar el título a: "DESARROLLO Y VALIDACION DE UN METODO VOLTAMPEROMETRICO PARA LA DETERMINACION DE ACETALDEHIDO EN CERVEZA", considero que el presente trabajo está APTO para continuar con el trámite, en conformidad al Reglamento de Grados y Títulos de nuestra Facultad  
Atentamente

FIRMA  FECHA *28/11/18*

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

- 1) *Dr. José Villanueva Salas* 3) *Ing. Willy Valdivia Carpio*  
2) *Ing. Cinthia Córdova Barrios*

**DICTAMEN FINAL:** Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, atendiendo a su designación como Dictaminadores del presente Borrador de Tesis y luego de hechas las observaciones y correcciones pertinentes, cumpliendo con las exigencias mínimas establecidas para un trabajo de investigación de Tesis profesional, es que consideramos APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.  
Atentamente

FIRMA   (Devolver antes de 15 días hábiles) FECHA *07/12/2018*

JURADOS: PRESIDENTE *DR. JOSE VILLANUEVA SALAS*  
VOCAL *ING. CINTHIA CORDOVA BARRIOS*  
SECRETARIO *ING. WILLY VALDIVIA CARPIO*

FECHA *12/12/18* HORA *19.00* LOCAL *C-402*

FIRMA DEL DECANO

FECHA



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

## AGRADECIMIENTOS

A Dios por bendecirnos y ayudarnos a culminar nuestra tesis.

A Daniel, Adrián y Belén por ser fuerza que me inspira a salir a delante.

A mis padres, Isaí, Elizabeth por todas sus enseñanzas y el trabajo brindado en todos estos años, quienes a lo largo de mi vida han velado por mi bienestar y educación.

A mis hermanos Maricruz y Frank, por su amistad y compañía.

**Jimena**

A Dios y a la milagrosa Virgen de Copacabana.

A mis padres, Mario y Luz por su apoyo constante, en especial a mi mamá por su gran amor y por no dejarse vencer. A ellos les debo todo.

A Leonardo, por ser el impulso que me ayudó en la tesis.

A mi hermano, mi prima Juana, mis tías Victoria y María por los ánimos que me dieron.

A Javier, por ser el mejor compañero de trabajo y por su gran amistad brindada.

**Marcia**

A nuestro asesor, Jaime Cárdenas por ser nuestro soporte, por su ayuda y todos sus consejos.

Al Dr. José Villanueva Salas, por su paciencia y ayuda incondicional.

A la Dra. Jeaneth Medina Pérez, por su gran ayuda en el laboratorio.

A la Ingeniera Cinthia Córdova, por sus consejos y ayuda en la elaboración de la tesis.

A la Ingeniera Pamela Manrique por su apoyo constante.

A nuestros amigos: Ana Lucia, Lalo, Chris, Alonso, Lucho y Rodrigo por su amistad y ánimos brindados todo este tiempo.

A Betty Salazar, por su amistad, ayuda y consejos.

Mi sincero agradecimiento a quienes colaboraron de una u otra forma en el desarrollo de esta tesis.

Gracias por todo

**Jimena y Marcia**

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	<b>V</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>VI</b>
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>IX</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>X</b>
<b>CAPÍTULO I</b> .....	<b>1</b>
<b>MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>1</b>
1.1. Cerveza .....	1
1.1.1. Historia de la Cerveza.....	1
1.1.2. Elaboración de la Cerveza .....	3
1.1.3. Estabilidad de la cerveza .....	9
1.1.4. La cerveza y la salud .....	10
1.2. Aldehídos.....	12
1.2.1. Información física y química del acetaldehído: .....	13
1.2.2. Producción y uso:.....	14
1.2.3. Incidencia.....	14
1.2.4. Reacciones con Aldehídos.....	15
1.3. Voltamperometría.....	16
1.3.1. Instrumentación de la voltamperometría .....	17
1.3.2. Tipos de Voltamperometría.....	18
1.4. Validación de métodos analíticos.....	22
1.4.1. Parámetros de evaluación. ....	23
<b>CAPÍTULO II</b> .....	<b>27</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>27</b>
2.1. Muestra .....	27
2.2. Lugar de Experimentación.....	27
2.3. Materiales, reactivos y equipos .....	27
2.3.1. Materiales .....	27

2.3.2. Reactivos.....	28
2.3.3. Electrodos.....	28
2.3.4. Soluciones.....	28
2.3.5. Equipos.....	28
2.4. Metodología: Técnicas e Instrumentos.....	29
2.4.1. Validación Voltamperométrica.....	29
2.4.2. Análisis voltamperométrico.....	35
2.4.2.1. Pretratamiento de Muestras.....	36
2.4.2.2. Preparación de Soluciones.....	37
2.4.2.3. Medición de Muestras.....	38
2.4.2.4. Análisis estadístico.....	40
<b>CAPÍTULO III.....</b>	<b>42</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>42</b>
3.1. Validación Voltamperométrica.....	42
3.1.1. Validación electrónica.....	42
3.1.2. Validación química.....	43
3.1.3. Validación Analítica: Análisis Estadístico.....	44
3.2. Análisis Voltamperométrico.....	55
3.2.1. Medición de Muestras.....	55
3.2.2. Análisis Estadístico: Cuantificación de acetaldehído en muestras de cerveza.....	56
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>61</b>
<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>62</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>63</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Diferencia gráfica entre las levaduras Ale y Lager. ....	5
Figura 1.2. Fermentación alcohólica.....	8
Figura 1.3. Fórmula química del acetaldehído .....	13
Figura 1.4. Señal de excitación aplicada en voltamperometría de pulso diferencial. ....	20
Figura 1.5. Señal de excitación de la voltamperometría de onda cuadrada. ....	20
Figura 1.6. Señal de excitación en voltamperometría cíclica. ....	21
Figura 2.1. Esquema de la metodología de trabajo.....	30
Figura 2.2. Estación voltamperométrica 797 VA Computrace .....	32
Figura 2.3. Equipo de destilación.....	36
Figura 2.4. Reacción del acetaldehído con la hidrazina.....	39
Figura 2.5. Reducción de la hidrazona.....	39
Figura 3.1. Validación electrónica.....	42
Figura 3.2. Desempeño de picos.....	43
Figura 3.3. Validación química del equipo.....	44
Figura 3.4. Curva de calibración estadística para linealidad.....	46
Figura 3.5. Comparación de medias entre las muestras de cerveza .....	57
Figura 3.6. Evaluación de la concentración de acetaldehído en cerveza vs su tiempo de almacenamiento .....	60

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Propiedades fisicoquímicas del acetaldehído .....	13
Tabla 2.2. Condiciones para las determinaciones voltamperométricas .....	38
Tabla 3.1. Medidas de intensidad de señal para diferentes concentraciones de estándar de acetaldehído .....	45
Tabla 3.2. Prueba t-student para linealidad del método voltamperométrico .....	48
Tabla 3.3. Análisis de varianza para linealidad del método voltamperométrico. ....	48
Tabla 3.4. Medidas de intensidad de señal para diferentes concentraciones de estándar de acetaldehído para el análisis de repetibilidad. ....	49
Tabla 3.5. Resultados estadísticos para el análisis de repetibilidad. ....	50
Tabla 3.6. Valores aceptables de CV para repetibilidad, según la AOAC. ....	50
Tabla 3.7. Medidas de intensidad de señal para diferentes concentraciones de estándar de acetaldehído para el análisis de precisión intermedia .....	51
Tabla 3.8. Resultados estadísticos para precisión intermedia. ....	52
Tabla 3.9. Resultados de los ensayos para la determinación de la exactitud .....	54
Tabla 3.10. Límites de porcentaje de recuperación según la AOAC. ....	54
Tabla 3.11. Medidas de concentraciones de acetaldehído en muestras de cervezas con diferentes fechas de fabricación.....	56
Tabla 3.12. Estadística descriptiva de las concentraciones de Acetaldehído en cervezas con diferentes fechas de fabricación.....	56
Tabla 3.13. Análisis de varianza para los tres tipos de cerveza .....	58
Tabla 3.14. Diferencias obtenidas de las comparaciones múltiples al utilizar la prueba de Fisher.....	58
Tabla 3.15. Comparación de la concentración de acetaldehído en cervezas y su tiempo de almacenamiento .....	59



## RESUMEN

La cerveza, una bebida basada en la biotecnología y principalmente de consumo mundial, puede presentar algunos problemas en su calidad y uno de ellos radica en el contenido de acetaldehído, compuesto que altera su sabor y aroma.

Por tal motivo, este trabajo de investigación buscó desarrollar un método alternativo de alta sensibilidad como la voltamperometría, para cuantificar el contenido de acetaldehído en muestras de cerveza, con una previa validación analítica. Se inició con el tratamiento previo de las muestras de cerveza con la finalidad de purificar nuestro analito y eliminar interferentes, por medio de destilación; continuó con el establecimiento de parámetros para la validación, según normas internacionales de validación de métodos. Todos los análisis se determinaron por voltamperometría de onda cuadrada. Los parámetros y sus valores promedio obtenidos fueron: linealidad ( $R^2=0.9998$ ); repetibilidad ( $CV=2.22\%$ ); precisión intermedia ( $CV=5.77\%$ ), límite de detección ( $0.0110\text{ mg/L}$ ), límite de cuantificación ( $0.0305\text{ mg/L}$ ) y exactitud (porcentaje de recuperación de  $91.74\%$ ); todos aceptables bajo la norma de la AOAC. Finalmente, se evaluó el contenido de acetaldehído en cervezas con diferentes fechas de producción ( $15/02/2018$ ,  $20/08/2017$ ,  $11/10/2016$ ), 0, 173 y 471 días y se concluyó que a medida que aumentan los días de almacenamiento, se incrementa la concentración de acetaldehído de manera proporcional.

**Palabras clave:** acetaldehído, validación, voltamperometría



## ABSTRACT

Beer, a beverage based on biotechnology and mainly for global consumption, may present some problems in its quality and one of them lies in the content of acetaldehyde, a compound that alters its flavor and aroma.

For this reason, this research paper sought to develop an alternative method of high sensitivity such as voltammetry, to quantify acetaldehyde content in beer samples, with prior analytical validation. It began with the treatment of the beer samples in order to purify our analyte and eliminate interfere, by means of distillation; continued with the establishment of parameters for validation, according to international standards for validation of methods. All analysis were determined by square wave voltammetry. The parameters and their average values obtained were: linearity ( $R^2=0.9998$ ), repeatability ( $CV=2.22\%$ ), intermediate precision ( $CV=5.77\%$ ), limit of detection ( $0.0110\text{ mg/L}$ ), limit of quantification ( $0.0305\text{ mg/L}$ ) and accuracy (recovery percentage of  $91.74\%$ ); all acceptable under the AOAC standards. Finally, the acetaldehyde content was evaluated in beers with different production dates (15/02/2018, 20/08/2017, 11/10/2016), 0, 173 and 471 days and it was concluded that as storage days increase, the concentration of acetaldehyde increases proportionally.

**Key words:** acetaldehyde, validation, voltammetry.

## INTRODUCCIÓN

La Biotecnología ha sido definida como la aplicación de procesos, sistemas y organismos biológicos a la industria manufacturera y de servicios. Basada en un arte que ha ido refinándose a lo largo de miles de años, la Biotecnología tradicional, se encuentra representada por las industrias del malteado y la elaboración de cerveza<sup>1</sup>. La información más antigua que se tiene sobre el consumo de cerveza en el Perú data de 1866, sin embargo, la primera fábrica de cerveza fue fundada en Lima por el alemán Federico Bindels, quien nunca imaginó que su producto sería el impulso para una de las industrias más importantes de nuestro país.<sup>2</sup> A finales del siglo XIX, en el interior del país también estaba surgiendo el mercado cervecero. En Cusco, se encontraban las cervecerías de Ernesto Gunther, la alemana de Gustavo Mangelsdorff y la francesa de Leoncio Vignes y Julio Ariansen; éstas dos últimas se aliaron en 1898 y fundaron Cervesur, la primera fábrica cervecera en Arequipa.<sup>3</sup>

En el ranking latinoamericano, el Perú ocupa el quinto lugar, consumiendo 45.4 litros de cerveza por persona al año, según un estudio de Euromonitor.<sup>4</sup>

Al ser tan importante esta industria, las empresas cerveceras tienen una gran preocupación por la calidad de la cerveza, ésta debe cumplir todas las especificaciones establecidas, referidas a contenido de alcohol, espuma, aroma, apariencia, sabor; dichas cualidades se deben mantener durante el tiempo de almacenamiento y hasta la llegada a las manos del cliente.<sup>5</sup>

Existen muchos compuestos formados durante el proceso de elaboración de la cerveza que influyen decisivamente en el sabor del producto, llamados off-flavors, como por ejemplo: acetaldehído, diacetilo, sulfuro de dimetilo, entre otros.

En las plantas de producción de cerveza, se cuenta con una capacidad bastante amplia de equipos y técnicas analíticas para poder medir todos los subproductos, debido a que es información necesaria para el control de calidad de los procesos. Al mismo tiempo, la cerveza envasada es testeada por un panel de degustadores entrenados conocedores del comportamiento de los olores y sabores del producto a través del tiempo. Esta degustación sirve para detectar las diferencias de sabor con respecto al tiempo transcurrido, ya que, al ser un producto perecedero, el sabor de la cerveza no es estable

y con el tiempo suele perder su perfil de frescura, incluso habiendo cumplido todas las especificaciones de elaboración y envasado.

Recientemente, se demostró que un grupo particular de aldehídos derivados de la degradación de los aminoácidos, conocidos como aldehídos de Strecker, aumentan su concentración significativamente durante el tiempo de almacenamiento de la cerveza y probablemente sean responsables de algunos sabores como notas a pan, caramelo/quemado, dulce y vino/sherry en la cerveza.<sup>6</sup>

El sabor de la cerveza y por ende los subproductos formados durante su proceso, se evalúan convencionalmente mediante la combinación de herramientas analíticas comunes y paneles de perfil organoléptico conocidos como paneles sensoriales humanos.<sup>7</sup>

En el presente trabajo de investigación, se realizará la determinación de acetaldehídos en muestras de cerveza aplicando un método alternativo basado en la voltamperometría. Es una medición indirecta de la calidad de la cerveza, ya que los valores de acetaldehído nos indican el fin del proceso de maduración, revelando si una cerveza está madura o no.

## HIPÓTESIS

Debido a que existe gran cantidad de técnicas electroquímicas para la determinación de diferentes compuestos es probable desarrollar y validar un método voltamperométrico capaz de cuantificar la presencia de acetaldehído en muestras de cerveza.



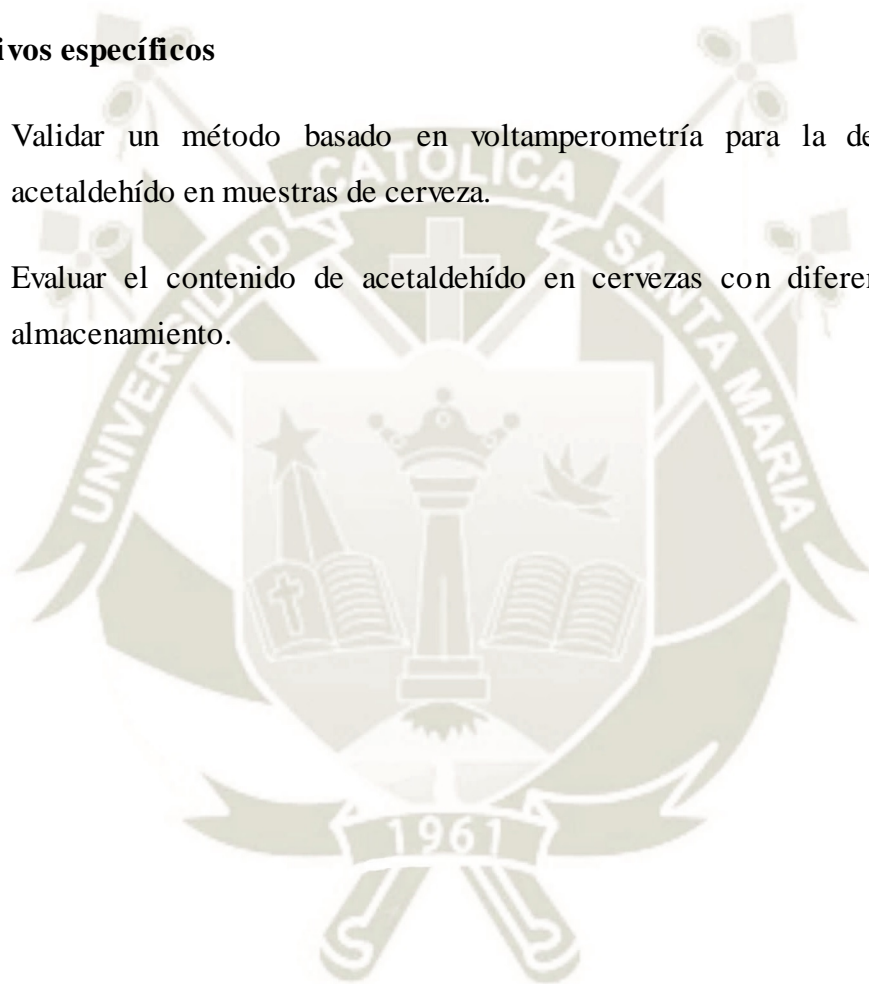
## OBJETIVOS

### Objetivo general

- Desarrollar y validar un método voltamperométrico para la determinación de acetaldehído en cerveza.

### Objetivos específicos

1. Validar un método basado en voltamperometría para la determinación de acetaldehído en muestras de cerveza.
2. Evaluar el contenido de acetaldehído en cervezas con diferentes tiempos de almacenamiento.



## CAPÍTULO I

### MARCO TEÓRICO

#### 1.1. Cerveza

La cerveza es una bebida alcohólica bastante popular, y probablemente una de las más antiguas fabricadas por el hombre.<sup>8</sup> Es una bebida fermentada y espumosa; en su elaboración se utiliza agua, materias primas ricas en hidratos de carbono, como por ejemplo: cebada, trigo, maíz, etc.; se fermenta con levadura y se le da sabor con lúpulo, planta que le brinda amargor y aroma.<sup>9</sup>

Desde el punto de vista químico, la cerveza puede ser considerada una solución de agua-etanol que presenta un pH ácido (alrededor de 4.2) la cual contiene diversas moléculas disueltas. Desde la perspectiva de la termodinámica, se puede inferir que una botella de cerveza se comporta como un sistema cerrado con un alto nivel de entropía a la vez que intenta mantener un estado de mínima energía.

Por consiguiente, el periodo de almacenamiento de la cerveza favorece la transformación química de la sustancia, es decir, las moléculas cambian su composición química experimentando distintas reacciones.

Así mismo, el sabor inicial de la cerveza fresca puede verse afectado debido a la degradación de las moléculas por debajo del umbral del sabor.<sup>10</sup>

##### 1.1.1. Historia de la Cerveza

La mención más antigua de la cerveza se halla en una escritura cuneiforme del año 2800 a.C. en la Mesopotamia, donde se describe la distribución de una ración diaria de cerveza y pan a los trabajadores. Los egipcios también prepararon cerveza. El proceso de fabricación de la cerveza se encuentra representado en una pintura muy antigua de

la pared de un santuario egipcio de hace 4400 años. Estas cervezas eran principalmente oscuras, se preparaban a partir de panes (cereales germinados) de cerveza tostados. Algunas de ellas tenían un grado de alcohol del 12 a 15 %. Los egipcios, descubrieron además la botella de cerveza: en la edificación de una pirámide se repartía en jarras, esto en el mismo lugar de construcción.<sup>11</sup>

Por otra parte, la bebida preferida por los celtas y germánicos fue el aguamiel, una cerveza ácida, que se guardaba en recipientes de hasta 500 litros a unos 10°C bajo tierra y se mezclaba con miel.<sup>11</sup>

Muy tempranamente se supo que la cerveza estaba libre de gérmenes peligrosos y que también el agua, que a menudo no se encontraba en perfecto estado, podía ser tratada por medio de la fermentación y los ácidos naturales generados durante la misma. Por ello, durante muchos siglos no era el agua, sino la cerveza –y en algunas zonas el vino- el líquido utilizado contra la sed, tanto del soberano como del hombre común.<sup>12</sup> Es más, en Europa, la cerveza ya era una bebida muy popular para los pueblos alemanes, los escitas y los celtas. Era fabricada por las mujeres como alimento diario en los hogares, debido a que tanto la fabricación de la cerveza como la panificación eran trabajos femeninos en todas las culturas primitivas.

Los monjes también han jugado un papel fundamental en todo lo relacionado con la técnica cervecera; ellos desarrollaron la fabricación de cerveza como un arte, asumiendo este tema en el siglo VI.<sup>11</sup> Ellos producían cerveza en los monasterios. En las cervecerías de los monasterios se realizó la transferencia a la industria cervecera, debido a que ya no se fabricaba la cerveza sólo para el consumo humano, sino que se la entregaba como una forma de pago. Así mismo, se produjo un cambio, los hombres empezaron a fabricar la cerveza, lo cual se mantuvo a través de los tiempos hasta el presente. El hecho de que la fabricación de la cerveza haya pasado a un nivel industrial, hizo que se imponga, mayormente en las ciudades, una toma de influencia gubernamental en el desarrollo de la industria cervecera. Dicha influencia se presentó en la forma de que el derecho a fabricar cerveza era concedido como privilegio soberano. Esto es de particular importancia, dado que la fabricación de cerveza se convierte en la temprana Edad Media en una industria muy extendida en el sur alemán.

En cuanto a la calidad y a la protección del consumidor, una de las primeras leyes fue la Ley de Pureza Bávara, el “Reinheitsgebot”, firmada el 23 de abril de 1516 en el congreso de Estados Provinciales en Ingolstadt, la cual establecía que los únicos insumos en la fabricación de la cerveza podían ser cebada, agua y lúpulo. Así mismo, era una disposición legal que tenía como finalidad abastecer a los consumidores con una cantidad suficiente de productos a un precio justo. Se reglamentaron los intereses de protección al consumidor, la fabricación del producto y se fijó un precio justo de acuerdo a la calidad de la cerveza. Debido a ello, esta ley también es considerada la primera ley mundial de protección al consumidor.

## **1.1.2. Elaboración de la Cerveza**

### **1.1.2.1. Materias primas**

La cerveza está elaborada principalmente a base de cuatro sustancias: cebada malteada, levadura, lúpulo y agua. No obstante, se le puede añadir muchos otros componentes como maltas especiales, carbohidratos y cereales no maltados como maíz, sorgo, centeno, avena, trigo, entre otros; convirtiéndola en una mezcla con macromoléculas como proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos y lípidos.<sup>10</sup>

#### **Cebada**

Es el insumo más importante para la elaboración de cerveza. Contiene un alto contenido de almidón y su cáscara (gluma) sigue adherida al grano aún después de la trilla y de haber sido procesada para ser transformada en malta, es por todo ello la razón de su uso.

Otra característica de la cáscara es que posee la propiedad de formar una capa filtrante, necesaria en una posterior etapa de fabricación. Previo a su procesamiento, la cebada debe ser convertida en malta.<sup>13</sup>

#### **Levadura**

Las levaduras, por definición, son hongos unicelulares capaces de descomponer una gran cantidad de sustratos, principalmente carbohidratos.

Algunas especies de levadura utilizadas en la industria cervecera, son las siguientes:

a) *Saccharomyces cerevisiae*:

Se utiliza ampliamente en la fermentación de vino y cerveza desde prácticamente el inicio de la civilización. Este tipo de levadura posee características que le permiten fermentar a altas temperaturas, tienden a flotar en la superficie, lo que se conoce como fermentación tipo Ale (Figura 1.1); por lo general son cervezas más complejas en cuanto a sabor y aroma.<sup>14</sup>

b) *Saccharomyces pastorianus*:

Es un híbrido de la levadura *S. cerevisiae* y de la *S. eubayanus*. Fue descubierta por Emil Christian Hansen en la cervecería Carlsberg en Dinamarca, por tal motivo también se la conoce como *Saccharomyces carlsbergensis*.

Es una levadura de fondo que no suele formar esporas<sup>15</sup>, esto quiere decir que no tienden a flotar en la superficie, sino que son de baja fermentación, a esto se le conoce como fermentación tipo Lager (Figura 1.1).

Se adaptan bien a la fermentación lenta a temperaturas muy bajas, temperaturas en las que una levadura Ale entraría en estado de latencia. Las cervezas tipo lager tienen las características de ser más refinadas y fáciles de tomar, de sabores limpios y con frecuencia descritas como refrescantes.

## Lúpulo

Su nombre científico es *Humulus Lupulus*, pertenece a la familia del cannabis, sin embargo, no presenta su acción alucinógena. Por el enorme impacto que produce en las cervezas, es calificado como un ingrediente esencial, ya que aporta amargor, influencia claramente el sabor y aroma.

Tiene propiedades antibacterianas y estabiliza la formación de espuma. Incluso, los últimos años se han realizado estudios que han determinado que el lúpulo tiene efectos benévolos sobre la salud.

En gran medida, todas las propiedades que aporta a las cervezas dependen de las variedades utilizadas, los protocolos de adición de las mismas durante el hervor del mosto en la caldera de ebullición y las formas utilizadas, que pueden ser flores, pellets y extractos que contienen fracciones enriquecidas o modificadas para otorgarle un beneficio extra.<sup>16</sup>

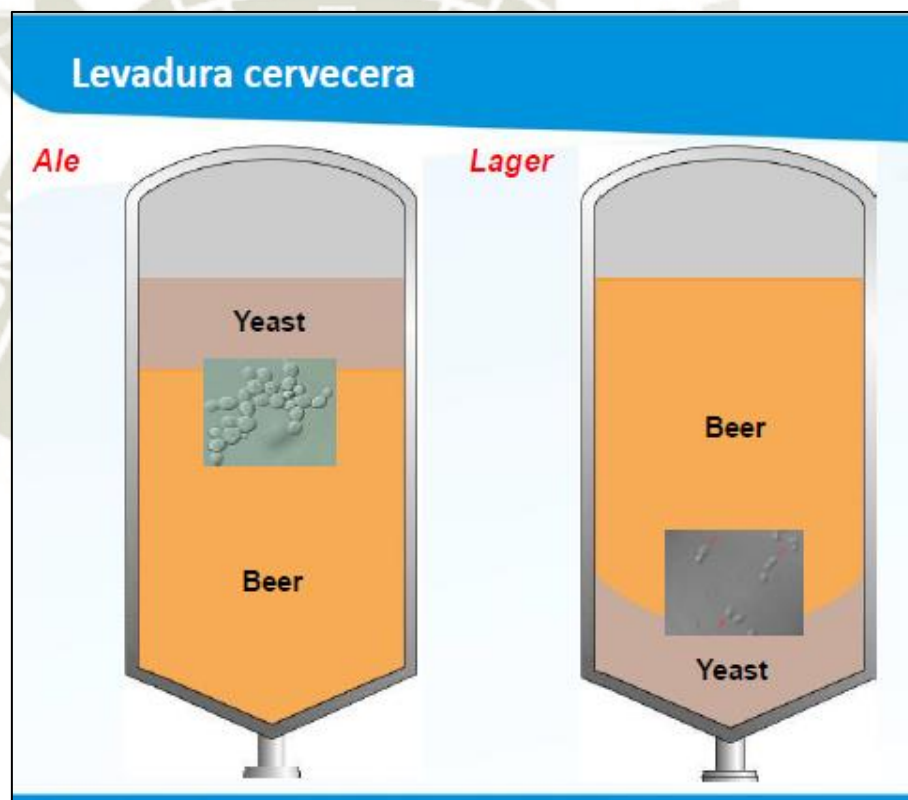


Figura 1.1. Diferencia gráfica entre las levaduras Ale y Lager.<sup>17</sup>

### Agua

Este componente como tal es el más importante y el que se encuentra en mayor porcentaje (92 g/100 g).

El poder refrescante de la cerveza se debe tanto a su alto contenido en agua como a los minerales que contiene (más de 30).

Un litro de cerveza satisface casi la mitad de las necesidades diarias de magnesio de un adulto; y un 40 y 20 % respectivamente, de las necesidades diarias de fósforo y potasio. Así al ser rica en potasio y baja en sodio, se debe su característica de bebida diurética.<sup>18</sup>

#### **1.1.2.2. Proceso de elaboración**

La elaboración de la cerveza se basa en una sucesión de tres procesos bioquímicos: la formación de enzimas en el grano de cereal germinante; la cocción, que es la degradación de almidón a azúcar justamente por parte de esas enzimas y, seguidamente, la fermentación del azúcar a alcohol y CO<sub>2</sub> (fermentación alcohólica). Tales procesos y su resultado (la cerveza) son bastante conocidos desde hace miles de años; la única diferencia es que, antiguamente no se reconocía su control y cómo estaban relacionados.

Cada maestro cervecero apunta a un sabor de cerveza agradable y consistente mediante la selección de materias primas de alta calidad y la aplicación de un proceso de producción controlado.<sup>19</sup>

Una cerveza de calidad evidentemente es reconocida por la ausencia de aspectos indeseables y por lo tanto se evalúan ciertos parámetros, tales como la calidad del sabor, presencia y permanencia de espuma, color, aroma, contenido de sólidos, entre otros.<sup>20</sup>

Una mezcla compleja de compuestos volátiles que varían en estructuras químicas y niveles de concentración, genera el aroma de la cerveza cuyo rol es muy importante en la calidad.

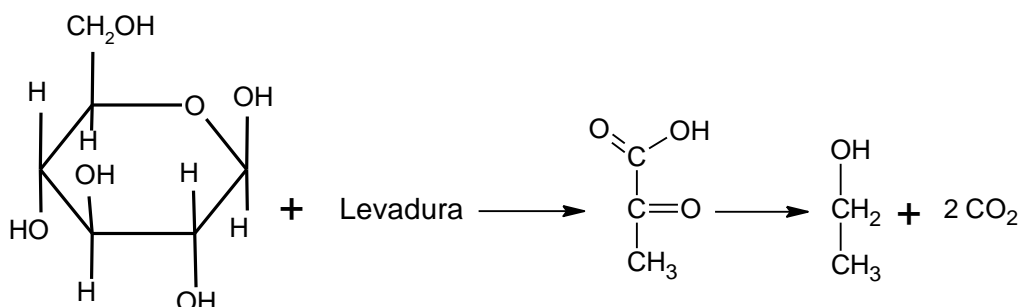
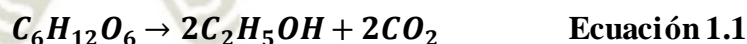
La composición de la cerveza es bastante compleja, por lo tanto, no es raro que el producto terminado contenga componentes que reaccionen entre sí. Es muy importante reconocer que lo que se espera en el mercado cervecero es mantener una óptima calidad en el envase por un periodo de tiempo determinado.<sup>21</sup>

Ahora, gracias al uso de estabilizantes adecuados, la cerveza se puede conservar por mucho tiempo, y de esta manera, se la puede producir independientemente del consumo. Asimismo, se han desarrollado líneas embotelladoras de alta capacidad, que permiten excluir el ingreso de aire a la cerveza, lo cual posibilita hoy en día el mantenimiento de la calidad por mucho más tiempo. En años recientes se han adquirido importantes conocimientos sobre el tema de la estabilidad del sabor, ya que hasta hace pocos años representaba un gran problema para la industria cervecera.

### 1.1.2.2.1. Fermentación alcohólica

La cerveza es una bebida que atraviesa un proceso de transformación, en el cual la glucosa y otros azúcares presentes en el mosto son descompuestos en moléculas de alcohol, dióxido de carbono y energía; este proceso es conocido como fermentación alcohólica y es producto de la acción de levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pastorianus*, entre otros.<sup>22</sup> La fermentación alcohólica es una reacción que permite degradar azúcares en alcohol y dióxido de carbono.<sup>23</sup> La ruta que siguen las levaduras para convertir los azúcares en alcohol es regulado por la glicolisis o ruta de Embden- Meyerhof para conseguir ácido pirúvico el cual será convertido en alcohol por acción de enzimas en un medio anaeróbico.

La conversión que se logra en la fermentación alcohólica se representa mediante las siguientes ecuaciones:



**Ecuación 1.2**

La ruta Embden-Meyerhof, explica el proceso de fermentación mediante una serie de secuencias metabólicas en la que se oxida la glucosa; durante la fermentación, la reacción de los ácidos gliceroaldehidofosforico y dioxiacetonfosfórico producen de manera simultánea ácido fosfoglicérico y ácido  $\alpha$ -glicerofosfórico, que seguidamente por hidratación es transformado en ácido pirúvico. El ácido pirúvico, por acción de la enzima carboxilasa se descompone en dióxido de carbono y acetaldehído, que por reducción da etanol (Figura 1.2).

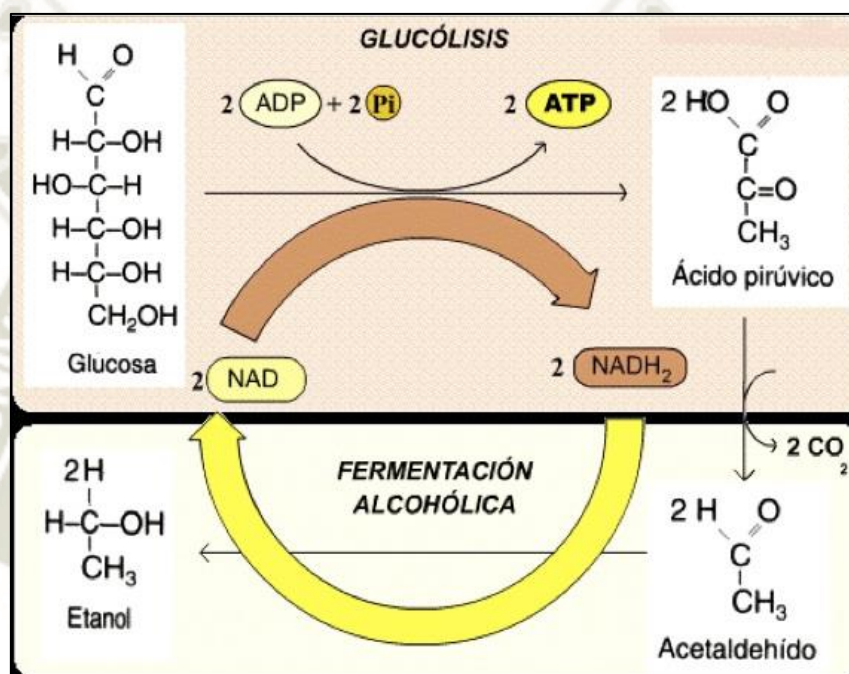


Figura 1.2. Fermentación alcohólica.<sup>24</sup>

En el proceso de fermentación se forman diversos productos por acción de la levadura sobre los azúcares, que finalmente pasan a la cerveza. Algunos de estos productos reaccionan entre sí o varían en cantidad y composición. Estos subproductos de fermentación tienen una repercusión decisiva sobre la calidad de la cerveza en formación. Por esto, los productos secundarios formados durante la fermentación pueden ser considerados de forma conjunta o tratados separadamente. En ambos casos, es necesario mantener su contenido dentro de un límite óptimo, mediante medidas tecnológicas apropiadas.<sup>12</sup>

Se consideran de forma separada la formación y la degradación de los siguientes subproductos de fermentación:

- a) diacetilo,
- b) alcoholes superiores,
- c) ésteres,
- d) aldehídos,
- e) compuestos de azufre.

La generación de aldehídos insaturados de cadenas más largas mediante la condensación aldólica de aldehídos, son los que contribuyen a la rancidez de la cerveza. Cabe la posibilidad de que en condiciones suaves o “ideales” durante el proceso de almacenamiento de la cerveza se produzca la condensación aldólica de compuestos carbonílicos de cadena corta que se forman en la etapa de cocimiento (elaboración del mosto).

Un ejemplo de este proceso es la formación de 2-alquenes tales como el trans-2-nonenal mediante la condensación de heptanal con acetaldehído en presencia de prolina.<sup>10</sup>

### 1.1.3. Estabilidad de la cerveza

La química de la cerveza durante la fase de almacenamiento es una gran preocupación, debido a que se busca controlar y mantener la estabilidad química y organoléptica del producto. La velocidad a las que ocurren las reacciones químicas durante el almacenamiento de la cerveza están determinadas tanto por factores externos (envasado, temperatura, y luz) y factores internos (contenido de oxígeno, pH, antioxidantes y contenido de precursores aromáticos).<sup>25</sup>

La vida de una cerveza depende de una serie de factores, siendo el tiempo que transcurre desde su envasado hasta el momento de ser consumida, el más importante;

ya que durante ese tiempo están comprometidos: la estabilidad del sabor, la turbidez y la microbiología.<sup>26</sup>

- a. Sabor: representa el mayor problema debido a que en la cerveza se produce la oxidación de compuestos como por ejemplo alcoholes, iso-ácidos y ácidos grasos, por lo tanto experimenta un deterioro desde el proceso de envasado. Gracias al oxígeno se producen compuestos carbonílicos tales como el 2-heptenal, 2-octenal y trans-2-nonenal que pueden ser detectados fácilmente por el consumidor (umbrales de sabor muy bajos). Es por eso, que lo que se busca en la cerveza envasada es tener un contenido de oxígeno bajo para obtener una mayor estabilidad del sabor.<sup>10</sup>
- b. Turbidez: una cerveza turbia visiblemente se reconoce por la pérdida de brillo, el descenso de la transparencia, el grado de enturbiamiento, inclusive la floculación, precipitación y sedimentación, son las sucesivas manifestaciones de la falta de estabilidad o inestabilidad de la cerveza. Las siguientes causas puede ser clave en la turbidez u opacidad de la cerveza: biológica, coloidal y química, ésta última debido a diversos agentes como el oxalato de calcio.<sup>27</sup>
- c. Microbiológica: La contaminación por microorganismos normalmente está sujeta a levaduras cerveceras y levaduras “salvajes”, ya que la mayoría de las bacterias no tienen la capacidad de crecer en la cerveza, debido a que no pueden tolerar el pH bajo, alcohol y/o la falta de oxígeno para su respiración normal.<sup>27</sup>

#### 1.1.4. La cerveza y la salud

Una de las mayores preocupaciones de los profesionales de la salud en torno a la inclusión de bebidas alcohólicas en la dieta es el posible riesgo que puede tener un aporte excesivo de calorías, o que tal vez pueda desplazar de la dieta a otros alimentos de gran poder nutricional.<sup>28</sup>

Es más, la primera impresión sobre la cerveza es que es una bebida que engorda, y no es cierto, con un aporte calórico de 45 Kcal/100 mL, y de 17 Kcal/100 mL en la cerveza sin alcohol, su contenido calórico es relativamente bajo.

Estudios científicos realizados por investigadores del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) han constatado que, tras la ingesta de forma moderada —una medida en caso de las mujeres y dos en el caso de los varones—, no se producía ninguna alteración en el peso.<sup>18</sup>

La cerveza posee muchas propiedades beneficiosas brindadas por sus materias primas.. Es una bebida diurética, rica en potasio y baja en sodio. Además contiene antioxidantes naturales .

#### **1.1.4.1. Propiedades funcionales**

Muchos de los componentes presentes en la cerveza resultan ser beneficiosos para la salud, siempre y cuando el consumo de la misma sea moderado.

Los folatos participan en la síntesis de proteínas, formación de la sangre y la transmisión de las características hereditarias. Por tal motivo, son de gran importancia para el mantenimiento de la vida celular y para el crecimiento y formación de nuevos tejidos; y su deficiencia puede originar diversas patologías. Además, previenen gran parte de los defectos del tubo neural en el nacimiento y reducen el nivel homocisteína, nuevo factor de riesgo de enfermedades cardiovasculares. La anemia es el trastorno más frecuente ocasionado por la carencia del ácido fólico.<sup>29</sup>

Los flavonoides como el xantumol ideal para la lucha y la prevención del cáncer, el cual inhibe la activación metabólica de procarcinógenos, induce la activación de enzimas anticancerígenas e inhibe el crecimiento del tumor en fases tempranas. Además, este flavonoide puede ser un efectivo agente antiinflamatorio, antiarteriosclerótico y antitrombótico.<sup>18</sup>

Por otra parte, contiene fibra soluble que evita el estreñimiento, disminuyendo así el cáncer de colon, la diverticulosis y la absorción de algún elemento. El contenido de fibra varía según el tipo de cerveza.

También, se encuentran maltodextrinas que proceden de la despolimerización del almidón por las amilasas del grano de cebada. Éstas tienen sus propiedades funcionales en el aporte de energía lo que ha promovido su aplicación en fórmulas de bebidas para deportistas. Las maltodextrinas pasan rápidamente a la sangre y producen una subida de concentración de glucosa rápida que inducen a la secreción de las hormonas que metabolizan ésta. Su efecto beneficioso radica en que éstas evitan hipoglucemias mientras se está realizando ejercicio físico.

Asimismo, los ácidos amargos procedentes del lúpulo, además de conferirle aroma a la cerveza, le otorga una acción sedante. Una de las propiedades del lúpulo (*Humus lupulus L.*) es que, tradicionalmente, funciona como planta tranquilizante, su actividad sedante está especialmente en sus ácidos amargos, en particular su componente ácido alfa: 2-Metil-3-buten-2-ol. El mecanismo de acción de la resina del lúpulo consiste en elevar los valores del neurotransmisor gamma-amino butírico (GABA), inhibidor del sistema nervioso central. Cabe indicar que entre estos ácidos amargos sólo los ácidos alfa son los que tienen mayor actividad sedante; aunque su proporción es más baja frente a los ácidos beta.<sup>18</sup>

## 1.2. Aldehídos

Los aldehídos son compuestos orgánicos que pertenecen al grupo de compuestos carbonilo; se caracterizan con un gran potencial de determinación del sabor e influencia en la estabilidad del sabor de la cerveza. Más de 200 compuestos carbonilos han sido establecidos en cerveza, de los cuales el acetaldehído tiene la mayor concentración. El contenido de acetaldehído varía significativamente y es aproximadamente el 60 % del contenido total de aldehídos. Los rangos normales para acetaldehído están entre 1 a 30 mg/L.<sup>30</sup> El acetaldehído es un potente compuesto volátil y saborizante que se encuentra en muchas bebidas y comidas. A niveles bajos, el acetaldehído brinda un agradable aroma afrutado, pero a concentraciones altas posee un fuerte olor irritante.<sup>31</sup>

Según el Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer, existe suficiente evidencia en animales para demostrar la capacidad carcinógena del acetaldehído y por lo tanto es posiblemente cancerígeno para el ser humano también (Grupo 2B).<sup>32</sup>

Se ha determinado que durante el tiempo de almacenamiento de la cerveza se incrementa la concentración de diversas clases de compuestos volátiles: compuestos carbonílicos, compuestos heterocíclicos, ésteres y compuestos azufrados.<sup>6</sup>

### 1.2.1. Información física y química del acetaldehído:

#### Nomenclatura

Nombre sistemático IUPAC: Acetaldehído

Sinónimos: Aldehído acético, etanal

#### Fórmula molecular y peso molecular:

$C_2H_4O$

P.M.: 44.05

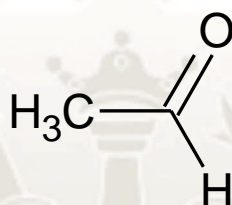


Figura 1.3. Fórmula química del acetaldehído

Tabla 1.1. Propiedades fisicoquímicas del acetaldehído

Propiedades del acetaldehído	
<b>Descripción</b>	Líquido incoloro o gas con un fuerte olor característico.
<b>Punto de ebullición</b>	20.2 °C
<b>Punto de fusión</b>	-123 °C
<b>Solubilidad</b>	Miscible con agua, benceno, éter etílico y etanol.
<b>Reactividad</b>	Inflamable, polimeriza violentamente en la presencia de cantidades traza de metales o ácidos; puede reaccionar violentamente con anhídridos de ácido, alcoholes, cetonas, fenoles, amoniac, ácido cianhídrico, sulfuro de hidrogeno, halógenos, fósforo, bases fuertes y aminas.

### **1.2.2. Producción y uso:**

La capacidad de producción del acetaldehído en Estados Unidos en 1989 fue de 443000 toneladas. La información disponible en 1995 indicó que fue producido en 16 países.

El acetaldehído es usado como un intermediario en la producción de ácido acético, anhídrido acético, acetato de celulosa, resinas de acetato de vinilo, ésteres de acetato, pentaeritritol, derivados de piridina sintéticos, ácido tereftálico y ácido per acético. Los derivados de piridina sintéticos, el ácido per acético, los ésteres de acetato y el pentaeritritol representan el 40% de la demanda de acetaldehído.

Otros usos del acetaldehído incluyen: plateado de espejos, curtido del cuero, como desnaturalizante para el alcohol, en mezclas de combustible, como endurecedor para fibras de gelatina, también es usado en productos de cola y caseína, como conservante para pescado y fruta, en la industria papelera, como un agente aromatizante sintético, y en la fabricación de cosméticos, tintes de anilina, plásticos y caucho sintético.<sup>33</sup>

### **1.2.3. Incidencia**

#### **1.2.3.1. Exposición ocupacional:**

De acuerdo a la Encuesta Nacional de Exposición Ocupacional (NOES, 1997), aproximadamente 220000 trabajadores en Estados Unidos estuvieron potencialmente expuestos a acetaldehído. La exposición ocupacional al acetaldehído puede darse en su producción, en la producción de ácido acético, esterres acetato y otros químicos.

#### **1.2.3.2. Incidencia ambiental:**

Los aldehídos son importantes contaminantes de agua; son producidos durante el metabolismo del etanol y representan subproductos estables en la atmósfera. También están presentes como contaminantes en bebidas y etanol combustible.<sup>34</sup> El acetaldehído es un producto natural de combustión y fotoxidación de hidrocarburos comúnmente encontrados en la atmosfera.

Es un químico industrial importante y puede ser liberado en el aire o en aguas residuales durante su producción y uso. Ha sido detectado en pequeños niveles en agua potable, aguas superficiales, agua de lluvia, efluentes, gases de escape y ambiente, así como en muestras de aire interior.

El acetaldehído es un producto intermedio en el metabolismo del etanol y azúcares, y por lo tanto se encuentra en cantidades traza en la sangre humana. Está presente en pequeñas cantidades en bebidas alcohólicas, como cerveza, vino, bebidas espirituosas, jugos de plantas y aceites esenciales, café tostado y humo de tabaco.<sup>33</sup>

#### 1.2.4. Reacciones con Aldehídos

Generalmente, los aldehídos se preparan en laboratorio por la oxidación de alcoholes primarios o por la reducción parcial de ésteres.<sup>35</sup>

A continuación, se mencionará algunas de las reacciones más importantes de los aldehídos:

- Oxidación: La reacción de un aldehído con un agente oxidante genera un ácido carboxílico. Se utilizan normalmente  $\text{KMnO}_4$ ,  $\text{HNO}_3$  caliente y  $\text{CrO}_3$  en ácido acuoso.<sup>35</sup>
- Formación de alcoholes: Los aldehídos son reducidos por  $\text{LiAlH}_4$  para formar alcoholes primarios. Y al reaccionar los reactivos de Grignard con los aldehídos se forman alcoholes secundarios.<sup>36</sup>
- Los aldehídos y las aminas primarias reaccionan y producen iminas; mientras que al adicionar aminas secundarias a los aldehídos se produce enaminas.<sup>35</sup>
- Al reaccionar el aldehído con hidrazina en medio ácido se forma el compuesto hidrazona.
- Los aldehídos y el agua forman hidratos o también llamados gem-dioles.
- Los alcoholes son adicionados a los aldehídos para generar acetales, que sirven como grupos protectores de grupos funcionales aldehído.<sup>36</sup>

### 1.3. Voltamperometría

Esta técnica electroquímica tuvo su origen con la polarografía, esta última fue inventada por J. Heyrovsky in Czechoslovakia in 1922.<sup>37</sup>

Además, es considerada como una subclase de la voltamperometría que emplea un electrodo de gota de mercurio con una superficie renovable y gran rango de potencial catódico, principalmente utilizado para la determinación de especies reducibles.<sup>38</sup>

Asimismo, se basa en curvas de voltaje-corriente como resultado de la electroización de sustancias electrooxidables o electroreducibles en una celda, el electrodo consiste en la caída de mercurio en pequeñas gotas a través de un tubo capilar fino. Este método está adaptado para usar muy poca cantidad de solución y muy bajas concentraciones de los elementos a medir.<sup>39</sup> En general, estos métodos polarográficos muestran varios inconvenientes, entre los que se encuentran la alta toxicidad del mercurio tanto para el usuario como para el medio ambiente. A pesar de su mayor sensibilidad, el análisis de un gran número de muestras produce grandes cantidades de desechos, que en la era de la "química verde" se acepta cada vez menos y, por lo tanto, es más importante considerarlo de forma crítica.<sup>40</sup>

Los métodos voltamperométricos ganaron un renovado interés en la década de 1980 con la llegada de la aplicación de la voltamperometría anódica de stripping en el análisis de iones de metales traza.

Recientemente, con la aparición de instrumentos nuevos y más versátiles en el mercado, la voltamperometría ha ido recuperando parte de su popularidad perdida, y se ha citado la posibilidad de su aplicación en el análisis de algunos componentes de la cerveza.<sup>41</sup>

Esto se debe a que es considerado un método de análisis electroquímico de importancia por su alta sensibilidad, simplicidad, buena estabilidad, con instrumentación de bajo costo y portátil, además de una baja interferencia por parte de sustancias no electroactivas.

Existen 3 tipos de voltamperometría empleadas como excelentes herramientas analíticas para caracterizar e investigar el comportamiento electroquímico de una gran diversidad de compuestos.<sup>42</sup>

En voltamperometría, un potencial dependiente del tiempo es aplicado a una celda electroquímica, y el flujo de corriente a través de la celda es medido como una función de ese potencial.

Un gráfico de la corriente en función del potencial aplicado se denomina voltamograma y es el equivalente electroquímico a un espectro en Espectroscopía, proporcionando información cuantitativa y cualitativa sobre las especies involucradas en la reacción de oxidación o reducción.<sup>43</sup>

### 1.3.1. Instrumentación de la voltamperometría

La voltamperometría, como técnica analítica, cuenta con una serie de elementos para su desarrollo. El equipo de voltamperometría, llamado voltámetro, está compuesto por:

- a. **Celda de trabajo:** La celda presenta cinco orificios, tres de ellos para colocar los electrodos, uno por donde se puede introducir gas inerte, de requerirse, y el otro por donde se coloca el electrólito y la muestra que se va a analizar. La mayoría de los equipos usan una celda con tres electrodos: el de trabajo, el electrodo de referencia y el contraelectrodo o electrodo auxiliar; éste sistema permite minimizar errores de voltaje debido a caídas óhmicas a través de la solución.<sup>44</sup>
- b. **Electrodos:** Como se mencionó en la celda de trabajo, se utilizan tres electrodos:
  - Electrodo de trabajo: que es donde tiene lugar las reacciones de interés y está construido con mercurio, oro, platino o carbón vitrificado de ser el caso
  - Electrodo de referencia: que tiene un potencial conocido, los más usados son el de calomel saturado (SCE) o de Ag/AgCl.
  - Electrodo auxiliar o contraelectrodo: que generalmente es de platino, carbón vítreo u otro material inerte.

El potencial del electrodo de trabajo es medido versus el electrodo de referencia. La corriente fluye entre el electrodo de trabajo y el electrodo auxiliar.<sup>44</sup>

- c. **Potenciostato:** Los terminales de los tres electrodos utilizados son conectados a un potenciostato, el cual es un instrumento que controla el potencial del electrodo de trabajo y mide la corriente resultante. El potenciostato aplica una rampa lineal de potencial al electrodo de trabajo gradualmente y luego invierte el sentido retornando a su posición inicial.<sup>44</sup>
- d. **Electrolito:** Es una solución que se añade para evitar corrientes de migración debido al movimiento de las partículas cargadas en el campo eléctrico, y asegurar la conductividad.

Los electrólitos más usados en electroquímica son las sales de tetraalquilamonios debido a su conveniente solubilidad en solventes orgánicos, para soluciones acuosas hay mayor variedad de soluciones usadas, por ejemplo soluciones tampón obtenidas a partir de un ácido débil y su base conjugada (fosfato, borato, acetato) que nos permitan tener un pH fijo.<sup>44</sup>

### 1.3.2. Tipos de Voltamperometría

Se pueden distinguir las diversas técnicas voltamperométricas por la diferente forma de variación del potencial aplicado. Asimismo, se ha realizado investigaciones constantes referentes al tipo de modulación de la forma del potencial, para poder alcanzar límites de detección cada vez menores.<sup>45</sup>

A continuación, se describen tres de las técnicas de pulsos más importantes: la polarografía de pulso diferencial, polarografía de onda cuadrada y voltamperometría cíclica.

Éstas se han aplicado con electrodos que no son de gotas de mercurio necesariamente, en cuyo caso los procedimientos se llaman voltamperometría diferencial y de onda cuadrada, respectivamente.<sup>46</sup>

### 1.3.2.1. Voltamperometría de pulso diferencial

Esta técnica electroquímica alcanzó gran importancia y popularidad a partir de los 70's.<sup>37</sup>

Es muy empleada para medir o determinar niveles traza de especies orgánicas e inorgánicas, con gran sensibilidad y resolución, capaz de proveer información sobre las formas químicas en las que puede aparecer el analito, ya sea estados de oxidación, complejación, etc.<sup>38</sup>

Este tipo de voltamperometría también puede basarse en electrodos de grafito o carbón.<sup>42</sup>

Consiste en una serie de impulsos que simulan una escalera formando así la onda en la señal de excitación; en este punto el potencial de base comienza a aumentar gradualmente en intervalos pequeños entre 10 y 100 mV (ancho de pulso =  $\Delta E_s$ ).

La amplitud de pulso ( $\Delta E_p$ ) se mantiene constante con respecto al potencial de base (Figura 1.4).

La corriente resultante de todo el proceso se mide justo antes de la aplicación del primer pulso y al final de la aplicación del mismo, así al graficar la diferencia de corrientes (1-2) en función del potencial aplicado, se generan respuestas en forma de picos (voltamogramas), donde la intensidad máxima de corriente (altura del pico) es directamente proporcional a la concentración de especies reactantes.<sup>37</sup>

### 1.3.2.2. Voltamperometría de onda cuadrada

Ésta es una técnica de gran amplitud diferencial compuesta de una onda cuadrada simétrica, superpuesta en un potencial de base en forma de escalera que es aplicado al electrodo de trabajo.<sup>38</sup>

Se emplea para electrodeposición en laboratorio y para desglosar procesos durante la deposición.

Fundamentalmente, es usada como técnica de Química Electroanalítica y consiste en un avance de potencial-tiempo mediante escalones. Los escalones son de un cierto ancho en mV y alto en mV.



durante los últimos milisegundos de la vida de una gota, cuando la corriente de carga es prácticamente constante.

Este método voltamperométrico emplea electrodos de mercurio, carbón y de diamante.<sup>42</sup> La voltamperometría de onda cuadrada también se ha usado con electrodos de gota colgante de mercurio y en detectores para cromatografía líquida.<sup>46</sup>

### 1.3.2.3. Voltamperometría cíclica

Es considerado un método electroquímico versátil para el estudio de especies electroactivas en áreas como la química inorgánica, orgánica, bioquímica, entre otros. También, es conocido como “espectroscopía electroquímica” debido a sus voltamogramas característicos que dan información inequívoca de los sistemas redox.<sup>44</sup>

La voltamperometría cíclica consiste en explorar linealmente el potencial de un electrodo de trabajo estacionario (en una solución no agitada), utilizando un potencial triangular en forma de onda (Figura 1.6). Dependiendo de la información buscada, los ciclos utilizados pueden ser individuales o múltiples. Durante el barrido potencial, el potenciostato mide la corriente resultante del potencial aplicado. El gráfico resultante de potencial actual se denomina voltamograma cíclico. El voltamograma cíclico es una función complicada y dependiente del tiempo de una gran cantidad de parámetros físicos y químicos.<sup>38</sup> Este método puede utilizar electrodos de oro o carbón.<sup>42</sup>

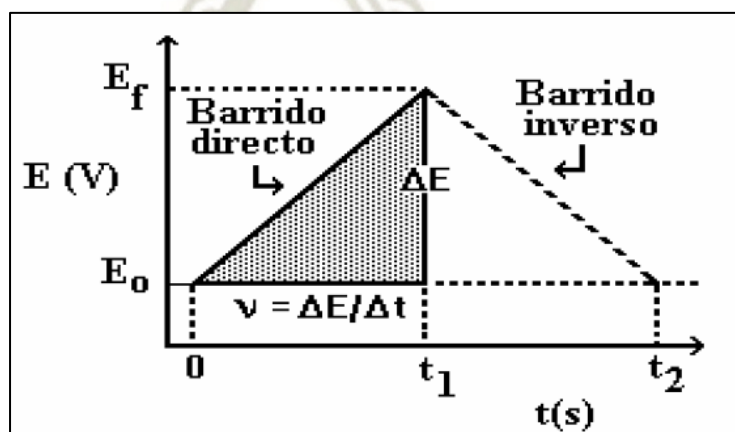


Figura 1.6. Señal de excitación en voltamperometría cíclica.<sup>37</sup>

#### 1.4. Validación de métodos analíticos

En el proceso de validación se definen requisitos analíticos, que aseguran que el método de ensayo bajo ciertas consideraciones ha desarrollado capacidades consistentes con la aplicación requerida. Es un proceso de comprobación que indica si el método es adecuado para su uso. La validación establece, mediante estudios sistemáticos de laboratorio, que las características técnicas de dicho método cumplen las especificaciones relativas al uso previsto de los resultados analíticos.<sup>49</sup> Según la FAO, validación es el proceso para establecer las características de funcionamiento y limitaciones del método y la identificación de influencias que pueden cambiar estas características y hasta qué punto; cuando el método se desarrolla sin un problema particular previsto. Además, indica que es el proceso para verificar que un método es apto para ese propósito, es decir, para usarlo para resolver un problema analítico particular; cuando el método se desarrolla con un fin específico. El fin de la validación es probar la aptitud de los métodos, así como la capacidad del personal y el laboratorio.<sup>50</sup>

Otros, especifican la validación como un paso fundamental para asegurar que los resultados entregados por dicho método son confiables. Cuando se realiza la validación de un método por parte del laboratorio, lo que se busca es poder determinar con fundamento estadístico que el método es adecuado para los fines previstos.

La validación puede ser de tres tipos: validación retrospectiva, validación prospectiva y verificación (validación menor). Una **Validación Retrospectiva**, se puede realizar cuando se trata de un método empleado tradicionalmente por el laboratorio que no esté normalizado, es decir, en base a los datos experimentales que el laboratorio dispone, para la cual se realizará la recopilación de la mayor cantidad de datos históricos disponibles, para luego realizar un proceso de ordenamiento y selección de los datos recopilados, los cuales pueden ser: curvas de calibración, resultados de ensayos, cartas de control, ensayos de aptitud, etc. A través de estos, se deberán determinar los parámetros de validación, y evaluar si los resultados obtenidos para los fines de la misma son aceptables. En caso de ser un método nuevo (o uno antiguo del que no se dispongan de datos suficientes) se debe realizar una **Validación Prospectiva**,

generando datos experimentales a través de un análisis. En algunos casos se puede realizar una **verificación** cuando se trate de: métodos normalizados, métodos normalizados usados fuera de su alcance propuesto (uso en otra matriz), ampliaciones y modificaciones menores de métodos normalizados (uso en otros analitos), cuando se trate de métodos previamente validados, que haya sufrido alguna alteración significativa por lo cual deben volver a evaluarse. Estas variaciones pueden ser; cambio de equipo, cambio de componentes de equipo como columnas, detectores, cambio analista, cambio de la matriz que contiene la muestra o de nivel de concentración del analito de interés, entre otros.<sup>51</sup>

Por su parte la OAA, puntualiza que la validación es una confirmación, mediante el examen y el aporte de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto.<sup>52</sup> Asimismo, J. M. Jurado,<sup>53</sup> menciona que un método analítico es un procedimiento que obtiene unos resultados a partir del análisis químico de muestras. Antes de ser usado, es necesario comprobar que dicho método cumple unos determinados requisitos que dependerán de la aplicación que se le quiere dar. Este proceso de verificación se conoce como validación y debe establecer las características de funcionamiento y las limitaciones del método, así como la identificar las influencias que pueden cambiar dichas características.

#### 1.4.1. Parámetros de evaluación.

Según INACAL (Instituto Nacional de Calidad), encargado de la acreditación en el Perú, los estudios de validación deben tener la determinación de los siguientes parámetros (dependiendo de la naturaleza del método a validar): veracidad, exactitud, precisión, rango, linealidad, límite de detección y cuantificación, incertidumbre, sensibilidad y robustez.

- a. **Veracidad:** Indica el grado de concordancia entre el *valor medio obtenido* de una serie de mediciones y el valor de referencia. Está expresado como sesgo. Para la evaluación de este parámetro se realiza el análisis de un material de referencia certificado, de preferencia con una matriz semejante a la de la muestra. Solamente en el caso de que no exista un material adecuado se puede realizar un ensayo de recuperación.

Cuando sea posible, se realizan un mínimo de diez repeticiones del ensayo tres días consecutivos. Se compara el promedio de los valores obtenidos ( $X$ ) con el valor de referencia certificado (MRC), teniendo en cuenta la incertidumbre asociada a ese material.<sup>50</sup>

La veracidad, en términos sencillos, puede ser determinada por recuperación que va a permitir ver el rendimiento de un método analítico en cuanto al proceso de extracción y la cantidad del analito existente en la muestra original. Por lo cual, la recuperación está intrínsecamente relacionada a las características de la matriz de la muestra. Se recomienda realizar por lo menos 6 mediciones de cada uno en lo posible en tres niveles.

El rango de la curva de calibración del método, el LOD y el LMP establecido deben ser considerados al elegir estos niveles. De tal manera que los niveles seleccionados permitan entregar la mejor información posible respecto a la capacidad de recuperación del método, en cuanto a estos valores críticos.

- b. Exactitud:** Indica la relación entre el resultado de ensayo y el valor de referencia. Se obtiene determinando la veracidad y la precisión.<sup>50</sup> Como se trata de un parámetro cualitativo (un método será muy o poco exacto) para describir el error asociado a un resultado, hace falta un parámetro que permita medir la exactitud cuantitativamente. Generalmente se expresa en términos de error o bias, definido como la diferencia entre el resultado de medida y el valor real.<sup>53</sup> De igual manera, este término, esta aplicado a un conjunto de resultados de un ensayo, y supone una combinación de componentes aleatorios y un componente común de error sistemático o sesgo.<sup>51</sup>
- c. Precisión (repetibilidad y reproducibilidad):** Es la proximidad entre resultados de análisis independientes obtenidos bajo condiciones ya concertadas. La repetibilidad se determina de manera interna de modo que deben existir suficientes resultados y todos los pasos del método se realicen n-veces. Es conocida, así mismo, como la precisión obtenida

aplicando un mismo procedimiento, sobre una misma muestra, con el mismo analista, en intervalos cortos de tiempo, utilizando el mismo equipo, dentro de un mismo laboratorio.<sup>52</sup> La reproducibilidad se define como la desviación estándar obtenida al analizar varias veces la muestra en días distintos, pudiendo variar condiciones tales como el equipo, reactivos o analistas.<sup>53</sup> La reproducibilidad es posible por intercomparación o cuando se cuenta con distintos analistas, distintos equipos, distintos laboratorios, etc.<sup>50</sup>

**d. Rango (intervalo de trabajo):** es el intervalo de concentraciones del analito dentro del cual se puede considerar al método validado.<sup>52</sup>

**e. Linealidad:** es la capacidad de un método de análisis, dentro de un determinado intervalo, de dar una respuesta o resultados instrumentales que sean proporcionales a la cantidad del analito que se habrá de determinar en la muestra de laboratorio. Con el fin de determinar el **rango lineal** se puede realizar mediante un gráfico de concentración versus respuesta, que se conoce como **Función Respuesta** (normalmente llamada recta de calibrado).

La linealidad se establece cada día con una cierta cantidad de valores formados por un blanco y los patrones de trabajos limpios de valor teórico conocido, que cubran el intervalo de trabajo. En este sentido se recomienda abarcar valores desde cercano al cero y valores superiores al LMP o al valor de interés.

El número de puntos a analizar deberá ser establecido por el analista (en general, se utiliza un mínimo de 4 valores).<sup>51</sup> A veces se examina a partir del coeficiente de determinación, considerando lineal el calibrado si  $R^2 > 0.999$ .<sup>53</sup> Otros indican que este coeficiente, preferentemente, debe ser mayor o igual que 0.995 (aunque puede encontrarse entre 0.980 y 0.990 según el método analítico).<sup>50</sup>

**f. Límite de detección (LOD):** es la concentración más baja de analito que se puede detectar y distinguir confiablemente de cero (o el nivel de ruido del sistema), pero no necesariamente puede ser cuantificada; la

concentración a la que un valor medido es mayor que la incertidumbre asociada con él.<sup>54</sup>

- g. Límite de cuantificación (LOQ):** es la menor concentración de analito que puede ser cuantificada con un aceptable nivel de incertidumbre. Se determina como la concentración de analito para la cual la desviación estándar relativa del método (RSD%) es del 10 %. Si se utilizan blancos, el Límite de Cuantificación se calcula de la siguiente forma:  $L_{OQ}=10.S_0$ , donde  $S_0$  es la desviación estándar de un blanco.<sup>52</sup>
- h. Incertidumbre:** Es un parámetro de identificación central e imprescindible para preparar una acreditación según la Norma ISO 17025. Incluye los errores sistemáticos y aleatorios.<sup>50</sup>
- i. Sensibilidad:** La sensibilidad es el cociente entre el cambio en la indicación de un sistema de medición y el cambio correspondiente en el valor de la cantidad objeto de la medición. En una regresión lineal la sensibilidad corresponde a la pendiente (m) de la recta de calibración.<sup>51</sup>
- j. Robustez:** es la capacidad de un método para mantenerse sin cambios ante pequeñas pero deliberadas variaciones en los parámetros del método, que provee una indicación de su confiabilidad durante el uso normal.<sup>52</sup>

Es la inercia que presenta un método analítico a modificar su señal cuando tienen lugar pequeños cambios en las condiciones ambientales u operativas, que se consideran las variables que gobiernan el experimento de medida. Para el estudio de robustez, estas condiciones se modifican ligeramente, siguiendo un determinado diseño experimental, y se comprueba su influencia en la señal analítica. Con ello, se puede concluir qué variables son más significativas a la hora de realizar las medidas y por tanto, deben ser mejor controladas.<sup>53</sup>

## CAPÍTULO II

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 2.1. Muestra

Se utilizó una marca de cerveza Lager comercial de envase vidrio ámbar, producida a escala industrial. Las muestras de cerveza se emplearon para verificar el método voltamperométrico establecido, así se usaron cervezas con diferentes fechas de producción: cerveza fresca (cerveza 1) (LAR 02 05:50 V14AGO18); cerveza de 6 meses (cerveza 2) (LAR 02 09:14 V16FEB18) y cerveza de 16 meses (cerveza 3) (LAR 02 08:33 V09ABR17).

#### 2.2. Lugar de Experimentación

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo durante los meses de setiembre a febrero del 2018, en las instalaciones de la Universidad Católica de Santa María, Laboratorio de Investigación “Proyecto Mercurio”, pabellón H 202.

#### 2.3. Materiales, reactivos y equipos

##### 2.3.1. Materiales

- Fiolas de 5, 10, 1000 mL
- Vaso de precipitado
- Micropipetas
- Tips descartables para micropipetas
- Gradilla
- Termómetro
- Pipetas volumétricas

- Balón, matraz y equipo esmerilado para destilación

### 2.3.2. Reactivos

- Sulfato de Hidrazina, GR for analysis ACS Reag., Merck.
- Acetaldehído, ReagentPlus,  $\geq 99.0$  % GC, Fluka Analytical.
- Hidróxido de Sodio en lentejas, puro, Merck.
- Ácido acético glacial 99.8 %, Merck.
- Estándar de Pb(II) 1000 mg/L CertiPUR, Merck.

### 2.3.3. Electrodo

- Electrodo de trabajo HMDE
- Electrodo de referencia Ag/AgCl (KCl 3.0 mol/ L)
- Electrodo auxiliar de platino

### 2.3.4. Soluciones

- Agua ultrapura
- Electrolito de soporte, Buffer acetato de sodio pH 5
- Solución de KCl 3.0 mol/L

### 2.3.5. Equipos

- Purificador de agua Millipore, Simplicity UV
- pHmetro 827 pH lab, MetrOhm
- Stirring Hot plate, Thermo Scientific
- Balanza analítica, Sartorius
- Estación Voltamperométrica MetrOhm VA 797 Computrace

### 2.3.6. Programas

- Statgraphics Centurión XVII
- Microsoft Excel 2010
- ChemSketch 11.0

## 2.4. Metodología: Técnicas e Instrumentos

La metodología del presente trabajo constó de distintas etapas a realizar, tal y como se muestra en la Figura 2.1.

Los métodos principales son la validación y el análisis voltamperométrico.

El análisis estadístico no se muestra como un método sólo, ya que se realiza para la validación voltamperométrica y el análisis voltamperométrico, por lo tanto se realizó análisis estadístico para todos los procesos.

### 2.4.1. Validación Voltamperométrica

#### 2.4.1.1. Validación Electrónica

Previo al método de cuantificación, se realizó una verificación electrónica del equipo, la cual sirve para su verificación y correcta operatividad.

##### 2.4.1.1.1. Test de Linealidad

Este test se hizo uniendo la celda electroquímica a la estación Voltamperométrica 797 VA, para lo cual se realizaron los siguientes pasos: se conectó el cable del electrodo auxiliar AE con el conector AE, seguidamente se unió el cable del electrodo de referencia RE con el conector RE y luego el cable del electrodo de trabajo WE con el conector WE-L. Finalmente se cargó e inició el método “Test 797\_L”, quedando como registro de esta validación, una línea diagonal.

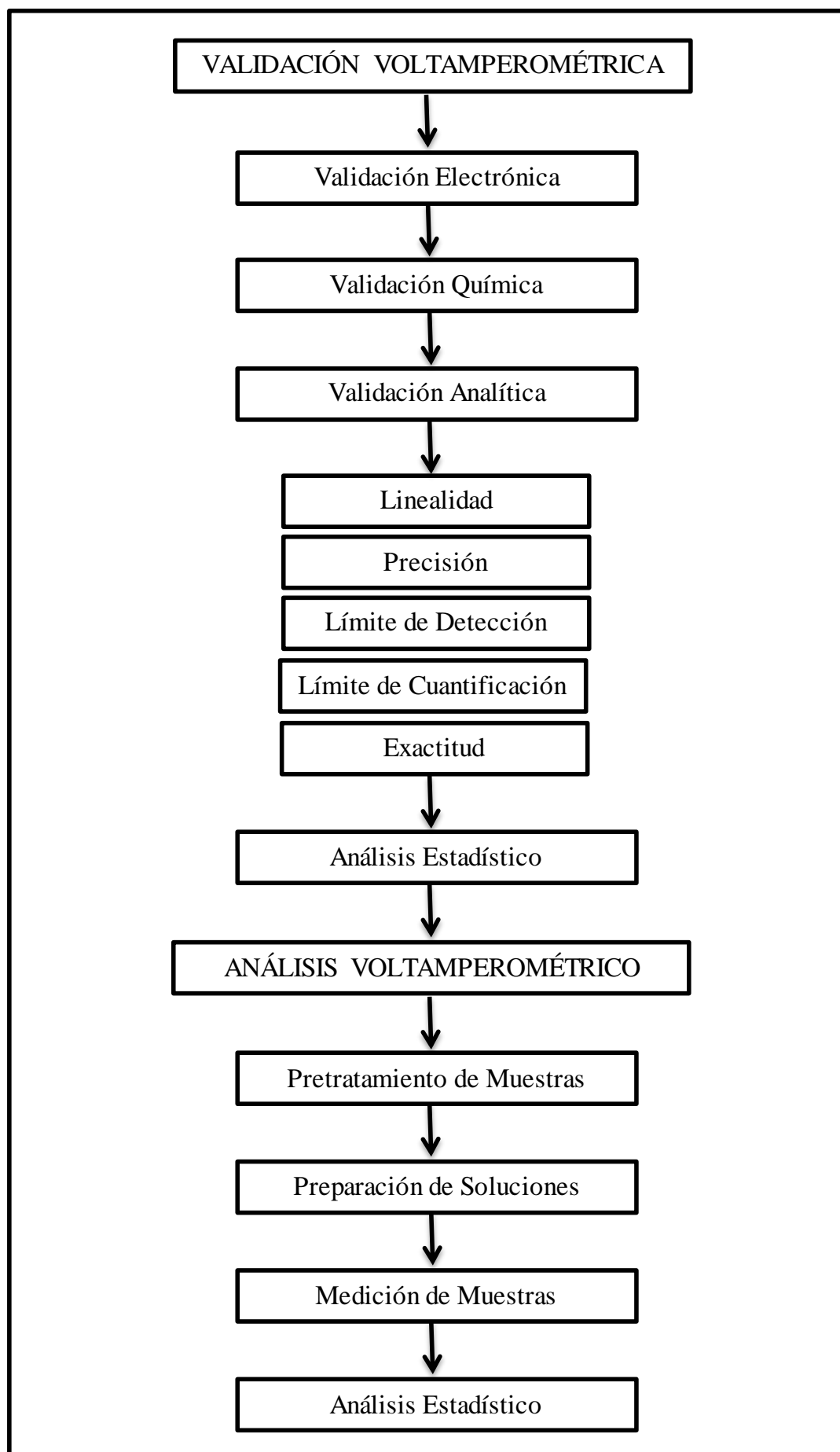


Figura 2.1. Esquema de la metodología de trabajo.

#### 2.4.1.1.2. Test de Desempeño de Pico

Este test se hizo uniendo la celda electroquímica a la estación Voltamperométrica 797 VA, para lo cual se realizaron los siguientes pasos: se conectó el cable del electrodo auxiliar AE con el conector AE, seguidamente se unió el cable del electrodo de referencia RE con el conector RE y luego el cable del electrodo de trabajo WE con el conector WE-D. Finalmente se cargó e inició el método “Test 797\_D”, quedando como registro de esta validación, la formación de una curva de Gauss.

#### 2.4.1.2. Validación Química

Para la validación química se utilizó Estándar Iónico de Plomo. En la celda electroquímica se colocó 10 mL de agua ultrapura, 500  $\mu\text{L}$  de KCl 3 mol/L, 100  $\mu\text{L}$  de estándar iónico Pb (II) 1000 mg/L.

Se cargó e inició el método “Test Pb in standard solution”, en modo DME. Se registraron la curva de Pb y las curvas de adición estándar.

##### 2.4.1.2.1. Validación Analítica

En el presente trabajo se validó un método voltamperométrico para la determinación de Acetaldehídos en muestras de cerveza en la región Arequipa. Para el método se utilizó estándares de Acetaldehído y la unidad voltamperométrica 797 VA Computrace (Figura 2.2).

En la celda electroquímica se colocó 10 mL de buffer Acetato 0.1 M pH 5 y 500  $\mu\text{L}$  de una solución acuosa de Sulfato de Hidrazina preparada fresca cada día. Después de los 5 minutos de tiempo de purga, se adicionó 100  $\mu\text{L}$  de solución acuosa recién preparada de acetaldehído. Se esperó 8 minutos y se corrió el estándar.

Seguidamente se añadió la primera adición estándar, se presionó “Hold” en el equipo y se esperó 8 minutos. Se volvió a hacer lo mismo para las siguientes adiciones estándar. Los voltamogramas de onda cuadrada fueron registrados después de 8 minutos de reacción.



**Figura 2.2. Estación voltamétrica 797 VA Computrace**

La validación se hizo según la AOAC, la cual presenta parámetros idóneos para el proceso de validación analítica. Para la misma, se evaluaron los siguientes parámetros:

**a) Linealidad:**

Representa la capacidad del método para aportar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra, dentro de un rango establecido.<sup>55</sup>

Por lo tanto, se construyó una gráfica de concentración–respuesta, para la evaluación de la linealidad; siendo la concentración dependiente del método. La relación matemática que existe entre ambas variables fue representada por la recta de regresión lineal:<sup>56</sup>

$$y = a + bx \quad \text{Ecuación 2.1}$$

Se trabajó con las siguientes concentraciones de acetaldehído: 0.472, 0.935, 1.389, 1.835, 2.273, 2.703, 3.125 mg/L y se analizaron por triplicado.

**b) Precisión:**

La precisión de un método analítico es obtenida por análisis múltiples de una muestra homogénea.<sup>57</sup> Indica la variabilidad existente entre los diferentes resultados, sin considerar su proximidad al valor real.

- **Precisión de Repetibilidad:** La repetibilidad es el grado de concordancia de los resultados, cuando las condiciones se mantienen lo más constantes posibles.<sup>58</sup>

El ensayo de repetibilidad consistió en realizar mediciones repetidas a una misma muestra en las mismas condiciones operativas, un mismo día, un mismo laboratorio.

- **Precisión Intermedia:** La precisión determinada a partir de ensayos repetidos realizados en un solo laboratorio, no simultáneamente, es decir, en días diferentes, con diferentes instrumentos, por diferentes analistas, etc., se denomina precisión intermedia.<sup>59</sup> Para la validación se hicieron ensayos variando factores como día de ensayo, reactivo y analista.

Los coeficientes de variación se determinaron a partir de las desviaciones estándar y los promedios de las lecturas obtenidas en las curvas de calibración del acetaldehído.

Se realizaron 4 lecturas trabajando con una concentración de solución estándar de Acetaldehído 0.472 mg/L, con 6 adiciones de estándar. Generalmente, la precisión de un método se expresa como el coeficiente de variación (CV) de una serie de medidas. Se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$CV (\%) = \frac{S}{X} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 2.2}$$

Donde:

**s:** Desviación estándar

**x:** Promedio

**c) Límite de Detección:**

Se entiende por límite de detección a la mínima cantidad de analito en la muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cumple con precisión y exactitud. El límite de detección confirma que la cantidad de analito se encuentra por encima o por debajo de un cierto nivel.

Los gráficos de calibración fueron utilizados para determinar el límite de detección, sustituyendo los valores en la siguiente fórmula:

$$LOD = \frac{Y_{bl} + 3S_{bl}}{b} \times \frac{1}{\sqrt{n}} \quad \text{Ecuación 2.3}$$

**d) Límite de Cuantificación:**

El límite de cuantificación representa la mínima cantidad de analito presente en la muestra, que se puede cuantificar con una adecuada precisión y exactitud. Al igual que para el límite de detección, el límite de cuantificación se determinó a partir de los gráficos de calibración, utilizando los valores correspondientes a la gráfica, se calculó con la siguiente ecuación:

$$LOQ = \frac{Y_{bl} + 10S_{bl}}{b} \times \frac{1}{\sqrt{n}} \quad \text{Ecuación 2.4}$$

Donde:

$Y_{bl}$ : Intercepto de la recta de calibración

$S_{bl}$ : Intercepto de la recta de concentración vs desviación estándar

$b$ : Pendiente de la recta de calibración

$n$ : Número de muestras o repeticiones

**e) Exactitud:**

La exactitud de un método evalúa la proximidad del resultado experimental encontrado al valor que es aceptado como verdadero. Para su desarrollo, se determinó el porcentaje de recuperación en la valoración de una cantidad conocida de analito añadida sobre la muestra.

Para hallar el porcentaje de recuperación se tomaron tres grupos y se realizaron tres análisis por cada grupo, los cuales contenían:

1° grupo: 10 mL de muestra de cerveza + 10 mL de agua ultrapura.

2° grupo: 20 mL agua ultrapura + 0.017 mL de solución patrón de Acetaldehído 50 mg/L + 0.5 mL alcohol puro.

3° grupo: 10 mL de agua ultrapura + 10 mL de cerveza + 0.017 mL de solución patrón de Acetaldehído 50 mg/L.

Cada grupo fue previamente destilado para luego realizar las lecturas en el voltamperómetro. Para el cálculo se utilizó la fórmula de porcentaje de recuperación:

$$\% R = \frac{(M+Std)-M}{Std} \times 100 \quad \text{Ecuación 2.5}$$

Donde:

**M:** concentración del analito en la muestra

**Std:** cantidad de estándar adicionado a la muestra

**2.4.2. Análisis voltamperométrico**

Para el análisis voltamperométrico se utilizó la unidad voltamperométrica 797 VA, en el modo HMDE (este método nos permite eliminar interferentes que pudieran permanecer en el electrodo; la gota de mercurio usada se renueva en cada medición), controlado por una PC equipada con el software Computrace para

Windows. El sistema potenciostático de tres electrodos se completó con un electrodo auxiliar de Platino y un electrodo de referencia Ag/AgCl (KCl 3 mol/L).

#### 2.4.2.1. Pretratamiento de Muestras

Las muestras de cerveza comercial tipo Lager se conservaron a temperatura entre 18 a 20 °C en diferentes tiempos: (A) cerveza fresca, (B) cerveza con 6 meses desde su producción y (C) cerveza con 16 meses de almacenamiento.

Se utilizaron tres cervezas de una misma marca para usar nuestro método analítico. El tratamiento previo que recibieron éstas muestras para eliminar interferentes, se basó en la metodología de *Guido, L et al.*<sup>60</sup> que empleaba la destilación.

De cada cerveza carbonatada, se tomaron 10 mL y junto con 10 mL de agua ultrapura se destiló hasta recolectar 10 mL de muestra destilada, empleando un equipo de destilación como se muestra en la Figura 2.3. Finalmente, se congelaron hasta su uso en los análisis posteriores.



Figura 2.3. Equipo de destilación.

#### 2.4.2.2. Preparación de Soluciones

Los reactivos utilizados fueron grado reactivo analítico; las soluciones, según la metodología descrita, fueron preparadas todas con agua ultrapura del sistema Millipore Simplicity UV, los materiales de laboratorio previamente lavados y secos para evitar cualquier problema de contaminación al momento de emplearlos.

El agua ultrapura es la más idónea cuando se trabaja con el voltamperómetro, debido a su calidad y grado de pureza; la elevada sensibilidad del equipo en mención, amerita minimizar al máximo la presencia de contaminantes porque pueden ser fácilmente detectables y generar resultados erróneos. Se empleó material de vidrio por su mayor exactitud en las mediciones de volúmenes. Sin embargo, el almacenamiento de las todas las soluciones se hizo en frascos de plástico porque el material de vidrio, con el tiempo, tiende a desprender ciertas sustancias que pueden actuar como interferentes en los análisis; también, los mismos fueron debidamente rotulados.

- **Buffer Acetato de Sodio 0.1 M pH 5**

Se pesó 1.32 g de NaOH y se colocó en un beaker de 1 L. Se agregó aproximadamente 900 mL de agua ultrapura y 4.686 mL de ácido acético. En agitación y medición con el pHmetro constante se ajustó el pH a 5. Finalmente se llevó a una fiola de 1 L y se enrasó con agua ultrapura. Se empleó este buffer para todas las determinaciones.

- **Hidrazina 0.4 M**

Se pesó 0.26 g de Sulfato de hidrazina y se disolvió en agua ultrapura. Se enrasó en una fiola de 5 mL.

- **Solución Stock de Acetaldehído**

Se tomaron 390  $\mu$ L de Acetaldehído puro y se colocaron en una fiola que contenía agua ultrapura fría. Se enrasó a 10 mL. Esta solución madre se mantuvo refrigerada, y diariamente se preparó patrones de 50 mg/L para realizar las determinaciones.

### 2.4.2.3. Medición de Muestras

En esta etapa las muestras de cerveza fueron leídas en el equipo voltamperométrico, luego de haber sido tratadas previamente.

El método introducido en el software del equipo, fue configurado bajo las condiciones que se observan en la Tabla N° 2.1.

En ésta, se muestra los valores óptimos utilizados para la obtención de la curva de intensidad de señal vs. Concentración y determinaciones en general; el valor de potencial de pico, corresponde a la máxima intensidad desarrollada; y el potencial de inicio y final, delimitan al método a un rango de máxima sensibilidad.

**Tabla 2.1. Condiciones para las determinaciones voltamperométricas**

<b>Parámetros</b>	<b>Condiciones</b>
Electrodo de trabajo	HDME
Velocidad de stirrer (rpm)	1000
Modo	SqW
Tiempo de Purga (s)	300
Potencial de deposición (V)	-0,3
Tiempo de deposición (s)	0.0
Tiempo de equilibración (s)	5.0
Potencial de inicio (V)	-0,7
Potencial final (V)	-1,3
Amplitud (V)	0.05
Frecuencia (Hz)	10
Velocidad de barrido (V/s)	0.0595
Potencial de pico	-1,1

El procedimiento empleado para este análisis fue el siguiente: se preparó una solución acuosa de Sulfato de Hidrazina, la cual fue adicionada a una celda electroquímica conteniendo 10 mL de buffer Acetato 0.1 M pH 5.

Después del burbujeo del gas nitrógeno durante 5 minutos, se adicionó 100  $\mu$ L de muestra destilada, se esperó 8 minutos y se corrió la muestra. Seguidamente

se añadió la primera adición estándar: 100  $\mu\text{L}$  de solución acuosa recién preparada de acetaldehído, se presionó “Hold” en el equipo y se esperó 8 minutos.

Se volvió a hacer lo mismo para la segunda adición estándar. Los voltamogramas de onda cuadrada fueron registrados después de 8 minutos de reacción.<sup>34</sup>

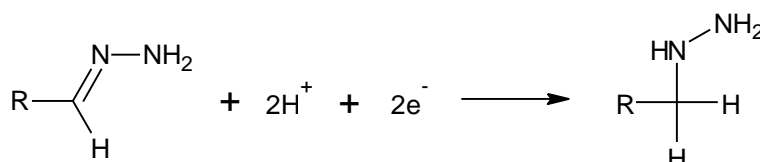
**Fundamento:** Al reaccionar el acetaldehído con la hidrazina en condiciones ligeramente ácidas, éste puede ser convertido en hidrazona.



**Figura 2.4. Reacción del acetaldehído con la hidrazina.**

Una vez formado, este aducto electroactivo es estable. La reacción de la hidrazina con el acetaldehído no es inmediata. Se observó que un tiempo de reacción de por lo menos 5 minutos fue necesario.

La reducción de la hidrazona es un proceso de ganancia de dos electrones, y la corriente es proporcional a la concentración de acetaldehído.



**Figura 2.5. Reducción de la hidrazona.**

#### 2.4.2.4. Análisis estadístico

El análisis de resultados se realizó mediante el uso del programa estadístico STATGRAPHICS.

Los datos obtenidos para los parámetros de validación de la técnica y la determinación de acetaldehído en cerveza, fueron analizados estadísticamente empleando el análisis de varianza (ANOVA), la prueba t-student, prueba de Levene's, entre otros.

Asimismo, para este análisis y su interpretación de resultados se empleó los valores del promedio, desviación estándar, coeficiente de desviación y otros.

**Análisis de varianza:** Conocido como ANOVA (Analysis of variance) es un conjunto de técnicas estadísticas de gran utilidad y ductilidad.

Se emplea cuando hay más de dos grupos que necesitan ser comparados, cuando hay mediciones repetidas en más de dos ocasiones, cuando los sujetos pueden variar en una o más características que afectan el resultado y se necesita ajustar su efecto o cuando se desea analizar simultáneamente el efecto de dos o más tratamientos diferentes.<sup>61</sup>

**Prueba t-student:** Se fundamenta en la distribución de normalidad, y en que las muestras sean independientes. Permite comparar muestras,  $N \leq 30$  y/o establece la diferencia entre las medias de las muestras.

Además, es una herramienta poderosa, en la que aunque una de las muestras no tenga distribución normal pero la otra sí y la razón de la varianza más grande a la pequeña sea menor a 2, esta prueba resulta adecuada al comparar dos medias.<sup>62</sup>

**Prueba de Levene's:** Se emplea ampliamente para evaluar la homogeneidad de las varianzas en el caso de un factor (con k niveles) o la homogeneidad general; es decir, se usa para probar si k muestras tienen varianzas iguales. Se utiliza típicamente en el contexto de decidir si una prueba específica (por ejemplo, una prueba F) es apropiada para un conjunto dado de datos. Esta prueba no identifica qué varianzas son diferentes.<sup>63</sup>

**Promedio:** Representa un valor central calculado entre un conjunto de números.

**Desviación estándar:** Es un valor que indica qué tan dispersos están los datos con respecto a la media.

**Coefficiente de variación:** Valor que indica qué tan grande es la desviación estándar en relación a la media. Se calcula dividiendo la desviación estándar entre el promedio y multiplicando por cien.



## CAPÍTULO III

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Validación Voltamperométrica

##### 3.1.1. Validación electrónica

Esta validación se basó en dos puntos, la linealidad y el desempeño de pico; ambos necesarios para la determinación de una correcta operatividad del equipo. El test de linealidad como su propio nombre lo dice, debe registrar una línea diagonal o una recta al relacionar el voltaje aplicado en voltios y la intensidad de corriente generada (I en amperios).

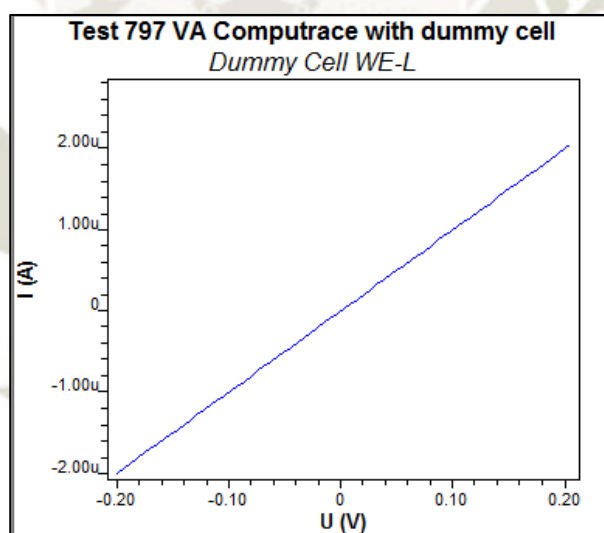


Figura 3.1. Validación electrónica

Como se aprecia en la Figura 3.1, se obtuvo una recta con pendiente positiva originada a partir de un voltaje mínimo de  $-200$  mV que generó  $-2$   $\mu$ A de intensidad de corriente, alcanzando un valor de  $2$   $\mu$ A de esta última cuando se empleó un voltaje máximo de  $200$  mV. Según la guía técnica del equipo (Metrohm), los parámetros conseguidos se encontraron dentro de los valores de

aceptación para determinar que la rampa de voltaje fue la adecuada para su uso, según su linealidad.

Asimismo, otro parámetro que se tomó en cuenta para la validación electrónica fue el desempeño de pico, el mismo que debe presentar una simetría para indicar el correcto funcionamiento del equipo.

Tal y como se muestra en la Figura 3.2, se obtuvo un pico simétrico en el rango de voltaje de  $-200$  mV a  $-800$  mV; sin embargo, el pico se generó con un voltaje máximo de  $-497$  mV alcanzando una altura máxima, correspondiente a la máxima intensidad de corriente, de  $-1.27$   $\mu$ A. Estos valores son semejantes a los descritos por Metrohm, lo que indica el buen funcionamiento y la confianza en sus resultados.

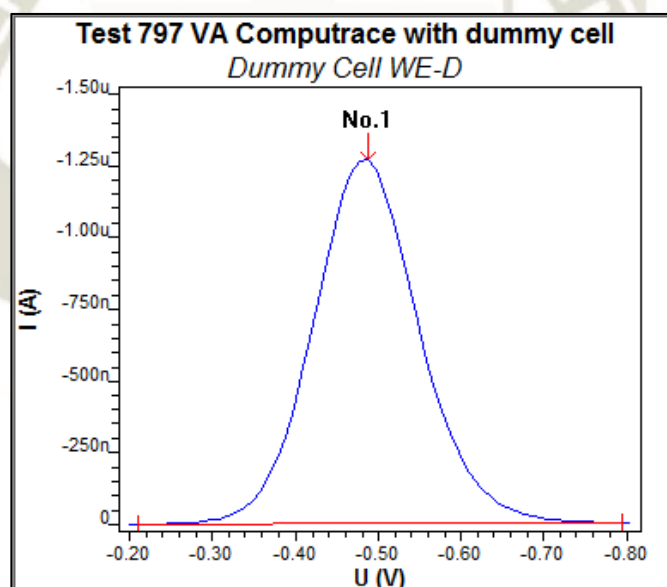
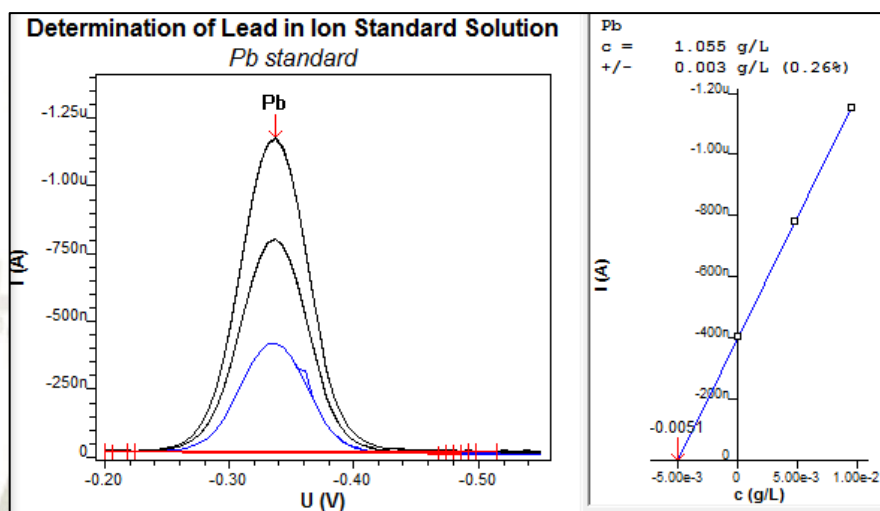


Figura 3.2. Desempeño de picos.

### 3.1.2. Validación química

Luego de la validación electrónica del equipo, se recomienda una validación química con el uso de estándares de calibración; los resultados obtenidos de esta validación se observan en la Figura 3.3. Se graficaron picos correspondientes a la muestra (el primer pico de color azul) y las adiciones estándar dibujadas por encima de la muestra (picos de color negro), tanto la muestra como los estándares

fueron de Pb (II) de 1000 mg/L; ubicados entre voltajes de  $-250$  y  $-430$  mV que generaron intensidades de corriente de  $-0.275$ ,  $-0.760$  y  $-1.20$   $\mu\text{A}$ , cada pico sobrepuesto del otro, lo que arrojó una concentración final de  $1.055$  g/L de Pb (II) con una desviación estándar de  $0.003$  g/L y un error relativo del  $0.26\%$ .



**Figura 3.3 .Validación química del equipo.**

Según la guía de Metrohm donde describe los valores de determinados parámetros para la validación del equipo, se dedujo y confirmó nuevamente el buen estado y funcionamiento del equipo en la generación de resultados.

### 3.1.3. Validación Analítica: Análisis Estadístico

#### 3.1.3.1. Linealidad

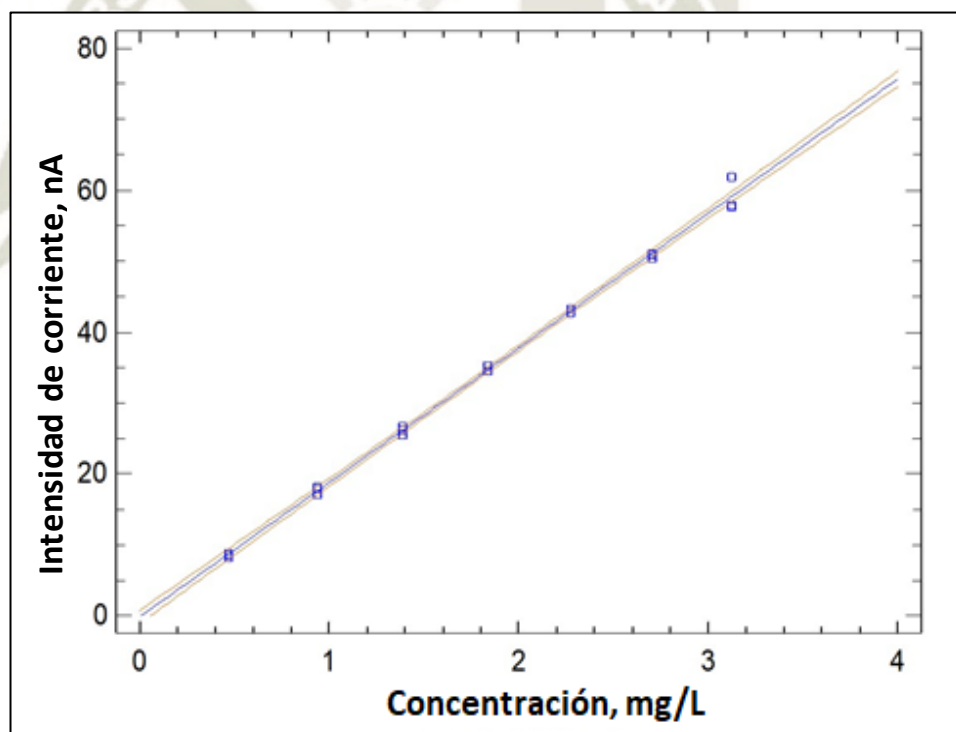
Para la determinación de este parámetro, se graficaron 6 puntos o concentraciones que correspondieron a las adiciones estándar. Según bibliografía como ICH (Consejo Internacional de armonización) <sup>64</sup> recomienda trabajar con 5 concentraciones o puntos como mínimo y la AOAC (Asociación de químicos analíticos oficiales) <sup>65</sup> sugiere emplear de 6 a 8 puntos; todas éstas para establecer adecuadamente la linealidad.

**Tabla 2.1, Medidas de intensidad de señal para diferentes concentraciones de estándar de acetaldehído**

	Intensidad de señal, nA			Concentración de acetaldehído, mg/L	Intensidad de señal, nA			Desviación estándar	
	I	II	III		I	II	III		
<b>Estándar</b>	8.92	8.28	8.12	0.472	8.82	8.50	8.28	8.53	0.27
	8.72	8.72	8.43						
<b>Adición 1</b>	17.88	17.76	17.09	0.935	18.06	18.07	17.03	17.72	0.60
	18.24	18.38	16.97						
<b>Adición 2</b>	26.47	25.56	25.21	1.389	26.75	25.80	26.17	26.24	0.48
	27.03	26.04	27.12						
<b>Adición 3</b>	34.25	35.26	34.90	1.835	34.57	35.29	35.27	35.04	0.41
	34.88	35.31	35.64						
<b>Adición 4</b>	42.75	42.78	42.43	2.273	42.75	43.20	42.75	42.90	0.26
	42.75	43.61	43.07						
<b>Adición 5</b>	50.21	50.93	50.65	2.703	50.32	50.93	51.14	50.79	0.43
	50.42	50.92	51.63						
<b>Adición 6</b>	57.86	61.70	57.58	3.125	57.87	61.87	57.68	59.14	2.37
	57.88	62.04	57.78						

En la Tabla N° 3.1 se muestran los datos obtenidos por triplicado con su respectivo promedio y desviación estándar. La diferencia entre cada concentración de acetaldehído fue de 0.5 mg/L, cuyo rango fue de 0.472 a 3.125 mg/L lo que generó intensidades de corriente que diferían aproximadamente entre 8 nA. Con respecto a la desviación estándar, el valor mínimo fue de  $\pm 0.257$  nA y el máximo de  $\pm 2.366$  nA.

La figura 3.4 muestra la curva de calibración realizada para la evaluación de la linealidad del método voltamperométrico para la determinación de acetaldehídos empleando el software estadístico STATGRAPHICS; en el que se relaciona la intensidad de corriente en nA y la concentración de acetaldehído en mg/L. En azul se observa la curva de ajuste para los datos señalados en la Tabla N° 3.1; y en rojo, los límites de confianza al 95 %.



**Figura 3.4. Curva de calibración estadística para linealidad.**

La AOAC <sup>65</sup> indica que un  $R^2$  mayor a 0.99 demuestra la bondad de ajuste de los datos. Bodoki *et al.*,<sup>40</sup> en su validación del análisis electroquímico para determinar colchicina usando electrodo de carbón vítreo, también encontraron

un coeficiente de determinación de 0.9998 aunque solo tomaron 5 puntos o concentraciones.

Como se aprecia en la Tabla N° 3.2, los parámetros calculados mediante el método de mínimos cuadrados generan la ecuación 3.1, con un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de 99.75 % (0.9975).

De manera similar, en la validación de un método para determinar silicio asimilable en suelo mediante absorción atómica, encontraron una linealidad de 0.995.<sup>66</sup> Por su parte, Paredes A.,<sup>67</sup> en el ensayo de linealidad para validar un método por espectrofotometría UV-Vis para cuantificar albendazol en suspensiones, obtuvo un coeficiente de determinación de 0.9989.

Magarelli *et al.*,<sup>42</sup> en el desarrollo y validación de un método voltamperométrico para la determinación de ácidos fenólicos totales en cultivos de algodón, obtuvieron un  $R^2$  de 0.9985. Con respecto a otros métodos analíticos, Ramaswamy *et al.*,<sup>68</sup> al desarrollar y validar un método para cuantificar tres medicamentos basado en HPLC, éste mostró ser lineal con un  $R^2$  mayor a 0.999.

Asimismo, Mörschbacher *et al.*,<sup>69</sup> también encontraron un coeficiente de determinación similar al anterior con un valor de 0.9991, al validar un método para cuantificar selenio en biomasa bacteriana por espectrofotometría UV-Vis.

### **Intensidad = -0.168163 + 18.9641\*Concentración Ecuación 3.1**

Donde, la intensidad se refiere a la intensidad de señal en nA y la concentración es del acetaldehído en mg/L.

Los términos del modelo matemático (Ecuación 3.1) fueron evaluados estadísticamente mediante la prueba t con un nivel de confianza del 95 %, identificando que para el intercepto el valor-p fue de 0.7061 (se acepta la hipótesis nula) lo cual indica que el intercepto no es estadísticamente diferente de cero, por lo tanto, la curva de linealidad inicia en el origen.

Por su parte el valor-p de la pendiente fue de 0.000 siendo ésta significativa y distinta de cero, tal y como se muestra en la Tabla N° 3.2.

**Tabla 3.2. Prueba t-student para linealidad del método voltamperométrico**

Parámetro	Estimado*	Hipotesis nula	Error Estándar	Estadístico t	Valor-P
<b>Intercepto</b>	-0.1682	$H_0$ : Intercepto = 0	0.4393	-0.3828	0.7061
<b>Pendiente</b>	18.9641	$H_0$ : Pendiente = 0	0.2172	87.3084	0

\*Estimado por Mínimos cuadrados

Para el siguiente análisis, ANOVA, se utilizaron los datos de concentración e intensidad, ya descritos en la tabla 3.1.

En la Tabla N° 3.3, se presenta el análisis de varianza o ANOVA, donde se muestra un valor-p de 0.0000 indicando que en el modelo matemático propuesto (Ecuación 3.1) existió una relación estadísticamente significativa entre Intensidad de señal y Concentración con un nivel de confianza del 95.0 %.

**Tabla 3.3. Análisis de varianza para linealidad del método voltamperométrico.**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
<b>Modelo</b>	5906.1900	1	5906.1900	7622.7600	0.0000
<b>Residuo</b>	14.7214	19	0.7748		
<b>Carencia de Ajuste</b>	1.0456	5	0.2091	0.2100	0.9508
<b>Error Puro</b>	13.6758	14	0.9768		
<b>Total (Corr.)</b>	5920.9100	20			

Así mismo, la prueba de Falta de Ajuste realizada para determinar si el modelo seleccionado era adecuado para describir los datos observados, o si se debería utilizar un modelo más complicado, arrojó un valor-P de 0.9508 indicando que el modelo lineal fue adecuado con un 95 % de confianza.

### 3.1.3.2. Precisión

Se determinó este parámetro empleando la repetibilidad y la precisión intermedia como lo indican las normas para la validación de métodos analíticos.<sup>64, 65</sup>

Este procedimiento analítico es expresado generalmente en función de varianza, desviación estándar o coeficiente de variación de una serie de medidas.<sup>64</sup> Por tal motivo, los resultados de repetibilidad y precisión intermedia se discuten más a continuación, en función de los mismos.

#### 3.1.3.2.1. Repetibilidad

Este parámetro que también expresa precisión se realizó según la metodología definida y sugerida por bibliografía, las mediciones se realizaron tres veces para cada concentración de acetaldehído.

Los datos y resultados obtenidos en los ensayos de medición se observan en la Tabla N° 3.4; además, se muestran los promedios de las mismas.

**Tabla 3.4. Medidas de intensidad de señal para diferentes concentraciones de estándar de acetaldehído para el análisis de repetibilidad.**

	Concentración, mg/L	Intensidad de señal, nA			
		R1	R2	R3	Promedio
<b>C1</b>	0.4717	8.820	8.500	8.275	8.532
<b>C2</b>	0.9346	18.060	18.070	17.030	17.720
<b>C3</b>	1.3889	26.750	25.800	26.165	26.238
<b>C4</b>	1.8349	34.565	35.285	35.270	35.040
<b>C5</b>	2.2727	42.750	43.195	42.750	42.898
<b>C6</b>	2.7027	50.315	50.925	51.140	50.793
<b>C7</b>	3.1250	57.870	61.870	57.680	59.140

La repetibilidad se realizó con los datos de concentración y de intensidad obtenidos de la Tabla N° 3.1 debido a que este procedimiento se realiza con varias mediciones o repeticiones pero en un mismo día. Los resultados se analizaron con respecto a los coeficientes de variación que son similares a la

desviación estándar relativa (Tabla N° 3.5). Estos valores fluctuaron entre 0.61 y 4 %, con un promedio de 2.22 %.

**Tabla 3.5. Resultados estadísticos para el análisis de repetibilidad.**

	Recuento	Promedio	Coefficiente de Variación	Desviación Estándar	Prueba de Levene's	Valor-P
<b>C1</b>	3	8.53	3.18%	0.2715		
<b>C2</b>	3	17.72	3.37%	0.5976		
<b>C3</b>	3	26.14	2.39%	0.6255		
<b>C4</b>	3	35.04	1.17%	0.4100	0.6754	0.6719
<b>C5</b>	3	42.90	0.61%	0.2598		
<b>C6</b>	3	50.80	0.84%	0.4259		
<b>C7</b>	3	59.14	4.00%	2.3662		

Por otro lado, la prueba de Levene's realizada para comparar las desviaciones estándar mostró un Valor- $p > 0.05$  (valor-P de 0.6719) indicando que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar, con un 95% de confianza. Nos indica que estadísticamente las varianzas son iguales, existe repetibilidad.

Según las normas de validación, los valores aceptables de coeficiente de variación para repetibilidad (Tabla 3.6) con la concentraciones de acetaldehído empleadas en la validación, no deben exceder el 4 % (Tabla N° 3.6); por lo que podemos inferir que, nuestro método cumple con los valores establecidos.

**Tabla 3.6. Valores aceptables de CV para repetibilidad, según la AOAC.**

Concentración	Coefficiente de variación (CV)
100 %	1 %
10 %	1.5 %
1 %	2 %
0.1 %	3 %
0.01 %	4 %
10 µg/g (ppm)	6 %
1 µg/g	8 %
10 µg/kg (ppb)	15 %

Fuente: AOAC Guidelines for Single Laboratory

Asimismo, García J.<sup>70</sup> en su trabajo donde validó un método de espectrofotometría UV-Vis para cuantificar e identificar riboflavina, obtuvo coeficientes de variación menores al 2 % para la repetibilidad.

Sin embargo, Araujo, P. y Quishpe, M.,<sup>66</sup> cuando realizaron los ensayos de repetibilidad para su método de determinación de silicio asimilable en suelo por absorción atómica, encontraron coeficientes de variación más elevados ( $CV \leq 5.99\%$ ).

### 3.1.3.2.2. Precisión intermedia

La evaluación de la precisión del método se realizó en dos días distintos por duplicados realizados a diferentes horas del día para 7 concentraciones distintas de una misma muestra homogénea,<sup>51</sup> que fue el acetaldehído.

A continuación se muestran los resultados obtenidos en cada determinación del compuesto (Tabla N° 3.7) con los promedios de la intensidad de señal o corriente, los cuales fueron utilizados para realizar el análisis estadístico, el cual se muestra en la tabla 3.8.

**Tabla 3.7. Medidas de intensidad de señal para diferentes concentraciones de estándar de acetaldehído para el análisis de precisión intermedia**

	Concentración, mg/L	Intensidad de señal, nA				Promedio
		Día 1		Día 2		
		R1	R2	R1	R2	
<b>C1</b>	0.4717	8.82	8.50	10.28	9.41	9.25
<b>C2</b>	0.9346	18.06	18.07	19.43	18.23	18.45
<b>C3</b>	1.3889	26.75	25.80	28.27	29.62	27.61
<b>C4</b>	1.8349	34.57	35.29	38.03	38.83	36.68
<b>C5</b>	2.2727	42.75	43.20	47.20	48.38	45.38
<b>C6</b>	2.7027	50.32	50.93	55.56	57.06	53.47
<b>C7</b>	3.1250	57.87	61.87	62.27	63.89	61.47

La precisión intermedia se representa normalmente como desviación estándar relativa y coeficiente de variación, ambos se expresan en porcentaje (%).

Al apreciar la Tabla N° 3.8 con los resultados del análisis estadístico, se encontró que los valores de los coeficientes de variación oscilaron entre 3.56 y 8.00 %. Para las concentraciones empleadas se consideran valores aceptables de máximo 10 %; y los valores mostrados están cercanos al mismo, siendo el promedio de estos un 5.77 %.

En trabajos como el de López A. *et al.*,<sup>71</sup> al analizar cocaína en diferentes muestras por cromatografía de gases con detector de ionización de llama (CG-FID), el método de extracción soxhlet empleado, cumplió con los criterios estadísticos de precisión al obtener intervalos de coeficientes de variación entre 2.9 y 6.9 %.

Además, Fu Quiang *et al.*,<sup>72</sup> cuando desarrollo y validó un método para determinar “regorafenib” y sus metabolitos en el plasma de ratón, encontró coeficientes de variación para la precisión entre 3.97 y 11.3 %.

Por otro lado, la prueba de Levene´s realizada para comparar las desviaciones estándar muestra nuevamente un valor-P de 0.3923 (Valor-p>0.05) indicando que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar, con un 95% de confianza.

**Tabla 3.8. Resultados estadísticos para precisión intermedia.**

	<b>Recuento</b>	<b>Promedio</b>	<b>Coefficiente de Variación</b>	<b>Desviación Estándar</b>	<b>Prueba de Levene´s</b>	<b>Valor-P</b>
C1	4	9.25	8.00%	0.7819		
C2	4	18.44	3.56%	0.6596		
C3	4	27.61	6.09%	1.6824		
C4	4	36.68	5.64%	2.0680	1.07573	0.392335
C5	4	45.38	6.23%	2.8274		
C6	4	53.46	6.26%	3.3482		
C7	4	61.48	4.16%	2.5571		

Es decir, los ensayos y mediciones se desarrollaron de manera correcta y sus resultados fueron comparados entre sí.

### 3.13.3. Límite de detección y límite de cuantificación

Ambos límites se calcularon mediante las ecuaciones 2.3 y 2.4, en las que se emplearon los valores de las gráficas de Intensidad vs Concentración y Desviación estándar vs Concentración.

Se determinó que el límite de detección (LOD) para este método de análisis electroquímico fue 0.0110 mg/L (11.0129 µg/L); y 0.0305 mg/L (30.4705 µg/L) fue el límite de cuantificación (LOQ) del mismo.

Según bibliografía, donde emplean la voltamperometría como método analítico se han encontrado diversos valores para estos.

Para el caso del límite de detección, en el análisis de colchicina usando un electrodo de carbón vítreo se calculó un valor de 0.80 µg/mL que es igual a 800 µg/L para un rango de concentración de 2.4 – 50 µg/mL,<sup>(40)</sup> evidentemente mucho mayor que el determinado en la presente tesis.

En la determinación de ácidos fenólicos en cultivos de algodón,<sup>42</sup> los límites de detección y cuantificación fueron  $6.8 \times 10^{-8}$  y  $1.0 \times 10^{-7}$  M, respectivamente.

Por su parte, la validación de otros métodos de análisis también toman en cuenta estos parámetros. Alquadeib, Bushra,<sup>73</sup> determinó diclofenaco en tabletas un nuevo método de HPLC, el cual desarrolló y validó encontrando valores de límite de detección y cuantificación de 2 µg/mL y 4 µg/mL de diclofenaco de sodio, respectivamente.

Con el mismo método analítico de HPLC, en la cuantificación de tres formulaciones farmacéuticas (Emtricitabine, Tenofovir, Efavirenz) con previa validación del mismo, determinaron también valores para el límite de detección de 0.38, 0.76, 0.94 µg/mL y límites de cuantificación de 1.25, 2.5, 3.10 µg/mL respectivamente.<sup>(68)</sup>

### 3.13.4. Exactitud

Siguiendo la metodología descrita y detallada en el anterior capítulo, la exactitud se determinó con el cálculo del porcentaje de recuperación porque según

bibliografía, la exactitud se debe reportar en función de porcentaje de recuperación.

Los datos obtenidos en los ensayos se aprecian en la tabla N° 3.9.

**Tabla 3.9. Resultados de los ensayos para la determinación de la exactitud**

	Concentración de acetaldehído, mg/L			
	R1	R2	R3	Promedio
<b>Muestra</b>	23.8950	23.2500	22.6620	23.2690
<b>Muestra + Std</b>	68.7750	67.8730	69.1710	68.6063
<b>Std</b>	49.5780	50.2970	48.3840	49.4197

Con estos resultados se obtuvo un porcentaje de recuperación del 91.74 %, el mismo que se encuentra dentro de los valores aceptables sugeridos por la AOAC<sup>65</sup> que son entre 85–110 % para la concentración empleada en los ensayos (Tabla N° 3.10).

**Tabla 3.10. Límites de porcentaje de recuperación según la AOAC.**

Concentración	Coefficiente de variación (CV)
100 %	98-101 %
10 %	95-102 %
1 %	92-105 %
0.1 %	90-108 %
0.01 %	85-110 %
10 µg/g (ppm)	80-115 %
1 µg/g	75-120 %
10 µg/kg (ppb)	70-125 %

Fuente: AOAC Guidelines for Single Laboratory

Asimismo, Furlanetto et al,<sup>74</sup> en la validación y optimización de un método voltamperométrico para la determinación de “nimesulide” que es una droga con eficacia antiinflamatoria, consiguieron un porcentaje de recuperación de 101.3 %, el mismo que se encuentra en el rango indicado.

También, Vareli et al,<sup>75</sup> encontró porcentajes de recuperación en el rango de 89-96 % cuando optimizaron y validaron un método para determinar ditiocarbamato empleando cromatografía de gases acoplado a espectrofotometría de masas (GC-MS).

Además, Mörschbacher et al,<sup>69</sup> en la determinación de selenio en biomasa bacteriana mediante espectrofotometría UV-Vis, lograron un porcentaje de recuperación que excedió el 96 %.

No obstante, otros investigadores han encontrado valores para la misma por fuera del rango mencionado.

Ryu *et al*,<sup>76</sup> al validar un método para determinar etil carbamato en una matriz alcanzó porcentajes de recuperación en el rango de 80.75 a 121.82 % para intra-días y de 78.84 a 116.98 % para inter-días; y Saint-Hilaire *et al*,<sup>77</sup> tuvieron recuperaciones entre 70 y 120 % para orina y heces, respectivamente cuando validaron un método para cuantificar clordecona y sus metabolitos en orina y heces de oveja, utilizando cromatografía en fase líquida acoplada a un espectrofotómetro de masas.

## 3.2. Análisis Voltamperométrico

### 3.2.1. Medición de Muestras

Este análisis descrito en el capítulo II, permitió realizar la cuantificación de acetaldehído en tres diferentes muestra de cerveza por triplicado; como ya se mencionó, éstas diferían entre ellas en el tiempo de almacenamiento: cerveza 1 (0 días), cerveza 2 (173 días) y cerveza 3 (471 días).

Los resultados y el promedio de éstos se observan en la siguiente tabla.

**Tabla 3.11. Medidas de concentraciones de acetaldehído en muestras de cervezas con diferentes fechas de fabricación**

Muestras	R1, mg/L	R2, mg/L	R3, mg/L
<b>Cerveza 1</b>	6.891	6.467	6.009
<b>Cerveza 2</b>	8.377	7.472	8.646
<b>Cerveza 3</b>	10.973	10.121	11.132

### 3.2.2. Análisis Estadístico: Cuantificación de acetaldehído en muestras de cerveza

Los datos de concentración obtenidos en el análisis voltamperométrico fueron procesados estadísticamente y se obtuvieron los resultados mostrados en la Tabla N° 3.12.

Los parámetros tomados en cuenta fueron: promedio, desviación estándar, coeficiente de variación, mínimo, máximo y el rango.

**Tabla 3.12. Estadística descriptiva de las concentraciones de Acetaldehído en cervezas con diferentes fechas de fabricación**

Muestras	Cerveza 1	Cerveza 2	Cerveza 3
<b>Recuento</b>	3	3	3
<b>Promedio</b>	6.46+/-1.10	8.17+/-1.52	10.74+/-1.35
<b>Desviación Estándar</b>	0.4411	0.6150	0.5437
<b>Coefficiente de Variación, %</b>	6.83%	7.53%	5.06%
<b>Mínimo</b>	6.009	7.472	10.121
<b>Máximo</b>	6.891	8.646	11.132
<b>Rango</b>	0.882	1.174	1.011

Se puede observar que el coeficiente de variación máximo fue de 7.53 % indicando que existe repetibilidad aceptable de los valores de concentración de acetaldehído en cerveza.

Junto a los promedios de nuestras concentraciones, se observan los límites de confianza, los cuales nos indican que existe un 95 % de probabilidad de que en caso se vuelva a realizar las mediciones, los resultados obtenidos se encontrarán dentro de dichos límites.

En la Figura 3.5 se muestra el gráfico de intervalos para los resultados obtenidos de cada cerveza. La cerveza 1 con 0 días de almacenamiento tuvo una media de 6.46 mg/L; la cerveza 2 con 173 días de almacenamiento, 8.17 mg/L; y la cerveza 3 con 471 días, 10.74 mg/L.

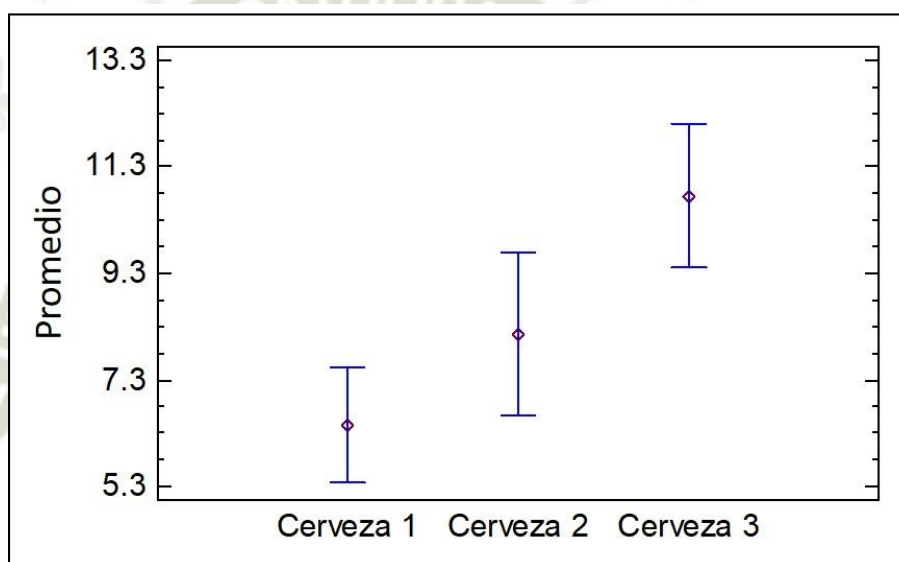


Figura 3.5. Comparación de medias entre las muestras de cerveza

Para el siguiente análisis comparativo, ANOVA, se utilizaron los datos de las concentraciones obtenidas de los ensayos realizados a las 3 muestras de cerveza, los cuales se muestran en la tabla 3.11.

El análisis de varianza de los datos obtenidos para los tres tipo de cervezas, tomó en cuenta la fuente entre grupo e intra grupos y se observa en la Tabla N° 3.13.

Puesto que el valor-P de la prueba fue menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre los promedios de las tres muestras de cerveza analizadas con un nivel del 95.0% de confianza.

**Tabla 3.13. Análisis de varianza para los tres tipos de cerveza**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	27.9354	2	13.9677	48.25	0.0002
Intra grupos	1.73681	6	0.289468		
<b>Total (Corr.)</b>	<b>29.6722</b>	<b>8</b>			

El análisis de varianza nos indica que sí existe una diferencia significativa entre las tres muestras, pero no nos indica cuáles son diferentes entre sí.

Por tal motivo, se utilizó la prueba LSD (Least significant difference) de Fisher como una prueba comparativa, la cual nos brinda cuantitativamente los valores de diferencia.

Como resultado, con la prueba de LSD Fisher se identificó que los valores de acetaldehído medidos en las muestras de cerveza fueron todos estadísticamente diferentes entre ellos, como se muestra en la tabla 3.14.

**Tabla 3.14. Diferencias obtenidas de las comparaciones múltiples al utilizar la prueba de Fisher.**

Contrast	Sig.	Difference
Cerveza 1 - Cerveza 2	*	-1.70933
Cerveza 1 - Cerveza 3	*	-4.28633
Cerveza 2 - Cerveza 3	*	-2.577

\* denotes a statistically significant difference.

La Tabla 3.14 aplica un procedimiento de comparaciones múltiples para determinar qué promedios son significativamente diferentes de los otros.

Se muestra la diferencia estimada entre cada par de promedios descritos. Los asteriscos han sido colocados para indicar que los pares contrastados muestran diferencia estadísticamente significativa a un 95% de nivel de confianza.

Se consideró los superíndices a, b, c para indicar que son diferentes entre sí. Aquellos que tengan el mismo superíndice tendrán igual concentración de acetaldehído y aquellos que indiquen diferente superíndice tendrán concentraciones diferentes.

Por lo tanto el contenido de acetaldehído de la cerveza de 0 días es diferente al contenido de acetaldehído con respecto a la cerveza 2 y la cerveza 3, como se muestra en la tabla 3.15.

Además, se realizó una comparación de las cervezas con respecto a los días de almacenamiento que tuvo cada una de ellas (Tabla N° 3.15).

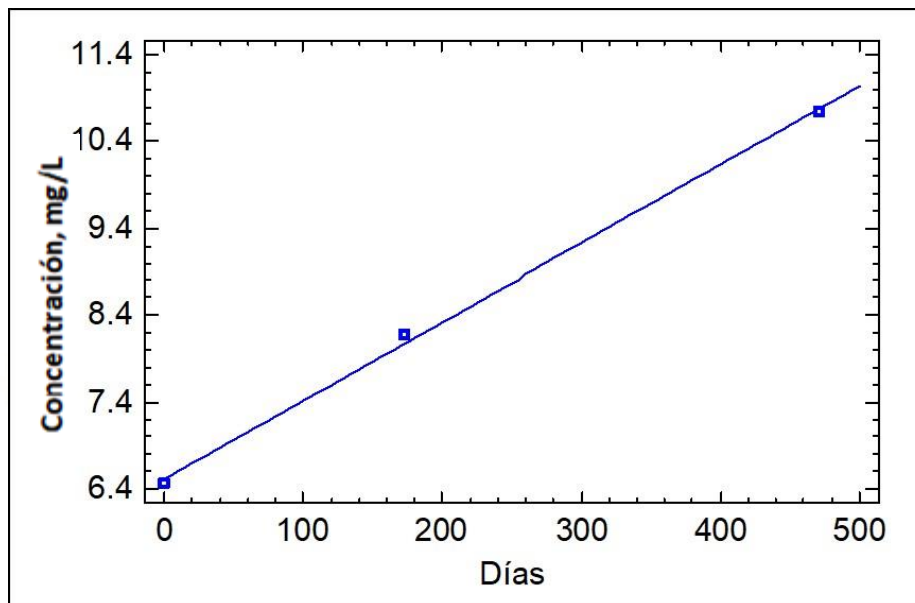
En ésta, también se muestran las fechas exactas de fabricación y en las que se realizaron las mediciones o lecturas voltamperométricas, que por diferencia se calcularon los días de almacenamiento; y con todas éstas, la concentración de acetaldehído en mg/L.

**Tabla 3.15. Comparación de la concentración de acetaldehído en cervezas y su tiempo de almacenamiento**

<b>Muestra</b>	<b>Fecha de fabricación</b>	<b>Fecha de lectura</b>	<b>Días almacenamiento</b>	<b>Concentración, mg/L</b>
Cerveza 1	15/02/2018	15/02/2018	0	6.46+/-1.10 <sup>a</sup>
Cerveza 2	20/08/2017	9/02/2018	173	8.17+/-1.52 <sup>b</sup>
Cerveza 3	11/10/2016	25/01/2018	471	10.74+/-1.35 <sup>c</sup>

Finalmente, para corroborar los resultados, se evaluó la variación de la concentración de acetaldehído en mg/L con respecto al tiempo transcurrido desde la producción de las cervezas hasta su análisis.

Como se observa en la Figura 3.6, se obtuvo una recta con pendiente positiva; lo que indica que a medida que se incremente el tiempo de almacenamiento, el contenido de acetaldehído también aumenta.



**Figura 3.6. Evaluación de la concentración de acetaldehído en cerveza vs su tiempo de almacenamiento**

Con respecto a la figura anterior, se generó una recta y con ella una ecuación que relaciona los factores o variables mencionadas, la que se muestra a continuación:

$$\text{Concentración} = 6.51685 + 0.00903642 * \text{Días de almacenamiento} \quad \text{Ecuación 3.2}$$

De igual manera, se obtuvo un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de 99.8665 (0.9986) que según las guías de validación es un valor admisible si supera el 0.99 para considerarse como un modelo lineal. Con todo lo expuesto, se podría concluir con que este modelo fue correcto al existir una relación directa entre los días de almacenamiento de la cerveza y su respectivo contenido de acetaldehído; lo que permitiría evaluar la estabilidad del sabor de la cerveza, ya que puede ser empleado como un indicador químico capaz de reflejar cambios sensoriales.<sup>60</sup>

## CONCLUSIONES

1. Se consiguió desarrollar y validar un método voltamperométrico para la determinación de acetaldehído en cerveza como uno alternativo a los empleados en la industria cervecera; se empleó la voltamperometría de onda cuadrada.
2. Durante el proceso de estandarización del método en voltamperometría para la determinación de acetaldehído en muestras de cerveza, los parámetros evaluados fueron linealidad ( $R^2=0.9998$ ), repetibilidad ( $CV=2.22\%$ ), precisión intermedia ( $CV=5.77\%$ ), límite de detección ( $0.0110\text{ mg/L}$ ), límite de cuantificación ( $0.0305\text{ mg/L}$ ) y exactitud ( $R=91.74\%$ ); los mismos que mostraron valores aceptables según las normas internacionales de validación de métodos analíticos.
3. Se evaluó el contenido de acetaldehído en cervezas con diferentes tiempos de almacenamiento: cerveza 1 (0 días), cerveza 2 (173 días) y cerveza 3 (471 días) y se determinó que la relación de ambos es directamente proporcional; en otras palabras, las cervezas con mayor tiempo de almacenamiento presentan mayores concentraciones de acetaldehído (cerveza 1:  $6.46\text{ mg/L}$ , cerveza 2:  $8.17\text{ mg/L}$ , cerveza 3:  $10.74\text{ mg/L}$ ).

## RECOMENDACIONES

- Evaluar diferentes temperaturas de almacenamiento que puedan influir en la determinación y contenido de acetaldehído en cervezas.
- Analizar la concentración de acetaldehído en diversas marcas y presentaciones (botella o lata) de cervezas consumidas en el país.
- Determinar y comparar el contenido de acetaldehído en otras bebidas alcohólicas.
- Comparar el método alternativo descrito en el presente trabajo con cromatografía de gases (técnica utilizada actualmente en la industria cervecera).
- El estudio puede ser complementado a través de una evaluación sensorial por parte de un panel experto de degustadores a fin de corroborar el efecto de la concentración de acetaldehído en el sabor de la cerveza.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hough JS. Biotecnología de la cerveza y de la malta. Zaragoza: Acribia; 1990.
2. EC R. La llegada de la cerveza al Peru: 151 años de historia. El Comercio. 2014 Abril.
3. Bisso G. El boom de las cervezas de provincias. Gestion. 2016 Abril.
4. Peru es el quinto país de la región en consumo de cerveza. RPP Noticias. 2017 Octubre.
5. Cadena Rios A. Selección de un filtro para clarificar y abrillantar cerveza, a partir del comparativo entre un filtro de placas verticales y un filtro de candelas. Tesis. Mexico D.F.: 2008.
6. Carrillo M. GJ. Estudios analíticos por técnicas cromatográficas de la participación de los ácidos amargos derivados del lúpulo en la formación de los aldehídos de Strecker en la cerveza. Tesis Doctoral. Caracas: 2011.
7. Ghasemi-Varnamkhasti M, Saied Mohtasebi S, Rodriguez-Mendez ML, Gomes AA, Ugulino Araujo MC, Galvao RKH. Screening analysis of beer ageing using near infrared spectroscopy and the Successive Projections Algorithm for variable selection. Talanta. 2011(89).
8. Gutiérrez JM, Haddi Z, Amari A, Bouchikhi B, Mimendia A, Cetó X, et al. Hybrid electronic tongue based on multisensor data fusion for discrimination of beers. Sensors and Actuators B: Chemical. 2013;177:989-96.
9. Carretero Casado F. Innovación tecnológica en la Industria de Bebidas. 2006.
10. Morales-Toyo M. Reacciones químicas en la cerveza. Revista de Química. 2000;32(1).
11. Renneberg R, Süßbier D, Peralta MF. Biotecnología para principiantes: Reverté; 2008.
12. Kunze W. Tecnología para cerveceros y malteros. Berlin: VLB Berlin; 2006.

13. Kunze W. Tecnología para cerveceros y malteros: VLB Berlin; 2006.
14. Quiroga Fernandez M. Forbes Mexico [Internet]. 2016. Available from: <https://www.forbes.com.mx/levadura-ingrediente-magico-la-cerveza/>.
15. Rojas de Gante C, Serna Saldívar S. La biotecnología como herramienta para la mejora de procesos y productos en la industria cervecera. Transferencia Posgrado, Investigación y Extensión en el Campus Monterrey [Internet]. Available from: <http://www.mty.itesm.mx/die/ddre/transferencia/Transferencia51/eli1-51.html>.
16. REICH S, SCOCCOLA DRN, LAMAGNA MCYA. USO DE NARICES ELECTRÓNICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE PROPIEDADES DE LÚPULOS.
17. Lacerda Bitu H. Levadura cervecera. Central de propagación de levadura Formación técnica para cerveceros AMBEV. 2018.
18. Sánchez C, Franco L, Bravo R, Rubio C, Rodríguez A, Barriga C, et al. Cerveza y salud, beneficios en el sueño. Revista Española de Nutrición Comunitaria. 2010;16(3):160-3.
19. Nimubona D, Blanco CA, Caballero I, Rojas A, Andres-Iglesias C. An approximate shelf life prediction of elaborated lager beer in terms of degradation of its iso- $\alpha$ -acids. Journal of Food Engineering. 2012.
20. Rodriguez Cardenas HA. Determinacion de Parametros Fisico-quimicos para la caracterizacion de cerveza tipo Lager elaborada por Compañia Cervecera Kunstmann S.A. Valdivia: 2003.
21. Ghasemi-Varnamkhasti M, Mohtasebi SS, Siadat M, Lozano J, Ahmadi H, Razavi SH, et al. Aging fingerprint characterization of beer using electronic nose. Sensors and Actuators B: Chemical. 2011.
22. Contreras Morales CA, del Campo MC. Productos de la fermentación alcohólica; un beneficio para la salud. Cartagena de Indicas: 2014.
23. Vasquez HJ, Dacosta O. Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas. Ingeniería, Investigación y Tecnología. 2007;8(4).

24. Perez Ortiz L. Fundacion Telefonica2011.
25. Rodrigues JA, Barros AS, Carvalho B, Brandao T, Gil AM. Probing beer aging chemistry by nuclear magnetic resonanceand multivariate analysis. *Analytica Chimica Acta*. 2011.
26. Suarez DM. Cerveza: componentes y propiedades. Oviedo: 2013.
27. Morales CC. Diseño de un Filtro para Cerveza Artesanal.
28. Marcos A, Díaz-Ufano ML, Fuster VP. ¿ El consumo moderado de cerveza podría incluirse dentro de una alimentación saludable? *SEMERGEN-Medicina de Familia*. 2015;41:1-12.
29. Olalla J, de España SGdC. La cerveza, un alimento con propiedades funcionales. Jornada Temática “Industria Agroalimentaria Seguridad y calidad alimentaria” Madrid. 2002.
30. Petkova N, Jonkova G. Effect of some Technological factors on the content of acetaldehyde in beer. *Chemistry & Chemical Engineering, Biotechnology, Food Industry*. 2010;11.
31. Liu S-Q, Piline GJ. An overview of formation and roles of acetaldehyde in winemaking with emphasis on microbiological implications. *International Journal of Food Science and Technology*. 2000;35.
32. Lachenmeier DW, Sohnius E-M. The role of acetaldehyde outside ethanol metabolism in the carcinogenicity of alcoholic beverages: Evidence from a large chemical survey. *Food and Chemical Toxicology*. 2008;46.
33. Re-evaluation of some organic chemicals, Hydrazine and Hydrogen Peroxide. Lyon: IARC Monographs; 1999.
34. Rodgher V, Okumura L, Saczk A, Stradiotto NR, Zanoni MVB. Electroanalysis and determination of acetaldehyde in fuel ethanol using the reaction with 2, 4-dinitrophenylhydrazine. *Journal of Analytical Chemistry*. 2006;61(9):889-95.

35. McMurry. J. Química Orgánica Editorial Cengage Learning Nueva York 2008;7ma Edición.
36. Bruice PY. Química Orgánica. Editorial Pearson Education California. 2008;Quinta Edición.
37. Ortiz R, Martínez Y, Hernández R. TÉCNICAS ELECTROANALÍTICAS. 2006;Parte II.
38. Wang J. Analytical electrochemistry: John Wiley & Sons; 2006.
39. KOLTHOFF BIM, LINGANE JJ. Polarography. Second Edition. Soil Science. 1953;75(4):331.
40. Bodoki E, Săndulescu R, Roman L. Method validation in quantitative electrochemical analysis of colchicine using glassy carbon electrode. Open Chemistry. 2007;5(3):766-78.
41. Guido LF, Fortunato NA, Rodrigues JA, Barros AA. Voltammetric Assay for the Aging of Beer. Agricultural and Food Chemistry. 2003;51.
42. Magarelli G, da Silva JG, de Sousa Filho IA, Lopes ISD, SouzaDe JR, Hoffmann LV, et al. Development and validation of a voltammetric method for determination of total phenolic acids in cotton cultivars. Microchemical Journal. 2013;109:23-8.
43. Harvey D. Modern Analytical Chemistry: McGraw-Hill; 2000.
44. Flores E. Voltametría cíclica: la espectroscopía electroquímica. Parte I. Revista de Química. 1995;9(2):165-72.
45. Alves FMA. Metodologías analíticas para la determinación y especiación de arsénico en aguas y suelos. Argentina: CYTED; 2009.
46. Skoog DA, West DM, Holler FJ, Crouch SR. Fundamentos de Química Analítica: Thomson; 2005.
47. Mahmud Z, Gordillo, G., Ventura D'Alkaine, C. Voltametría de Onda Cuadrada para estudiar la Electrodeposición de cinc en medio ácido. Zona de potenciales de control por transferencia de masa. Informe técnico

2017.

48. Ferreira M. Técnicas electroquímicas para la determinación y especiación de arsénico en aguas. BEROARSEN: Metodologías analíticas para la determinación y especiación de arsénico en aguas y suelos, eds MI Litter, MA Armienta, SS Farías CYTED. 2009.

49. INACAL. Directriz para la validación de métodos de ensayo. 2017(Versión 00).

50. (FAO) Odlnuplayla. Taller subregional sobre aseguramiento de calidad y validación de metodología para análisis químicos. Colombia. 2005.

51. Chile Idsp-. Guía técnica de Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: "Aspectos generales sobre la validación de métodos". 2010.

52. (OAA) OAdA. Guia para la validación de métodos de ensayo. Versión 1. 2013.

53. Jurado JM. Aplicación de Microsoft Excel a la Química Analítica: validación de métodos analíticos. Sevilla: Universidad de Sevilla-Departamento de Química Analítica. 2008.

54. González AG, Herrador MÁ. A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. TrAC Trends in Analytical Chemistry. 2007;26(3):227-38.

55. Medina Pérez JM. Determinación de Clorpirifos en leche de vacuno por Voltamperometría, HPLC y GC-MS y su alternativa de remoción con micorrizas arbusculares, Arequipa-2012. Tesis. Arequipa: 2014.

56. Bonilla Ccuno E. Evaluación Voltamperométrica de los niveles de Cd y Pb en vino tinto producidos en la región de Arequipa en el periodo 2016. Tesis. Arequipa: 2018.

57. Christian GD. Química Analítica. Washington: Mc Graw Hill.

58. Hall B, Thiex N. A key step in the path to the official methods of analysis (OMA). 2010.

59. AOAC Guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals. 2002.

60. Guido LF, Fortunato NA, Rodrigues JA, Barros AA. Voltammetric assay for the aging of beer. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2003;51(14):3911-5.
61. Dagnino J. Análisis de varianza. *Rev chil anest*. 2014;43(4):306-10.
62. Sánchez Turcios RA. t-Student: Usos y abusos. *Revista mexicana de cardiología*. 2015;26:59-61.
63. Garcia Calvo MF. Una nueva prueba para el problema de igualdad de varianzas.
64. Guideline IHT, editor *Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1)*. International Conference on Harmonization, Geneva, Switzerland; 2005.
65. Feldsine P, Abeyta C, Andrews WH. AOAC International methods committee guidelines for validation of qualitative and quantitative food microbiological official methods of analysis. *Journal of AOAC International*. 2002;85(5):1187-200.
66. Quinchiguango Q, Lucía M. Validación del método para determinación del silicio asimilable en suelos mediante absorción atómica en la empresa Agrocalidad: Quito: UCE; 2017.
67. Paredes Ayala ASI. Validación del método analítico por espectrofotometría uv/vis para la cuantificación de albendazol en suspensiones comerciales”. 2015.
68. Ramaswamy A, Arul Gnana Dhas AS. Development and validation of analytical method for quantitation of Emtricitabine, Tenofovir, Efavirenz based on HPLC. *Arabian Journal of Chemistry*. 2018;11(2):275-81.
69. Mörschbacher AP, Dullius A, Dullius CH, Bandt CR, Kuhn D, Brietzke DT, et al. Validation of an analytical method for the quantitative determination of selenium in bacterial biomass by ultraviolet-visible spectrophotometry. *Food Chemistry*. 2018;255:182-6.
70. García Quispe JP. Validación de la técnica analítica por espectrofotometría uv-visible para la cuantificación e identificación de riboflavina. 2016.

71. López ÁM, Garzón WF, Rosero-Moreano M, Taborda G. Analysis of cocaine in different samples by gas chromatography flame ionization detector (GC-FID). *Revista Colombiana de Química*. 2015;44(1):19-22.
72. Fu Q, Chen M, Hu S, McElroy CA, Mathijssen RH, Sparreboom A, et al. Development and validation of an analytical method for regorafenib and its metabolites in mouse plasma. *Journal of Chromatography B*. 2018;1090:43-51.
73. Alquadeib BT. Development and validation of a new HPLC analytical method for the determination of diclofenac in tablets. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2018.
74. Furlanetto S, Orlandini S, Aldini G, Gotti R, Dreassi E, Pinzauti S. Designing experiments to optimise and validate the adsorptive stripping voltammetric determination of nimesulide. *Analytica Chimica Acta*. 2000;413(1):229-39.
75. Vareli CS, Pizzutti IR, Gebler L, Cardoso CD, Gai DSH, Fontana MEZ. Analytical method validation to evaluate dithiocarbamates degradation in biobeds in South of Brazil. *Talanta*. 2018;184:202-9.
76. Ryu D, Choi B, Kim N, Koh E. Validation of analytical methods for ethyl carbamate in nine food matrices. *Food Chemistry*. 2016;211:770-5.
77. Saint-Hilaire M, Bertin T, Inthavong C, Lavison-Bompard G, Guérin T, Fournier A, et al. Validation of analytical methods for chlordecone and its metabolites in the urine and feces of ewes. *Journal of Chromatography B*. 2018;1093-1094:66-76.