

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS**  
**FACULTAD DE INGENIERÍA**  
**CARRERA DE INGENIERÍA QUÍMICA**



**TRABAJO DIRIGIDO**

**“DETERMINACIÓN DE ISO- $\alpha$  E ISO- $\alpha$  ÁCIDOS REDUCIDOS EN CERVEZA POR CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC) DE FASE INVERSA USANDO GRADIENTE DE ELUCIÓN PARA LA CERVECERIA BOLIVIANA NACIONAL S.A.”**

**PARA OPTAR AL TITULO DE**

**INGENIERO QUÍMICO**

POSTULANTE: MARCELO MEDRANO TAPIA

TUTORES: ING. CRISTHIAN CARRASCO VILLANUEVA, Ph.D.

ING. ROLANDO MIGUEL CONTRERAS USEGLIO

**LA PAZ – BOLIVIA**

**2021**



**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS  
FACULTAD DE INGENIERIA**



**LA FACULTAD DE INGENIERIA DE LA UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS AUTORIZA EL USO DE LA INFORMACIÓN CONTENIDA EN ESTE DOCUMENTO SI LOS PROPÓSITOS SON ESTRICTAMENTE ACADÉMICOS.**

**LICENCIA DE USO**

El usuario está autorizado a:

- a) Visualizar el documento mediante el uso de un ordenador o dispositivo móvil.
- b) Copiar, almacenar o imprimir si ha de ser de uso exclusivamente personal y privado.
- c) Copiar textualmente parte(s) de su contenido mencionando la fuente y/o haciendo la cita o referencia correspondiente en apego a las normas de redacción e investigación.

El usuario no puede publicar, distribuir o realizar emisión o exhibición alguna de este material, sin la autorización correspondiente.

**TODOS LOS DERECHOS RESERVADOS. EL USO NO AUTORIZADO DE LOS CONTENIDOS PUBLICADOS EN ESTE SITIO DERIVARA EN EL INICIO DE ACCIONES LEGALES CONTEMPLADAS EN LA LEY DE DERECHOS DE AUTOR.**

## **DEDICATORIA**

El presente proyecto de grado va dedicado a Dios, quien como guía estuvo presente en el caminar de mi vida, bendiciéndome y dándome fuerzas para continuar con mis metas trazadas sin desfallecer. A mis padres, que con su apoyo incondicional, amor y confianza permitieron que logre culminar esta etapa de mi vida.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Cervecería Boliviana Nacional S.A. área de Calidad de Planta La Paz por darme la oportunidad de realizar este trabajo dirigido.

Al Instituto de Investigación y Desarrollo de Procesos Químicos (IIDEPROQ) por aceptarme en sus instalaciones.

Agradezco a mis tutores Ing. Cristhian Carrasco Villanueva Ph.D. e Ing. Rolando Miguel Contreras Useglio quienes con su experiencia, conocimiento y motivación me orientaron en el desarrollo del trabajo dirigido.

Finalmente, a las empresas: SPEKTRA LTDA., IMPELAB S.R.L., OBERÓN S.R.L. y CORIMEX LTDA. por brindarme la información pertinente para este trabajo.

## RESUMEN EJECUTIVO

En el presente trabajo se implementó y validó un método de Cromatografía Líquida de Alta Resolución de fase reversa (RP-HPLC por sus siglas en inglés) para la determinación simultánea de Iso- $\alpha$ -ácidos y Tetrahidro-iso- $\alpha$ -ácidos en muestras de cerveza, además se estimó una estructura de costos para la prestación del servicio de análisis de estos analitos en el IIDEPROQ para la Cervecería Boliviana Nacional S.A.

La separación se realizó sobre una columna C18 de fase reversa empleando gradiente de elución y tratamientos previos de la muestra. El método ha sido estadísticamente validado en términos de linealidad, repetibilidad, límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ) dentro de un rango de concentración establecido, posteriormente la cuantificación de Iso- $\alpha$ -ácidos y Tetrahidro-iso- $\alpha$ -ácidos en muestras de cerveza se expresaron con sus correspondientes intervalos de confianza.

La estructura de costos fue conformada por costos fijos, variables y otros (gastos administrativos, utilidades e impuestos), éstos se fundamentaron en cotizaciones de productos y servicios indispensables.

Se demostró que el método analítico es lineal con coeficientes de correlación de 0,9986 y 0,9999 para los Iso- $\alpha$ -ácidos y Tetrahidro-iso- $\alpha$ -ácidos respectivamente, además es repetible para ambos analitos porque sus coeficientes de variación son menores al 2%. El error asociado a la concentración de los analitos en las muestras analizadas fue inferior al 5%. El precio unitario calculado a partir de la estructura de costos reveló una tendencia a disminuir a medida que se incrementó la cantidad de inyecciones.

Palabras clave:

Cromatografía Líquida de Alta Resolución, Fase reversa, Cerveza, Iso- $\alpha$ -ácido, Tetrahidro-iso- $\alpha$ -ácido, Validación, Estructura de costos.

## **ABSTRACT**

In the present work, a reverse phase high performance liquid chromatographic method (RP-HPLC) method has been implemented and validated for the simultaneous determination of Iso- $\alpha$ -acids and Tetrahydro-iso- $\alpha$ -acids in beer samples, furthermore, a structure cost was estimated for the analysis provision service of these analytes at the IIDEPROQ for a future services of Cervecería Boliviana Nacional S.A.

The separation was performed on a C18 reverse phase column using gradient elution and previous treatments of the sample. The method has been statistically validated in terms of linearity, repeatability, limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) within an established concentration range, subsequently the quantification of Iso- $\alpha$ -acids and Tetrahydro-iso- $\alpha$ - Acids in beer samples were expressed with their corresponding confidence intervals.

The cost structure was made up of fixed, variable and other costs (administrative expenses, profits and taxes), these were based on quotations of indispensables products and services.

It has been proved that the analytical method is linear with correlation coefficients of 0.9986 and 0.9999 for Iso- $\alpha$ -acids and Tetrahydro-iso- $\alpha$ -acids respectively; it is also repeatable for both analytes because their coefficients of variation are lower than 2%. The associated error with the concentration of the analytes in the analyzed samples was less than 5%. The unit price was calculated from the cost structure and showed a tendency to decrease as the number of injections increased.

Keywords:

High Performance Liquid Chromatography, Reverse Phase, Beer, Iso- $\alpha$ -acid, Tetrahydro-iso- $\alpha$ -acid, Validation, Cost structure.

## INDICE GENERAL

1. GENERALIDADES .....	1
1.1. Introducción.....	1
1.2. Antecedentes .....	2
1.3. Planteamiento del problema.....	3
1.4. Justificación del Trabajo a realizar .....	3
1.5. Objetivos .....	3
1.5.1. Objetivo general.....	3
1.5.2. Objetivos específicos.....	3
1.6. Metas .....	4
1.7. Alcance .....	4
1.7.1. Alcance académico.....	4
1.7.2. Alcance social.....	4
1.7.3. Alcance económico.....	4
1.8. Limitaciones .....	5
2. MARCO TEÓRICO .....	6
2.1. El lúpulo .....	6
2.1.1. Historia .....	6
2.1.2. Composición del lúpulo y propiedades de sus componentes .....	6
2.1.3. Productos del lúpulo .....	12
2.1.4. Beneficios de la cerveza para la salud .....	16
2.1.5. Beneficios de los compuestos en estudio para la salud .....	17
2.2. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).....	17
2.2.1. Historia .....	17
2.2.2. Definición y conceptos fundamentales .....	18
2.2.3. Mecanismos de ensanchamiento de banda .....	21
2.2.4. Componentes de un Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución .....	25
2.3. Validación del método.....	30
2.3.1. Definición.....	30
2.3.2. Características de los compuestos analizados.....	31
2.3.3. Consideraciones.....	32
2.3.4. Criterios para la validación .....	33
3. DESCRIPCIÓN DE LA METODOLOGÍA.....	35
3.1. Equipos .....	35
3.2. Material de Laboratorio .....	39
3.3. Reactivos y Estándares.....	40
3.3.1. Reactivos.....	40
3.3.2. Estándares .....	40
3.4. Estudio de validación del método.....	40
3.4.1. Rango de trabajo .....	40
3.4.2. Linealidad .....	41

3.4.3.	Precisión.....	45
3.4.4.	Límite de detección (LOD) y Límite de cuantificación (LOQ).....	46
3.5.	Muestreo.....	47
3.5.1.	Identificación.....	47
3.5.2.	Almacenamiento.....	47
3.5.3.	Acondicionamiento.....	48
3.6.	Cuantificación de IAA y THIAA en muestras de cerveza.....	48
3.6.1.	Procedimiento.....	48
3.6.2.	Criterios de aceptación.....	50
3.7.	Estructura de costos.....	50
3.7.1.	Costos fijos mensuales.....	51
3.7.2.	Costos variables mensuales.....	52
4.	TRABAJO Y ACTIVIDADES DESARROLLADAS.....	53
4.1.	Trabajo desarrollado.....	53
4.1.1.	Limpieza del área de trabajo.....	53
4.1.2.	Trabajo preliminar a la implementación del método.....	53
4.1.3.	Verificación del equipo previo a su uso.....	54
4.1.4.	Control del funcionamiento y uso del equipo.....	55
4.1.5.	Mantenimiento preventivo del equipo.....	56
4.2.	Actividades realizadas.....	56
4.2.1.	Preparación de las fases móviles.....	56
4.2.2.	Desgasificación de las fases móviles.....	56
4.2.3.	Activación de la columna cromatográfica.....	56
4.2.4.	Seguimiento del desempeño de la columna cromatográfica.....	57
4.2.5.	Preparación e inyección de las soluciones estándar de trabajo y muestras.....	57
5.	RESULTADOS LOGRADOS.....	58
5.1.	Estudio de validación del método.....	58
5.1.1.	Linealidad.....	58
5.1.2.	Precisión.....	61
5.1.3.	Límite de detección (LOD) y Límite de cuantificación (LOQ).....	65
5.2.	Muestreo.....	65
5.3.	Cuantificación de IAA y THIAA en muestras de cerveza.....	66
5.4.	Estructura de costos.....	67
5.4.1.	Servicio de energía eléctrica y agua potable.....	67
5.4.2.	Precio de los reactivos.....	68
5.4.3.	Precio de los materiales.....	68
5.4.4.	Precio de los consumibles del cromatógrafo líquido.....	69
5.4.5.	Depreciación.....	69
5.4.6.	Potencia eléctrica de los equipos de laboratorio.....	70
5.4.7.	Costos fijos y variables mensuales.....	70
5.4.8.	Precio unitario.....	71



6. EVALUACIÓN.....	72
6.1. Estudio de validación del método.....	72
6.1.1. Linealidad.....	72
6.1.2. Precisión.....	73
6.1.3. Límite de detección (LOD) y Límite de cuantificación (LOQ).....	74
6.2. Cuantificación de IAA y THIAA en muestras de cerveza.....	74
6.3. Estructura de costos.....	76
7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	77
7.1. Conclusiones.....	77
7.2. Recomendaciones.....	78
8. BIBLIOGRAFÍA.....	80
ANEXOS .....	83

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Estructura de los $\beta$ -ácidos.....	7
Figura 2.2. Mecanismo de isomerización de los $\alpha$ -ácidos.....	8
Figura 2.3. Terpenos mayoritarios encontrados en el aceite esencial de lúpulo .....	10
Figura 2.4. Enantiómeros del linalool .....	11
Figura 2.5. Estructura de un antocianógeno.....	12
Figura 2.6. Vista simplificada de la cromatografía de fase inversa.....	18
Figura 2.7. Picos que eluyen a varios valores de resolución.....	21
Figura 2.8. Representación gráfica de la ecuación de Van Deemter .....	24
Figura 2.9. Componentes esenciales de un sistema cromatográfico .....	25
Figura 2.10. Sistema de formación de gradiente de baja presión .....	26
Figura 2.11. Isómeros de los iso- $\alpha$ -ácidos.....	31
Figura 2.12. Isómeros de los tetrahidro-iso- $\alpha$ -ácidos.. ..	32
Figura 3.1. Balanza analítica .....	35
Figura 3.2. Baño de ultrasonidos.....	36
Figura 3.3. Columna cromatográfica. ....	36
Figura 3.4. Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución.....	37
Figura 3.5. Bomba de vacío .....	37
Figura 3.6. Micropipetas.....	38
Figura 3.7. pH-metro .....	38
Figura 3.8. Purificador de agua tipo 1 .....	39
Figura 4.1. Revisión de las fases móviles. ....	54
Figura 4.2. Instalación de la columna.....	55
Figura 4.3. Hoja de control del Cromatógrafo.....	55
Figura 4.4. Registro de limpieza posterior a los análisis. ....	56
Figura 4.5. Introducción de muestras en el automuestreador .....	57
Figura 5.1. Recta de calibración para IAA.....	59
Figura 5.2. Recta de calibración para THIAA .....	59
Figura 5.3. Gráfico de normalidad para la réplica 1 de IAA.....	61
Figura 5.4. Gráfico de normalidad para la réplica 2 de IAA.....	62
Figura 5.5. Gráfico de normalidad para la réplica 3 de IAA.....	62
Figura 5.6. Gráfico de normalidad para la réplica 1 de THIAA .....	63
Figura 5.7. Gráfico de normalidad para la réplica 2 de THIAA .....	63
Figura 5.8. Gráfico de normalidad para la réplica 3 de THIAA.....	64
Figura 5.9. Elementos muestreados.....	65

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1. Composición del lúpulo seco .....	7
Tabla 2.2. Fases móviles empleadas en cromatografía de fase inversa .....	29
Tabla 2.3. Tampones comunes para cromatografía de fase inversa.....	30
Tabla 3.1. Rango de trabajo .....	41
Tabla 3.2. Criterios de aceptación para el estudio de linealidad .....	44
Tabla 3.3. Criterios de aceptación para el estudio de repetibilidad .....	46
Tabla 3.4. Formulario para registro de las muestras .....	47
Tabla 3.5. Criterios de aceptación para los ítems analizados .....	50
Tabla 4.1. Modificación al método analítico proporcionado.....	53
Tabla 5.1. Respuestas obtenidas para la linealidad .....	58
Tabla 5.2. Resultados de la regresión lineal .....	58
Tabla 5.3. Valores del estadístico t para evaluar la regresión lineal.....	60
Tabla 5.4. Valores del estadístico t para evaluar la pendiente .....	60
Tabla 5.5. Valores del estadístico t para evaluar el intercepto .....	60
Tabla 5.6. Intervalos de confianza de la pendiente y ordenada en el origen.....	60
Tabla 5.7. Respuestas obtenidas para la repetibilidad.....	61
Tabla 5.8. Coeficientes de variación calculados.....	64
Tabla 5.9. Valores de “G” del Test de Cochran .....	64
Tabla 5.10. Límites de detección y cuantificación .....	65
Tabla 5.11. Registro y codificación de las muestras analizadas .....	66
Tabla 5.12. Error absoluto de la concentración de IAA .....	66
Tabla 5.13. Error absoluto de la concentración de THIAA .....	66
Tabla 5.14. Resultados del parámetro Iso- $\alpha$ -ácido.....	67
Tabla 5.15. Resultados del parámetro Tetrahidro-iso- $\alpha$ -ácido .....	67
Tabla 5.16. Tarifa de los servicios de energía eléctrica y agua potable .....	67
Tabla 5.17. Precios unitarios de los reactivos utilizados en el método.....	68
Tabla 5.18. Precios unitarios de los materiales utilizados en el método .....	68
Tabla 5.19. Precios de los consumibles utilizados en el método.....	69
Tabla 5.20. Depreciación del Cromatógrafo.....	69
Tabla 5.21. Potencia eléctrica de los equipos de laboratorio .....	70
Tabla 5.22. Costos fijos y variables mensuales para 24 inyecciones.....	70
Tabla 5.23. Precio unitario para el análisis de una muestra por duplicado .....	71
Tabla 6.1. Evaluación estadística de los resultados de la linealidad .....	72
Tabla 6.2. Evaluación de la normalidad para la precisión .....	73
Tabla 6.3. Comparación de los resultados del coeficiente de variación .....	73
Tabla 6.4. Evaluación estadística de la homogeneidad de varianzas .....	74
Tabla 6.5. Evaluación de la concentración de IAA en ítems analizados .....	74
Tabla 6.6. Evaluación de la concentración de THIAA en ítems analizados.....	75
Tabla 6.7. Artículos que influyen considerablemente en el precio unitario .....	76
Tabla 6.8. Comparación del precio unitario con y sin fondo de acreditación.....	76

## ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A. Metodología para la conservación de los estándares.....	84
ANEXO B. Cromatogramas del estándar de IAA .....	85
ANEXO C. Cromatogramas del estándar THIAA .....	95
ANEXO D. Validación del método analítico.....	105
ANEXO E. Cromatogramas de las cervezas analizadas.....	108
ANEXO F. Cuantificación de los analitos en muestras de cerveza .....	114
ANEXO G. Cotizaciones .....	116
ANEXO H. Estructura de costos.....	121
ANEXO I. Rango de IAA para diferentes estilos de cervezas .....	127

## SIMBOLOGÍA Y/O NOMENCLATURA

ACN	Acetonitrilo
H.E.T.P.	Altura equivalente a un plato teórico
$w_b$	Ancho del pico
Å	Angstrom
Bs	Bolivianos
°C	Centígrado
cm	Centímetro
THIAA 3	Cis-tetrahidro-iso-adhumulona
THIAA 1	Cis-tetrahidro-iso-cohumulona
THIAA 4	Cis-tetrahidro-iso-humulona
r	Coefficiente de correlación
$R^2$	Coefficiente de determinación
$D_m$	Coefficiente de difusión del soluto en el solvente
$D_s$	Coefficiente de difusión del soluto en la fase estacionaria
$RSD_{\text{calculado}}$	Coefficiente de variación calculado
$RSD_{\text{HORWITZ}(r)}$	Coefficiente de variación de Horwitz
c	Concentración
$X_i$	Concentraciones de estudio
$\gamma$	Constante que depende del relleno y calidad del empaque
$\lambda$	Constante que evalúa el espacio ocupado por la fase móvil
RP-HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución de Fase Reversa
D.C.	Después de Cristo
$S_b$	Desviación estándar de la pendiente
$S_a$	Desviación estándar de la respuesta
$\sigma$	Desviación estándar del pico
$S_{X0}$	Desviación estándar estimada de la concentración
S	Desviación estándar
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
DTA	Dirección Técnica de Acreditación
DMDS	Disulfuro de dimetilo
G	Estadístico de Cochran
$k'$	Factor de capacidad
$\alpha$	Factor de selectividad
$f_m$	Factor dependiente a la velocidad lineal de la fase móvil
UPS	Fuente de poder ininterrumpido
g	Gramo
IMC	Índice de masa corporal
IAA	Iso- $\alpha$ -ácido
kg	Kilogramo
kW	Kilowatt
kWh	Kilowatt-hora
LOQ	Límite de cuantificación
LOD	Límite de detección
L	Litro
MPa	Megapascal

MeOH	Metanol
m <sup>3</sup>	Metro cúbico
µm	Micra
µL	Microlitro
µS	Microsiemens
mM	Mili molar
mg	Miligramo
mL	Mililitro
mm	Milímetro
min	Minuto
nm	Nanómetro
GABA	Neurotransmisor γ-aminobutírico
n	Número de ensayos
N	Número de platos teóricos
m	Número de réplicas
k	Número de varianzas
a	Ordenada en el origen
ppb	Partes por billón
ppm	Partes por millón
b	Pendiente de la recta de calibración
P'	Polaridad del solvente
PEEK	Polieteretercetona
P	Presión
d <sub>f</sub>	Profundidad del poro
X <sub>p</sub>	Promedio
R <sub>s</sub>	Resolución
Y <sub>i</sub>	Respuestas
d <sub>p</sub>	Tamaño de partícula
T	Temperatura
A	Término de difusión de Eddy
B	Término de difusión longitudinal
C	Término de resistencia a la transferencia de masa
THIAA	Tetrahidro-iso-α-ácido
t <sub>R</sub>	Tiempo de retención
t <sub>0</sub>	Tiempo muerto
IAA 1	Trans-iso-cohumulona
IAA 2	Trans-(iso-humulona + iso-adhumulona)
THIAA 5	Trans-tetrahidro-(iso-adhumulona + iso-humulona)
THIAA 2	Trans-tetrahidro-iso-cohumulona
DMTS	Trisulfuro de dimetilo
UV	Ultra violeta
Y <sub>0</sub>	Respuesta del equipo al analizar muestras de cerveza
X <sub>0</sub>	Concentración de los analitos en cerveza
S <sup>2</sup> <sub>x,y</sub>	Varianza residual
u	Velocidad lineal de flujo
W	Watt W

# CAPITULO I

## 1. GENERALIDADES

### 1.1. Introducción

Una de las preocupaciones comunes de las nacientes repúblicas latinoamericanas, a inicios del siglo XIX, fue la de conformar instituciones lo suficientemente estables y modernas como para satisfacer las necesidades de su población: seguridad, progreso, educación, industria, etc. Los modelos europeos sirvieron entonces de referente para aspirar al desarrollo y muchos alemanes cruzaron mar y montañas para sumarse a esos sueños, Bolivia no fue excepción y la ciudad de La Paz se contó entre las más beneficiadas de la migración germana (Oficialía Mayor de Culturas, 2020).

En 1877, surgió la fábrica de cerveza, propiedad del señor Alejandro Wolf, bajo la razón social de “Wolf & Cía.”, fábrica que posteriormente tomó el nombre de Cervecería Americana y luego Cervecería Nacional (Comunicaciones, 2020).

El 20 de octubre de 1886 se fusionan la Cervecería Nacional con la Cervecería Americana en la ciudad de La Paz y juntas forman lo que hoy es la Cervecería Boliviana Nacional, siendo los propietarios los señores Federico Groenewold, Luis Ernst, Hugo Preuss y Eugenio Stohmann. Paulatinamente esta cerveza fue expandiéndose al resto del país y es así que el producto fue adquiriendo el nombre de Paceña, refiriéndose a la cerveza producida en la ciudad de la Paz. En los años 50 se volvió a renovar la maquinaria para mantener la fábrica en óptimo nivel de desarrollo tecnológico (Comunicaciones, 2020).

A fines de 1986 el Sr. Max Fernández Rojas, es invitado por el Directorio para ejercer las funciones de Director General Ejecutivo. Al año siguiente es nombrado Presidente Ejecutivo, iniciándose así una nueva etapa en la vida institucional de Cervecería Boliviana Nacional (Comunicaciones, 2020).

El proyecto de la Planta CBN en Santa Cruz, se puso en marcha en 1992 con una moderna infraestructura, contribuyendo a la economía de la región y generando empleos tanto directos, como indirectos (Comunicaciones, 2020).

En noviembre de 1995 se inauguró la Planta de ENALBO ubicada en la ciudad de Oruro, la misma fabrica envases de aluminio cuya producción está destinada a satisfacer las demandas de la empresa a nivel nacional (Comunicaciones, 2020).

Entre los años 2001 y 2003, como consecuencia de dos procesos de fusión, la Sociedad incrementó su patrimonio, incorporando, a partir del 1 de agosto de 2001, los patrimonios de Cervecería Boliviana Nacional Santa Cruz S.A., Cervecería Santa Cruz S.A. y Cervecería Bavaria Unión Tarija S.A.; y a partir del 1 de enero de 2003, los patrimonios de Cervecería Taquiña S.A. y Envases de Aluminio Boliviano S.R.L.

(Enalbo S.R.L.). Desde el 2007, la CBN forma parte de las empresas cerveceras más importantes del mundo a través de AB Inbev (Comunicaciones, 2020).

AB Inbev es una empresa belga-brasileña. Es el mayor fabricante del mundo de cerveza por volumen, emplea alrededor de 77.000 trabajadores y tiene su central en Lovaina, Bélgica. El 9 de octubre de 2009, Cervecería Boliviana Nacional S.A. incorporó, mediante un proceso de fusión por absorción, a la empresa Bebidas y Aguas Gaseosas de Occidente S.R.L. (ByAGO S.R.L.), con lo cual integró a su patrimonio dos plantas de elaboración y envasado de bebidas gaseosas (Comunicaciones, 2020).

Hoy en día la Cervecería Boliviana Nacional cuenta con 8 Plantas distribuidas en las ciudades de La Paz, El Alto, Santa Cruz, Cochabamba, Oruro y Tarija, donde cinco de las cuales son cerveceras, dos son de bebidas gaseosas y la restante es una planta de producción de latas de aluminio. Es la empresa líder en Responsabilidad Social Empresarial y la número uno en el mercado de cervezas en todo el País, también cuenta con un mercado externo en países como Estados Unidos, España y Japón (Comunicaciones, 2020).

## **1.2. Antecedentes**

La cerveza es una bebida alcohólica elaborada a base de agua, cebada, lúpulo y levadura. Entre sus principales características de calidad se encuentra el sabor, amargor y la retención de espuma, atribuidos principalmente a los iso- $\alpha$ -ácidos, estos compuestos fotosensibles provienen de la isomerización del lúpulo durante la etapa de cocción del mosto.

A pesar de que la cerveza se envasa en botellas marrones, que la protegen de la luz ultravioleta, son vulnerables a la luz visible que ocasiona cambios en la intensidad y calidad del amargor, además genera un mal sabor, denominado “sabor golpeado por luz”, conocido en inglés como lightstruck flavor (Caballero, Blanco, & Porras, 2012).

Para elaborar cervezas estables a la acción de la luz, es importante la adición de iso- $\alpha$ -ácidos reducidos (que se clasifican en rho-iso- $\alpha$ -ácidos, tetrahidro-iso- $\alpha$ -ácidos y hexahidro-iso- $\alpha$  ácidos), estos compuestos también benefician a la vida útil de la bebida, incluso con un envejecimiento prolongado forzado, dando lugar a una mayor consistencia de amargor y espuma (Caballero, Blanco, & Porras, 2012).

Las técnicas para el análisis de los ácidos del lúpulo en la cerveza han mejorado con la evolución de la tecnología para medirlos. El primer método fue el análisis sensorial en el que se juzgaba si una cerveza tenía un sabor suficientemente amargo, en los años siguientes, con la invención de los espectrofotómetros, se implementaron las unidades de amargor IBU (International Bitterness Units) para la cuantificación del amargor en la cerveza por absorbancia UV (Clark, Burroughs, & Guzinski, 1998).



### **1.3. Planteamiento del problema**

La determinación de iso- $\alpha$ -ácidos e iso- $\alpha$ -ácidos reducidos en cervezas es fundamental porque sus concentraciones permiten controlar el nivel de amargor y la estabilidad de la espuma en el producto terminado, logrando de esa manera elaborar una cerveza con mayor vida útil y cumpliendo las especificaciones de calidad.

Los tetrahidro-iso- $\alpha$ -ácidos son los compuestos que refuerzan el amargor, el problema radica en la falta de un método analítico que sea capaz de distinguir este compuesto de los iso- $\alpha$ -ácidos en muestras de cerveza.

Los métodos convencionales determinan otros componentes de la cerveza que no están relacionados con el amargor y proporcionan un valor global del mismo. La falta de selectividad de estos métodos no permite conocer la contribución específica de los iso- $\alpha$ -ácidos y tetrahidro-iso- $\alpha$ -ácidos al amargor de la cerveza.

Es por estas razones que la necesidad de la Cervecería Boliviana Nacional S.A. es la de implementar un método que pueda determinar los iso- $\alpha$ -ácidos y tetrahidro-iso- $\alpha$ -ácidos en muestras de cerveza.

### **1.4. Justificación del Trabajo a realizar**

El presente trabajo dirigido tiene la finalidad de coadyuvar de manera técnica al área de Calidad de la Cervecería Boliviana Nacional S.A. a través de la implementación y validación de un método basado en cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa empleando la elución en gradiente para la cuantificación de iso- $\alpha$ -ácidos y tetrahidro-iso- $\alpha$ -ácidos en cervezas tipo Pilsener, así también ofrecer el servicio de análisis fundamentado en una estructura de costos conformada por costos fijos y variables.

### **1.5. Objetivos**

#### **1.5.1. Objetivo general**

Implementar el método de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) para la determinación de iso- $\alpha$  e iso- $\alpha$  ácidos reducidos en muestras de cerveza en el IIDEPROQ para la Cervecería Boliviana Nacional S.A.

#### **1.5.2. Objetivos específicos**

- Aplicar Cromatografía Líquida de Alta Resolución de fase inversa (RP-HPLC) usando gradiente de elución con base a un método específico para la elución e identificación de los analitos relevantes para la Cervecería Boliviana Nacional S.A.
- Realizar el estudio de validación del método analítico.
- Cuantificar los analitos de interés en muestras de cerveza.

- Estimar una estructura de costos para el análisis de muestras de cerveza en el Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución realizado en el IIDEPROQ.

## **1.6. Metas**

- Incrementar las habilidades del analista y verificar el funcionamiento apropiado del Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución para el propósito requerido.
- Demostrar que el método analítico es adecuado para el fin previsto y capaz de entregar resultados confiables.
- Incorporar un parámetro dentro de los análisis rutinarios que se efectúan en el área de Calidad de la Cervecería Boliviana Nacional S.A. para mejorar la calidad del producto.
- Establecer un convenio entre la Cervecería Boliviana Nacional S.A. y el IIDEPROQ, perteneciente a la carrera de Ingeniería Química de la Universidad Mayor de San Andrés para la prestación del servicio de análisis de muestras de cerveza.

## **1.7. Alcance**

### **1.7.1. Alcance académico**

El alcance académico de este trabajo dirigido es el de aplicar de manera práctica los conocimientos adquiridos durante la formación en la carrera de Ingeniería Química, sobre todo fundamentos de Química Analítica y Estadística.

### **1.7.2. Alcance social**

Entregar resultados confiables de los compuestos de interés a través de un método validado que sean de utilidad para la elaboración de cervezas caracterizadas por ser resistentes a la luz y tener un amargor perdurable.

### **1.7.3. Alcance económico**

El alcance económico del presente trabajo dirigido es el de establecer una estructura de costos para ofrecer el servicio de análisis de muestras de cerveza mediante el método analítico implementado y validado en el IIDEPROQ para la Cervecería Boliviana Nacional S.A.

## 1.8. Limitaciones

- En este trabajo no se incluyó información sobre las condiciones operacionales y procedimientos del método por la confidencialidad y propiedad intelectual de la empresa.
- Los compuestos de interés fueron cuantificados en muestras de cerveza tipo Pilsener.
- No se realizó comparaciones inter-laboratorios debido a la falta de otros laboratorios que realicen el análisis de la matriz cerveza por cromatografía líquida de alta resolución.
- La estructura de costos es una aproximación ya que la misma se encuentra sujeta a la variación de los precios de los reactivos, materiales e insumos de las distintas empresas proveedoras. (el periodo de recolección de información comprende principalmente la gestión 2019).



## CAPITULO II

### 2. MARCO TEÓRICO

#### 2.1. El lúpulo

##### 2.1.1. Historia

A pesar de que la planta de lúpulo crece en el hemisferio Sur, es originaria del hemisferio Norte pues sus orígenes radican en Asia (Stewart, Anstruther, & Russell, 2017).

En el año 822 D.C., fue inaugurado el convento de Corbay, en Weser en el norte de Alemania por los monjes de Picardy, ellos incorporaron el uso del lúpulo en la elaboración de cerveza porque antes su uso era con fines medicinales (Verzele & De Keukeleire, 1991).

A partir del siglo XII D.C. el lúpulo fue empleado en las cervecerías alemanas (Verzele & De Keukeleire, 1991).

En el siglo XIV D.C., se comenzó a cultivar el lúpulo en Flanders por incentivo de Juan sin miedo, Duque de Borgoña. Posteriormente en el año 1629 esta planta fue introducida a Norte América por Massachusetts Company y años después comenzó en Japón y la URSS (Verzele & De Keukeleire, 1991).

##### 2.1.2. Composición del lúpulo y propiedades de sus componentes

El lúpulo, clasificado botánicamente como *Humulus lupulus* es una planta trepadora perteneciente a la familia de la Cannabinaceae, sólo las flores o conos de la planta femenina son de interés para los cerveceros ya que su valor radica en las resinas y aceites esenciales que se encuentran en las glándulas de lupulina (Fix, 1999).

Se agrega durante el cocimiento del mosto para otorgar a la cerveza sabor, aroma y estabilidad de la espuma. Los componentes del lúpulo de mayor interés para la industria cervecera son las Humulonas que consisten en tres  $\alpha$ -ácidos: humulona, cohumulona y adhumulona (Khatib, Kyong Kim, Wilson, & Verpoorte, 2006).

La calidad de la cerveza es influenciada por la composición del lúpulo, en su materia seca éste tiene la siguiente composición:

**Tabla 2.1.** Composición del lúpulo seco

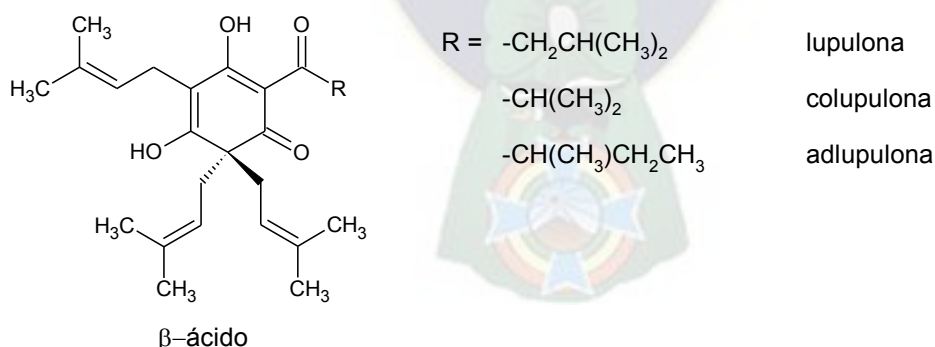
Componente	Porcentaje (% p / p)
Compuestos amargos ( $\alpha$ -ácidos y $\beta$ -ácidos)	18,50%
Aceite de lúpulo	0,50%
Taninos	3,50%
Proteína	20,00%
Substancias Minerales	8,00%

**Fuente:** Kunze & Manger, 2004

El resto está compuesto por celulosa y otras sustancias que no son de interés en la elaboración de cerveza. Fuera de la proteína, los compuestos amargos representan una presencia importante en el lúpulo (18,5%). También por sus características el aceite de lúpulo es de mayor importancia porque influye en el aroma de la cerveza (Kunze & Manger, 2004).

### 2.1.2.1. Compuestos Amargos o Resinas del Lúpulo

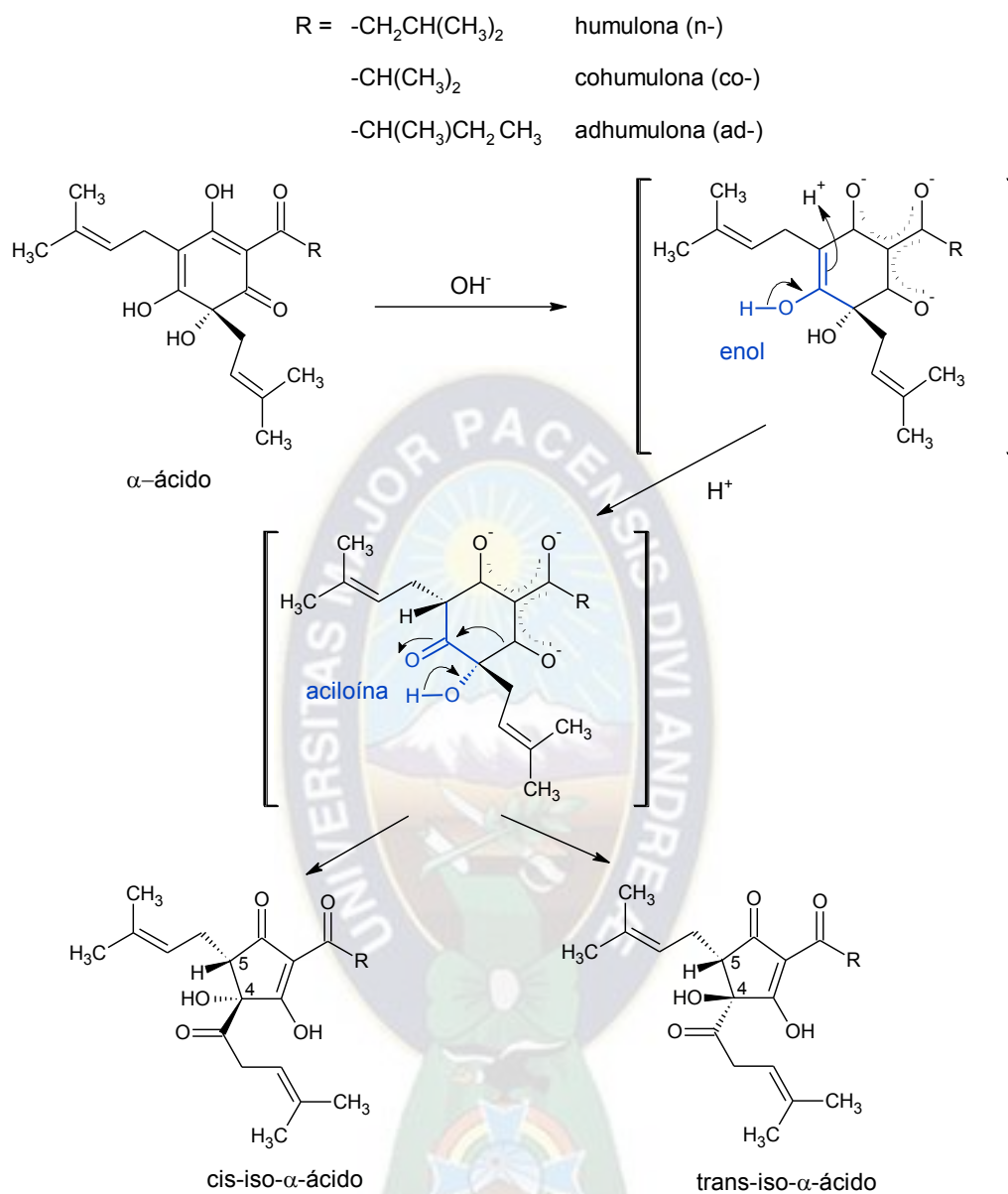
Durante el proceso de maduración de la planta de lúpulo contiene  $\beta$ -ácidos (30 - 55% lupulona; 20 - 55% colupulona; y 5 - 10% adlupulona) que son levemente amargos, posteriormente los mismos se convierten en  $\alpha$ -ácidos que son más amargos y están compuestos por: 35 - 70% humulona; 20 - 55% cohumulona; y 10 - 15% adhumulona. La estructura de los  $\beta$ -ácidos se muestra en la Figura 2.1.



**Figura 2.1.** Estructura de los  $\beta$ -ácidos. **Fuente:** Stewart, Anstruther, & Russell, 2017.

De estos tres compuestos la cohumulona tiene un efecto negativo para el amargor de la cerveza (Kunze & Manger, 2004).

Los  $\alpha$ -ácidos, inicialmente insolubles, sufren la conversión química más importante que se produce durante la ebullición del mosto, conocida como isomerización, en donde se forman compuestos solubles denominados iso- $\alpha$ -ácidos, el mecanismo de esta reacción se expone en la Figura 2.2.



**Figura 2.2.** Mecanismo de isomerización de los  $\alpha$ -ácidos. **Fuente:** Jaskula-Goiris, Aerts, & De Cooman, 2010.

El mecanismo de isomerización consiste en una reacción ácido-base, inicialmente la ionización de los  $\alpha$ -ácidos desarmar los enlaces dobles, en una segunda etapa, la protonación estereo selectiva de la función enol produce la formación del anillo tipo aciloina y, finalmente, la contracción no estero selectiva de este anillo da lugar a los ácidos trans- y cis- de iso-  $\alpha$ -ácido (Jaskula-Goiris, Aerts, & De Cooman, 2010).

Los términos trans- y cis- indican que el grupo hidroxilo terciario en C-4 apunta a caras opuestas, mientras que la cadena lateral isoprenilo en C-5 del iso- $\alpha$ -ácido está en la misma cara del anillo de cinco miembros. En consecuencia, 6 iso- $\alpha$ -ácidos principales

(trans-iso-humulona y cis-iso-humulona, trans-iso-cohumulona y cis-iso-co-humulona, trans-iso-adhumulona y cis-iso-adhumulona) están presentes en la cerveza, como resultado de la conversión de los 3 principales  $\alpha$ -ácidos del lúpulo humulona, cohumulona y adhumulona (De Keukeleire, 1999).

Las resinas amargas le dan a la cerveza un amargor tenue y agradable, estabilizan la espuma, posee propiedades antibacterianas y ayudan a la salubridad, los estudios han demostrado una influencia positiva sobre la diabetes tipo 2, siendo necesario un consumo responsable (Eßlinger, 2009).

Hay una gran variedad de valores para un consumo moderado de alcohol, éste no afecta a toda la población por igual porque depende principalmente del índice de masa corporal (IMC). El Centro de Información Cerveza y Salud se refiere a la ingesta moderada de aproximadamente, de forma general, 10 g de alcohol diarios, lo que equivale a unos 200 mL de cerveza, con un contenido alcohólico de 4-5 % (Sánchez, y otros, 2010).

Un estudio prospectivo de 12 años que siguió a aproximadamente 47.000 hombres informó que el consumo de alcohol (15 - 29 g de alcohol / día) se asoció con un 36% menos de riesgo de diabetes tipo 2 en comparación con el consumo cero de alcohol, también se hizo un seguimiento de aproximadamente 110.000 mujeres durante 10 años, y los resultados mostraron que un consumo de 15 - 29 g de alcohol / día redujeron el riesgo de diabetes tipo 2 en un 58% (Kondo, 2004).

#### **2.1.2.2. Aceite de Lúpulo**

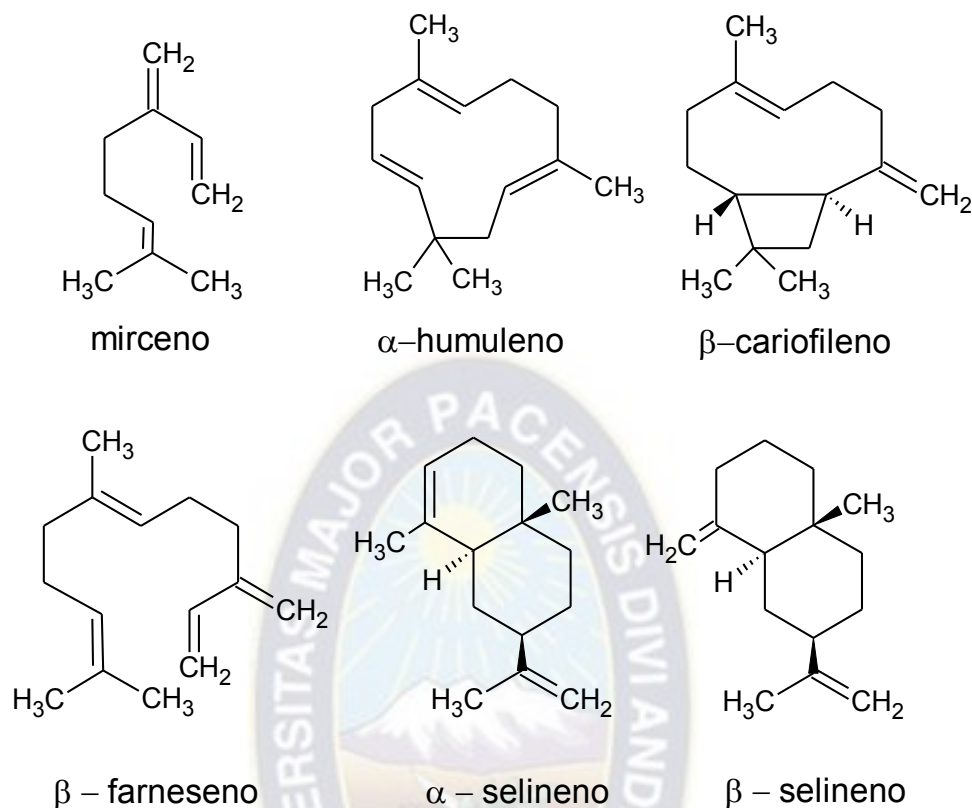
Los compuestos de aceite presentes en el lúpulo se clasifican normalmente en tres grupos distintos:

##### **2.1.2.2.1. Terpenos**

Estos compuestos se caracterizan por tener una alta volatilidad y tienden a desaparecer ya sea durante la ebullición a través de la chimenea del hervidor o se eliminan por la evolución del dióxido de carbono durante la fermentación (Bamforth, 2016).

Los terpenos más abundantes son el mirceno (monoterpeno) y los sesquiterpenos  $\alpha$  - humuleno y  $\beta$  - cariofileno, estos tres compuestos representan aproximadamente el 80% (p/p) del aceite de lúpulo. Sin embargo, existen otros terpenos que permiten la identificación de diferentes variedades de lúpulo:  $\alpha$  - y  $\beta$  - selineno y  $\beta$  - farneseno (Stewart, Anstruther, & Russell, 2017).

En la Figura 2.3 se pueden observar algunas de sus estructuras químicas.



**Figura 2.3.** Terpenos mayoritarios encontrados en el aceite esencial de lúpulo.  
**Fuente:** Stewart, Russell & Anstruther, 2006.

La importancia de los terpenos para el sabor de la cerveza es generalmente insignificante porque todos son prácticamente insolubles en agua y tienen umbrales de sabor relativamente altos (Stewart, Anstruther, & Russell, 2017).

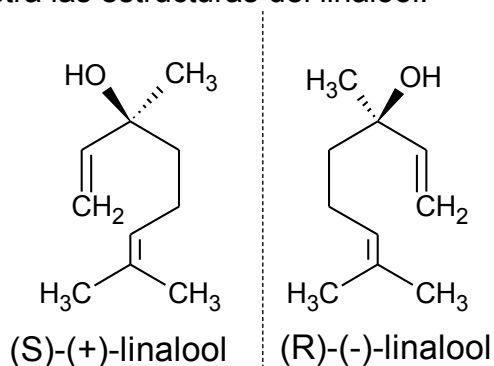
#### 2.1.2.2.2. Fracción oxigenada

Son cantidades relativamente pequeñas de derivados oxigenados de los terpenos, a estas fracciones se le asocia el sabor a lúpulo en la cerveza y se clasifican en alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, principalmente entre otros en menor composición en peso seco (Bamforth, 2016).

El linalool es un componente que juega un papel importante y se encuentra en dos formas estereoisoméricas. Estos enantiómeros tienen diferentes propiedades organolépticas, donde el (R)-(-)-linalool es importante para el sabor de la cerveza debido a su umbral de sabor mucho más bajo (Stewart, Anstruther, & Russell, 2017).



En la Figura 2.4 se muestra las estructuras del linalool.



**Figura 2.4.** Enantiómeros del linalool. **Fuente:** Bradford, 2015.

#### 2.1.2.2.3. Fracción de azufre

Algunos estudios han encontrado, compuestos de azufre en el aceite de lúpulo, estos causan un impacto negativo en el sabor de la cerveza, dichos compuestos son el disulfuro de dimetilo (cuyo acrónimo utilizado es DMDS), trisulfuro de dimetilo (DMTS) y metanotiol (Stewart, Anstruther, & Russell, 2017).

Las cervezas que contienen concentraciones de sulfuro excesivas generalmente se consideran como defectuosas (Fix, 1999).

#### 2.1.2.3. Taninos o Polifenoles

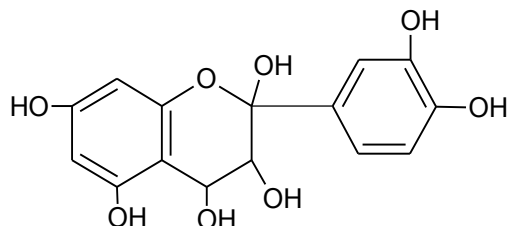
El lúpulo contiene de 2 a 5% de taninos en la materia seca, los cuales tienen las siguientes propiedades:

- Tienen un sabor astringente (sensación mixta en la lengua entre sequedad intensa y amargo).
- Tiene la capacidad de combinarse con sustancias albuminoideas complejas y de precipitarlas.
- Se oxidan hacia compuestos rojizos.
- Se combinan con sales de hierro para formar compuestos negruzcos.

Los taninos participan en la formación de turbiedad de la cerveza, contribuyen al sabor y olor. Éstos son compuestos con varios grupos fenilo, es por eso que se los denomina también polifenoles (Kunze & Manger, 2004). Los polifenoles tienen un efecto antioxidante, se encuentran principalmente en los pétalos y en el cono del lúpulo (Stewart, Anstruther, & Russell, 2017).

Los antocianógenos son los más importantes de estos polifenoles en cuanto a cantidad y alcance e integran aproximadamente el 80% de los polifenoles del lúpulo (Kunze & Manger, 2004).

En la Figura 2.5 se puede observar la estructura de un antocianógeno.



**Figura 2.5.** Estructura de un antocianógeno. **Fuente:** Kunze & Manger, 2004

El xantohumol y el isoxantohumol también pertenecen al grupo de los polifenoles presentes en el lúpulo. A estos compuestos se les atribuye una propiedad antioxidante y también preventiva contra el cáncer (Kunze & Manger, 2004).

### 2.1.3. Productos del lúpulo

Los productos de lúpulo existen desde hace muchos años, y los primeros intentos de extracción de lúpulo se remontan a mediados del siglo XIX (Stewart, Anstruther, & Russell, 2017). La porción de fábricas de cerveza que utilizan lúpulo entero disminuye cada vez más, dado que la utilización de los productos lúpulo ofrece ventajas importantes (Kunze & Manger, 2004):

- Se logra uniformidad de en el amargor de la cerveza.
- Pueden ser almacenados por tiempo indefinido.
- Mejora el rendimiento de los compuestos amargos
- Pueden ser dosificados automáticamente

Los productos del lúpulo más usuales pueden ser clasificados en dos grupos:

- Pellets de lúpulo
- Extractos de lúpulo

#### 2.1.3.1. Pellets

La introducción de pellets de lúpulo ha reemplazado a los polvos de lúpulo, que a menudo resultan difíciles de empaquetar y manipular. Introducidos en la década de 1960, estos pellets se han convertido en los productos de lúpulo más usados, debido a su simplicidad, facilidad de uso y bajo costo (Stewart, Anstruther, & Russell, 2017). Se distinguen tres tipos de pellets:

- Pellets Tipo 90.
- Pellets Enriquecidos (Tipo 45).
- Pellets Isomerizados.

#### **2.1.3.1.1. Pellets Tipo 90**

Los pellets Tipo 90 se llaman así porque originalmente el rendimiento en peso después de la eliminación del exceso de humedad y materia extraña era normalmente alrededor del 90% (Stewart, Anstruther, & Russell, 2017).

Los pellets deben ser almacenados en frío a temperaturas de 1 a 3 °C, caso contrario se produce una reducción de amargor y formación de resinas duras (Kunze & Manger, 2004).

#### **2.1.3.1.2. Pellets enriquecidos (Tipo 45)**

Para la fabricación de pellets enriquecidos con lupulina (Tipo 45) se hace uso del hecho de que toda la resina y el aceite se encuentran en las glándulas de lupulina (Kunze & Manger, 2004).

Las ventajas de los pellets T45 sobre T90 son:

- Reducción de peso y volumen.
- Reducción de residuos químicos y de metales pesados mediante la eliminación de parte de la fracción de la hoja.

Una posible desventaja es que se elimina gran parte del material polifenólico, lo que podría tener implicaciones en la calidad y estabilidad de la cerveza (Bamforth, 2016).

#### **2.1.3.1.3. Pellets Isomerizados**

Estos pellets pre-isomerizados, conocidos más comúnmente como pellets isomerizados o simplemente como iso-pellets se produjeron en la década de 1980 al fomentar el proceso de isomerización en condiciones controladas para producir pellets en los cuales los  $\alpha$ -ácidos estaban casi completamente pre-isomerizados (Stewart, Anstruther, & Russell, 2017).

Debido a que los  $\alpha$ -ácidos ya están isomerizados, la disolución en el mosto es rápida y más eficiente que los pellets estándar (Bamforth, 2016). Esta isomerización tiene ventajas con respecto a los pellets convencionales, dado que el lúpulo no tiene que ser cocido durante tanto tiempo, a efecto de alcanzar la isomerización (Kunze & Manger, 2004):

- Se mejora el rendimiento iso- $\alpha$ -ácidos.
- Se reduce el tiempo de cocción.
- Puede disminuir los costos de lúpulo y energía.
- Los pellets isomerizados no tienen que ser almacenados en frío.

### **2.1.3.2. Extractos de lúpulo**

Hoy en día se utiliza CO<sub>2</sub> líquido o etanol como solventes para la fabricación de extracto de lúpulo, ambos son apropiados debido a que disuelven completamente las resinas de lúpulo y aceites (Kunze & Manger, 2004).

#### **2.1.3.2.1. Extracción de lúpulo con etanol**

Durante la extracción de etanol, algunos cambios en los componentes del lúpulo tienen lugar de la siguiente manera (Stewart, Anstruther, & Russell, 2017):

- Isomerización de pequeñas cantidades de  $\alpha$ -ácidos en iso- $\alpha$ -ácidos (menos del 2 %).
- Formación de pequeñas cantidades de productos de degradación de  $\alpha$ -ácidos.
- Eliminación de algunos componentes volátiles del aceite de lúpulo (particularmente el mirceno normalmente indeseable) y modificación química de una pequeña cantidad de otros compuestos de aceite.

#### **2.1.3.2.2. Extracción de lúpulo con CO<sub>2</sub> líquido**

Es posible diluir las sustancias contenidas en el lúpulo por medio de CO<sub>2</sub> líquido, dado que, bajo condiciones normales el CO<sub>2</sub> se encuentra en estado gaseoso, el mismo deber ser licuado. Se requieren aproximadamente 20 kg de CO<sub>2</sub> líquido por cada kg de lúpulo. El gasto de energía es mayor con este método, por lo cual éste es más caro, sin embargo, el producto es muy limpio (Kunze & Manger, 2004).

#### **2.1.3.2.3. Extracción de lúpulo con CO<sub>2</sub> supercrítico**

Por encima del punto crítico (74 bar y 31 °C), el CO<sub>2</sub> se convierte en un fluido supercrítico, y su poder de disolución aumenta progresivamente con el aumento de la presión y la temperatura, lo que resulta en la extracción de algunos productos de degradación polar y resinas duras. Como el rendimiento total de los componentes del lúpulo es normalmente mayor cuando se usa CO<sub>2</sub> supercrítico, esta es la opción más comúnmente utilizada por las plantas comerciales de extracción de lúpulo (Stewart, Anstruther, & Russell, 2017).

### **2.1.3.3. Extractos de lúpulo isomerizados reducidos**

Producidos a partir de iso- $\alpha$ -ácidos, ya sea por un proceso de reducción o por hidrogenación (o una combinación de ambos), los iso-extractos reducidos se introdujeron a fines de los años noventa (Bamforth, 2016).

Mientras que los productos isomerizados presentan importantes oportunidades de ahorro de costos, la gama de extractos isomerizados reducidos ofrece dos beneficios importantes para la calidad de la cerveza: la estabilidad a la luz y la mejora de la espuma. El término extracto isomerizado "reducido" describe productos disponibles

comercialmente que contienen (a veces como mezclas): rho-iso- $\alpha$ -ácidos, tetrahidro-iso- $\alpha$ -ácidos o hexahidro-iso- $\alpha$ -ácidos (Stewart, Anstruther, & Russell, 2017).

La utilización de estos extractos ofrece las siguientes ventajas (Kunze & Manger, 2004):

- No se produce sabor a cerveza asoleada, de esta manera, ya no es posible un deterioro en el sabor de la cerveza debido a la acción de la luz, aún con un envasado en botellas incoloras.
- Se mejora notablemente la estabilidad de la espuma.

#### **2.1.3.3.1. Rho-iso- $\alpha$ - ácido (Rho)**

Normalmente producido a partir de la reducción de iso-alfa-ácidos purificados en presencia de borohidruro de sodio a temperaturas elevadas y a pH alcalino, Rho se vende normalmente como la solución de sal de potasio estandarizada al 35% (Bamforth, 2016).

Las cervezas elaboradas con productos Rho tienen las siguientes características (Stewart, Anstruther, & Russell, 2017):

- Se pueden usar para evitar el desarrollo de sabores indeseados en cervezas rellenas en botellas de vidrio transparente o verde.
- Las comparaciones organolépticas muestran que los rho-iso- $\alpha$ -ácidos en la cerveza dan un sabor menos amargo que los iso- $\alpha$ -ácidos sin reducir.

Las cervezas elaboradas con productos Rho se pueden usar para evitar el desarrollo de sabores indeseados en botellas de vidrio transparente o verde. Las comparaciones organolépticas muestran que los rho-iso- $\alpha$ -ácidos en la cerveza dan un sabor menos amargo que los iso- $\alpha$ -ácidos sin reducir (Stewart, Anstruther, & Russell, 2017).

#### **2.1.3.3.2. Tetrahidro-iso- $\alpha$ -ácido ("Tetra")**

Los tetrahidro-iso- $\alpha$ -ácidos pueden producirse mediante una serie de diferentes procesos patentados utilizando  $\alpha$ - o  $\beta$ - ácidos como material de partida. Las características de calidad clave de los productos tetra son las siguientes (Stewart, Anstruther, & Russell, 2017):

- Se pueden usar para producir cervezas livianas y estables cuando se usan solas o en combinación con otros productos de lúpulo reducido.
- Se pueden agregar a la cerveza en pequeñas cantidades para mejorar la apariencia y la estabilidad de la espuma.

Se pueden lograr mejoras muy notables en el rendimiento de la espuma con tan solo 3 a 4 mg/L presentes en la cerveza final. Sin embargo, las cervezas que contienen niveles relativamente altos de Tetra a menudo se consideran tener una espuma

antinatural, "cremosa". Debido a su amargor potencialmente más intenso, a menudo se describe que Tetra le da un sabor más áspero que los iso- $\alpha$ -ácidos normales (Stewart, Anstruther, & Russell, 2017).

#### **2.1.3.3.3. Hexahidro-iso- $\alpha$ -ácido ("Hexa")**

En la producción de Hexa, el hidrógeno se introduce en las moléculas de iso- $\alpha$ -ácido mediante una combinación de borohidruro e hidrogenación utilizando el catalizador de paladio / carbono. El punto de partida puede ser Rho que posteriormente se hidrogena o Tetra que se somete a reducción de borohidruro (Bamforth, 2016).

Las características de calidad de los productos Hexa son los siguientes (Stewart, Anstruther, & Russell, 2017):

- Proporciona estabilidad a la luz de la cerveza y una excelente mejora de la espuma. Sin embargo, las cervezas producidas con cantidades significativas de Hexa exhiben una espuma muy "rígida", que se puede describir como "atípica" cuando se compara con la espuma de cerveza normal. Por esta razón, Hexa no es adecuada como única fuente de amargor, sino que debe utilizarse en combinación con otros productos de lúpulo isomerizado y reducido.
- Se considera que Hexa proporciona un sabor ligeramente más amargo en relación con los iso- $\alpha$ -ácidos no reducidos.

#### **2.1.4. Beneficios de la cerveza para la salud**

La cerveza es un alimento extremadamente bajo en toxinas y contiene compuestos considerados como benéficos para la salud, como los aminoácidos (alrededor de 1000 mg/L), vitaminas (alrededor de 2 mg/L), minerales (1100 - 2100 mg/L), CO<sub>2</sub> y ácidos orgánicos (alrededor de 600 mg/L), entre sus beneficios se indican los siguientes:

- El consumo diario de un 1 L de cerveza cubre el 20 % del requerimiento de vitamina B2, 20 % de potasio y 45 % de magnesio.
- Ayuda a prevenir la formación de cálculos renales, el consumo diario de una botella de cerveza reduce en un 40 % el riesgo de desarrollar cálculos renales.
- Favorece la eliminación de toxinas del organismo, las sustancias biológicamente activas en la cerveza ensanchan los microvasos de la membrana mucosa del aparato digestivo y de esa manera aceleran el metabolismo en el organismo, una ingesta diaria de 250-500 mL antes de las comidas durante 5-7 días (luego se realiza una pausa durante el mismo período) favorece la eliminación de metales pesados del organismo.

Este producto natural, conocido desde hace varios milenios, se ha convertido en un foco muy interesante de investigación médica, aunque la investigación se encuentra todavía en su fase inicial (hasta ahora se han publicado unos 3500 estudios científicos

sobre el tema de la cerveza), ya se han presentado hallazgos bastante notables (Eßlinger, 2009).

Hay numerosos productos farmacéuticos que contienen extracto seco de lúpulo junto a tila, melisa y manzanilla, para combatir la ansiedad y el insomnio, el lúpulo ha sido utilizado tradicionalmente como planta tranquilizante, su actividad sedante está principalmente en los  $\alpha$ -ácidos, su mecanismo de acción consiste en elevar los valores del neurotransmisor  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), inhibidor del sistema nervioso central (Sánchez, y otros, 2010).

### **2.1.5. Beneficios de los compuestos en estudio para la salud**

Los iso- $\alpha$ -ácidos son responsables del sabor amargo de la cerveza, exhiben propiedades bacteriostáticas y juegan un papel esencial en la mejora de la estabilidad de la espuma de la cerveza, su ausencia da como resultado una espuma insignificante que se adhiere a las paredes laterales internas del vaso de vidrio (Vanhoenacker, De Keukeleire, & Sandra, 2004).

Las isohumulonas tienen un efecto beneficioso para personas con prediabetes, los estudios mostraron que la ingesta diaria de 32 mg isohumulonas en ayunas disminuye el nivel de glucosa de la sangre (Obara, Mizutani, Hitomi, Yajima, & Kondo, 2009).

Los tetrahidro-iso- $\alpha$ -ácidos tienen menor solubilidad que los iso- $\alpha$ -ácidos, razón por la que migran fácilmente a la espuma de la cerveza y contribuyen de esa manera a su estabilidad, aporta amargor y permite que el producto terminado pueda ser envasado en botellas de vidrio de color verde o transparente sin que su sabor sea alterado por acción de la luz (Boulton, 2013).

En un estudio realizado se encontró que la administración de tetrahidro-iso- $\alpha$ -ácidos a ratones obesos y diabéticos alimentados con una dieta alta en grasas durante 8 semanas redujo el aumento de peso y grasa corporal, intolerancia a la glucosa e hiperinsulinemia. Esta investigación permite descifrar un mecanismo novedoso que contribuye a los efectos positivos del tratamiento con tetrahidro-iso- $\alpha$ -ácidos y respalda la necesidad de investigar dichos compuestos en pacientes obesos y diabéticos tipo 2 (Everard, Geurts, Van Roye, Delzenne, & Cani, 2012).

## **2.2. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)**

### **2.2.1. Historia**

El término cromatografía significa "escritura en color", fue descubierto por primera vez por Mikhail Tswett, un botánico ruso que en 1903 relleno con tiza ( $\text{CaCO}_3$ ) un tubo de vidrio para separar los pigmentos vegetales presentes en las hojas. Desde la década de 1930, los químicos utilizaron columnas de sílice para purificar los materiales orgánicos y columnas de resina de intercambio iónico para separar los compuestos iónicos. La primera generación de cromatógrafos líquidos de alto rendimiento fue

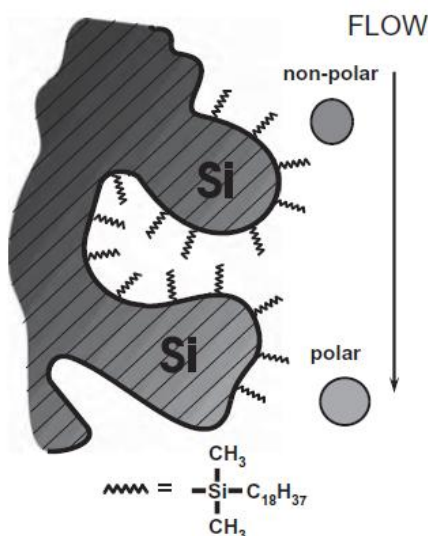
desarrollada por investigadores a principios de la década de 1960, dos grupos diferentes se embarcaron en el desarrollo de un sistema cromatográfico de uso general, bajo el liderazgo de Csaba Horvath en los Estados Unidos y Josef Huber en Europa. A fines de esa década, la cromatografía líquida se convirtió en "alto rendimiento" con el uso de columnas de partículas pequeñas que requerían bombas de alta presión y también se fabricó el primer cromatógrafo líquido de alto rendimiento por Waters Corporation con el nombre de ALC100 HPLC. El desarrollo comercial de detectores en línea e inyectores confiables permitió que la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (o HPLC por sus siglas en inglés) se convirtiera en una técnica sensible y cuantitativa que lleva a un crecimiento potencial de aplicaciones. En la década de 1980, la versatilidad y precisión del HPLC la hacían prácticamente indispensable en productos farmacéuticos y en otras diversas industrias (Dong, 2006).

### 2.2.2. Definición y conceptos fundamentales

La cromatografía es un método de separación en el cual los componentes a separar se distribuyen entre dos fases, una de las cuales es estacionaria que puede ser un sólido, un líquido retenido sobre un sólido o un gel, mientras que la otra fase (fase móvil) se mueve en una dirección definida y puede ser líquida o gaseosa (Polo, 2015).

La cromatografía de fase inversa es el modo cromatográfico más popular en el cual la fase estacionaria es apolar y la fase móvil es polar (Dong, 2006).

La Figura 2.6 se presenta una vista simplificada de la cromatografía de fase inversa



**Figura 2.6.** Vista simplificada de la cromatografía de fase inversa. **Fuente:** Dong, 2006.

De acuerdo a la anterior figura, los analitos polares se eluyen primero mientras que los analitos no polares interactúan más fuertemente con los grupos C18 hidrófobos que forman una capa "líquida" alrededor del soporte sólido de sílice. El mecanismo de separación se atribuye principalmente a la interacción hidrofóbica (Dong, 2006).



Los parámetros más importantes de la cromatografía se explican a continuación

### 2.2.2.1. Tiempo de retención ( $t_R$ )

El tiempo de retención  $t_R$  se aplica para cada soluto y se define como el tiempo desde la inyección de la muestra hasta la aparición de la parte superior del pico en el cromatograma (Snyder, Kirkland, & Dolan, 2009).

### 2.2.2.2. Tiempo muerto ( $t_0$ )

Es el tiempo que transcurre entre la inyección y la salida de una sustancia que no interacciona nunca con la fase estacionaria, es decir, aquella sustancia cuya velocidad a lo largo de la columna cromatográfica coincide con la velocidad de la fase móvil (Gismera, Quintana, & Da Silva, 2009).

### 2.2.2.3. Factor de capacidad o de retención ( $k'$ )

Este factor describe la distribución del soluto y hace referencia a la cantidad total de éste en cada fase involucrada en el sistema cromatográfico y puede calcularse directamente del cromatograma con la Ecuación 2.1, como la relación entre el tiempo que permanece el analito en la fase estacionaria y el que permanece en la fase móvil siendo independiente de la velocidad de ésta.

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} = \frac{t'_R}{t_0} \quad \text{Ecuación 2.1.}$$

Dónde:  $t'_R$  es el tiempo de retención ajustado,  $t_R$  es el tiempo de retención de un analito y  $t_0$  es el tiempo muerto (Gismera, Quintana, & Da Silva, 2009). El factor de capacidad es independiente de la longitud de la columna y el caudal de la fase móvil y su valor puede ajustarse modificando la fuerza de elución de la fase móvil, por ejemplo, en la fase reversa,  $k'$  disminuye al aumentar la proporción del componente orgánico y aumenta al aumentar la proporción de agua. Así el valor de  $k'$  se regula entre 2 y 10 para mezclas de pocos componentes, o entre 0,5 y 20 si fuera necesario “hacer lugar” en el cromatograma para alojar un gran número de picos (Quattrocchi, Abelaira de Andrizzi, & Laba, 1992).

### 2.2.2.4. Factor de selectividad o de separación ( $\alpha$ )

Es la relación entre los factores de capacidad ( $k'$ ) de un par de picos cromatográficos, como indica la Ecuación 2.2. Si no existe separación,  $\alpha$  es igual a la unidad y su valor incrementa cuando aumenta la separación (Quattrocchi, Abelaira de Andrizzi, & Laba, 1992).

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} = \frac{(t_R)_2 - t_0}{(t_R)_1 - t_0} \quad \text{Ecuación 2.2.}$$

El factor de selectividad depende de la temperatura y la afinidad del soluto respecto a la fase móvil y la columna. La variación de  $\alpha$  se logra principalmente cambiando el tipo de interacción entre las variables del sistema (soluto-fase móvil-fase estacionario), entre las variaciones más usuales cabe mencionar la sustitución del componente “activo” de la fase móvil (por ejemplo en fase reversa metanol por acetonitrilo), modificación del pH de la fase móvil y cambio de la fase estacionaria. En general, se considera que la selectividad es aceptable a partir de valores de  $\alpha \geq 1,14$  (Quattrocchi, Abelaira de Andrizzi, & Laba, 1992).

### 2.2.2.5. Número de platos teóricos (N)

El número de platos teóricos, es una medida de la eficiencia de la columna y se define como el cuadrado de la relación del tiempo de retención dividido por la desviación estándar del pico ( $\sigma$ ), como el ancho del mismo ( $w_b$ ) es igual a  $4\sigma$  para un pico gaussiano, esta expresión se puede expresar en términos del ancho de pico como indica la Ecuación 2.3 (Dong, 2006).

$$N = \left( \frac{t_R}{\sigma} \right)^2 = \left( \frac{4t_R}{w_b} \right)^2 = 16 \left( \frac{t_R}{w_b} \right)^2 \quad \text{Ecuación 2.3.}$$

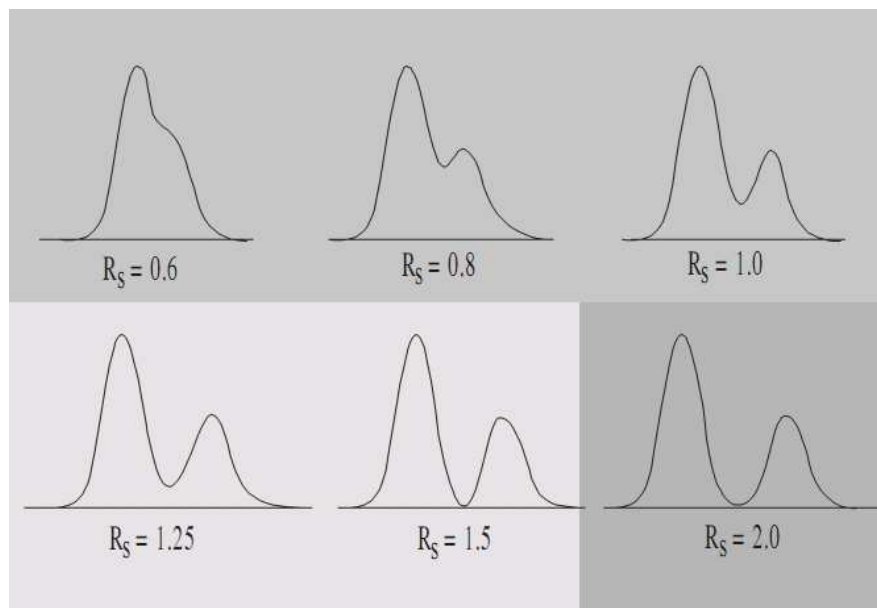
### 2.2.2.6. Resolución (Rs)

La resolución es una medida del grado de separación de dos analitos adyacentes y se define como la diferencia en los tiempos de retención de los dos picos divididos por el ancho promedio del pico, la Ecuación 2.4 expresa la relación matemática para este parámetro:

$$R_s = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{\left( \frac{w_{b1} + w_{b2}}{2} \right)} \quad \text{Ecuación 2.4.}$$

Dónde  $t_{R2}$ ,  $w_{b2}$  y  $t_{R1}$ ,  $w_{b1}$  son los tiempos de retención y anchos de pico para el segundo pico de elución y el primer pico de elución, respectivamente (Dong, 2006).

La Figura 2.7 expone una representación gráfica de la resolución para dos picos con valores de resolución que van desde 0,6 a 2,0 (Dong, 2006).



**Figura 2.7.** Picos que eluyen a varios valores de resolución. **Fuente:** Dong, 2006

En base a la Figura 2.7, se debe tener en cuenta lo siguiente:

- $R_s = 0$  indica co-elución completa o que no ocurre la separación.
- $R_s = 0,6$  indica una ligera separación parcial.
- $R_s = 1$  indica una separación mínima requerida para la cuantificación.
- $R_s = 1,5$  indica la separación Ideal

El objetivo de la mayoría de los métodos en cromatografía líquida es lograr una resolución ente 1,5 a 2 para todos los analitos claves (Dong, 2006).

### 2.2.3. Mecanismos de ensanchamiento de banda

Los picos cromatográficos que se obtienen en condiciones reales, raramente responden al modelo de campana de Gauss que sólo es válido cuando el grado de asimetría es pequeño, como es el caso de las señales cromatográficas que se obtienen para sustancias poco retenidas (picos estrechos y bien definidos). Sin embargo, al aumentar la retención aumenta el grado de asimetría (Gismera, Quintana, & Da Silva, 2009).

Según la teoría de los platos teóricos, aunque la cromatografía es un proceso continuo, es posible imaginar que la columna se divide en “N” segmentos, en cada uno de los cuales se establece un equilibrio. Cada uno de estos segmentos imaginarios correspondería a lo que se ha definido como plato teórico (Gismera, Quintana, & Da Silva, 2009).

Sin embargo, hay que tener en cuenta que el equilibrio de distribución de los solutos no se produce de forma rápida sino que la velocidad de transferencia de masa es finita. Además, la forma del pico cromatográfico depende tanto de la velocidad de elución como de las diferentes trayectorias que las moléculas pueden seguir a su paso por la fase estacionaria así como de la difusión molecular de los solutos en la dirección del eje de la columna. La influencia de cada uno de los factores descritos queda expresada en la ecuación de Van Deemter (Gismera, Quintana, & Da Silva, 2009).

Los ensanchamientos de banda son normales y como depende de la eficiencia de la columna, los procesos que la gobiernan se conocen como procesos de ensanchamiento de banda (Quattrocchi, Abelaira de Andrizzi, & Laba, 1992).

La ecuación de Van Deemter se desarrolló en la década de 1950 para explicar el ensanchamiento de la banda en cromatografía al correlacionar la altura equivalente a un plato teórico (H.E.T.P.) con la velocidad lineal de flujo ( $u$ ) (Dong, 2006).

Según Van Deemter, las contribuciones al ensanchamiento de banda dentro de una columna cromatográfica son cuatro: Proceso Multipaso (o de caminos múltiples), Difusión longitudinal, Resistencia a la transferencia de masa en la fase móvil y Resistencia a la transferencia de masa en la fase estacionaria (Quattrocchi, Abelaira de Andrizzi, & Laba, 1992).

#### **2.2.3.1. Proceso Multipaso**

En una columna rellena con partículas de la fase estacionaria, el soluto encontrará diversos caminos, los cuales será impulsado a recorrer por la fase móvil, en un trayecto finito algunas moléculas seguirán caminos directos y otras recorrerán caminos más tortuosos retrasándose respecto a las primeras, este fenómeno es denominado como difusión de Eddy y su contribución al ensanchamiento de banda está dada por el tamaño de partícula ( $d_p$ ) y por una constante que depende del relleno y de la calidad de su empaque en la columna ( $\gamma$ ), es decir:

$$H_i = d_p \cdot \gamma \quad \text{Ecuación 2.5.}$$

Dónde  $H_i$  es la contribución del proceso multipaso a la altura equivalente a un plato teórico (Quattrocchi, Abelaira de Andrizzi, & Laba, 1992).

#### **2.2.3.2. Difusión Longitudinal**

Si un soluto se abandona en un líquido (la fase móvil), sus moléculas no permanecerán inmóviles si no que difundirán en todas direcciones hasta que su concentración sea uniforme en todo el seno del líquido, este efecto nunca se observa plenamente en cromatografía líquida pero será más notorio cuanto menor sea el caudal empleado. La contribución de este efecto al ensanchamiento es una función inversa de la velocidad lineal de la fase móvil ( $u$ ) y directa respecto del coeficiente de difusión del soluto en el solvente ( $D_m$ ) y de alguna constante que evalúe el espacio ocupado por la fase móvil

y su geometría ( $\lambda$ ). La contribución de la difusión longitudinal al ensanchamiento de banda ( $H_i$ ) es como muestra la Ecuación 2.6 (Quattrocchi, Abelaira de Andrizzi, & Laba, 1992).

$$H_i = \lambda \cdot D_m \cdot \frac{1}{u} \quad \text{Ecuación 2.6.}$$

### 2.2.3.3. Resistencia a la transferencia de masa en la fase móvil

A medida que el soluto se desplaza a través de la columna sus moléculas se transfieren, por un proceso reversible, desde la fase móvil hacia la fase estacionaria y desde ésta nuevamente hacia la fase móvil, este proceso no es instantáneo. En el proceso real, las moléculas de soluto más favorables a la interacción con la fase estacionaria son las más cercanas a ésta, mientras que las más alejadas demorarán más tiempo para que esta interacción tenga lugar. Como la fase móvil está en movimiento, las moléculas más alejadas de la partícula habrán viajado un determinado trayecto antes de que sean retenidas por la fase estacionaria, lo que resultará en una dispersión de la banda inicial. La contribución de este efecto al ensanchamiento de banda será mayor cuanto mayor sea la retención del soluto y será directamente proporcional a un factor dependiente ( $f_m$ ), a la velocidad lineal de la fase móvil ( $u$ ) y al tamaño de partícula ( $d_p$ ) e inversamente proporcional al coeficiente de difusión del soluto en la fase móvil ( $D_m$ ) (Quattrocchi, Abelaira de Andrizzi, & Laba, 1992).

$$H_i = f_m \cdot d_p^2 \cdot \frac{u}{D_m} \quad \text{Ecuación 2.7.}$$

### 2.2.3.4. Resistencia a la transferencia de masa en la fase estacionaria

Este efecto es similar al fenómeno de resistencia a la transferencia de masa en la fase móvil, las moléculas de soluto se retienen en la fase estacionaria y son luego devueltas a la fase móvil en un tiempo finito. Las moléculas de soluto próximas a la superficie serán devueltas a la fase móvil más rápidamente que las moléculas que difundieron profundamente, lo que dará lugar a un ensanchamiento de la banda original. El ensanchamiento será proporcional a una función del factor de capacidad ( $f_s$ ), profundidad del poro ( $d_f$ ) e inversamente proporcional al coeficiente de difusión del soluto en la fase estacionaria ( $D_s$ ) (Quattrocchi, Abelaira de Andrizzi, & Laba, 1992).

$$H_i = f_s \cdot d_f^2 \cdot \frac{u}{D_s} \quad \text{Ecuación 2.8.}$$

### 2.2.3.5. Ecuación de Van Deemter

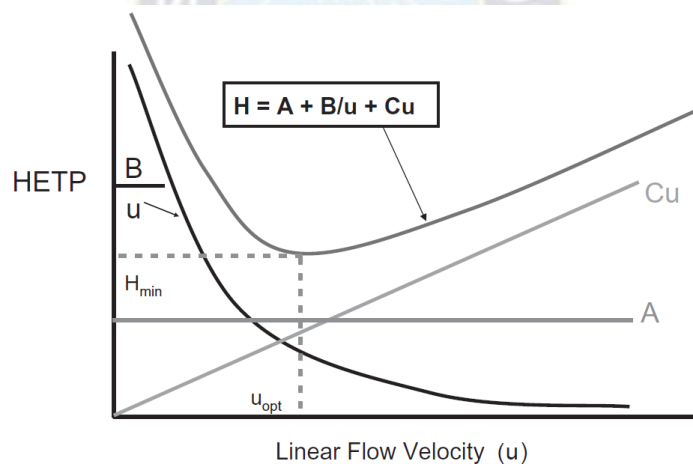
La combinación de las ecuaciones 2.5, 2.6, 2.7 y 2.8 da lugar a la expresión final de la ecuación de Van Deemter:

$$H = d_p \cdot \gamma + \lambda \cdot D_m \cdot \frac{1}{u} + f_m \cdot d_p^2 \cdot \frac{u}{D_m} + f_s \cdot d_f^2 \cdot \frac{u}{D_s} \quad \text{Ecuación 2.9.}$$

La Ecuación 2.9 es agrupada en función de la velocidad lineal para dar como resultado la Ecuación 2.10.

$$H = A + \frac{B}{u} + C \cdot u \quad \text{Ecuación 2.10.}$$

La Figura 2.8 muestra la representación gráfica de la ecuación de Van Deemter en donde se puede observar la relación de H.E.T.P. (H) frente a la velocidad lineal promedio (Dong, 2006).

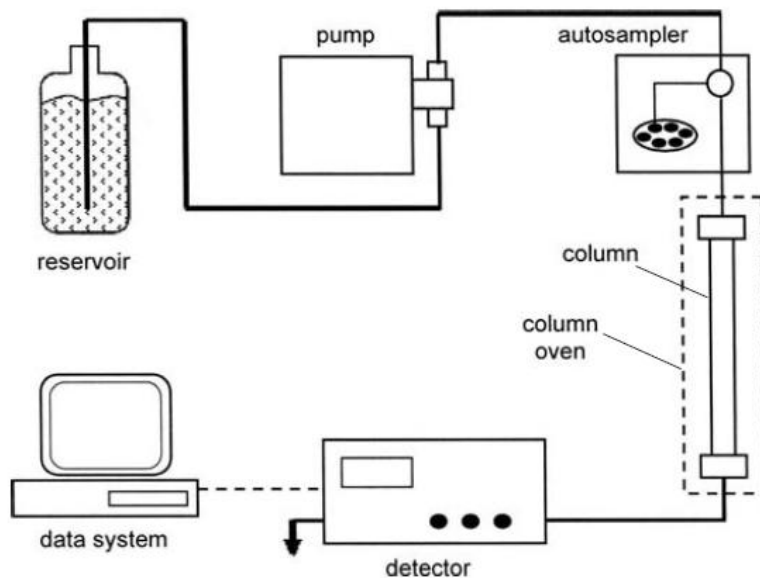


**Figura 2.8.** Representación gráfica de la ecuación de Van Deemter. **Fuente:** Dong, 2006.

La curva de van Deemter tiene una forma clásica y es una gráfica compuesta de los términos  $A$ ,  $B / u$  y  $Cu$ . En el eje de las ordenadas se tiene al término  $H_{min}$  que es la altura mínima del plato y  $u_{opt}$  es la velocidad óptima en el eje de las abscisas (Dong, 2006).

## 2.2.4. Componentes de un Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución

Los componentes que se requieren para poder llevar a cabo la cromatografía líquida de alta resolución se exponen en la Figura 2.9.



**Figura 2.9.** Componentes esenciales de un sistema cromatográfico. **Fuente:** Snyder, Kirkland, & Dolan, 2009.

La fase móvil es extraída de un depósito por la acción de una bomba, ésta controla el caudal y genera suficiente presión para impulsar la fase móvil a través de la columna y se utiliza un inyector (manual o automático) para colocar la muestra en la columna sin detener el flujo de la bomba. La separación tiene lugar en la columna, que generalmente reside dentro de un horno, el detector responde a los cambios en la concentración de analito durante la ejecución. Un sistema de datos supervisa la salida del detector y proporciona procesamiento de datos tanto para la salida gráfica como tabular de los datos, finalmente, un controlador del sistema dirige las funciones de los distintos módulos (Snyder, Kirkland, & Dolan, 2009).

### 2.2.4.1. Bomba

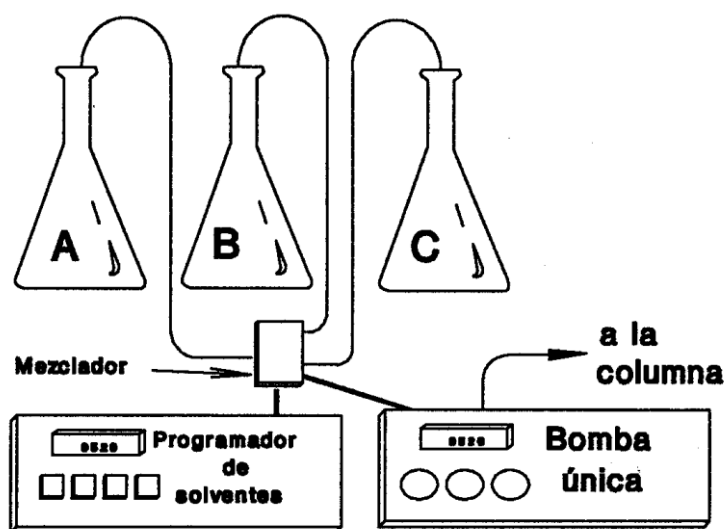
Se pueden encontrar bombas capaces de entregar flujos muy pequeños, del orden de microlitros por minuto, pasando a caudales de litros por minuto para la cromatografía analítica convencional (Quattrocchi, Abelaira de Andrizzi, & Laba, 1992).

La bomba LC-20AD ofrece estabilidad en el suministro del disolvente gracias a un mecanismo automático de corrección de pulsaciones. Esta bomba tiene las características que se indican a continuación:

- Una válvula de retención y modificaciones al método de control de suministro de disolvente mejora la exactitud del caudal y la precisión en la región del micro caudal
- El émbolo posee sellos construidos con materiales que garantizan un rendimiento robusto y duradero, esto permite la entrega de solventes por periodos prolongados.
- La presión máxima de descarga es de 40 MPa.
- Tiene un rango de operación de 0,0001 a 10 mL / min.

Es posible la instalación de una unidad de gradiente de baja presión dentro de esta unidad, lo que permite la elución en gradiente de 4 solventes en un espacio compacto (Shimadzu Corporation, 2020). Las unidades de gradiente de baja presión emplean sólo una bomba y válvula solenoides que entregan cada solvente en una cámara de mezclado de pequeño volumen (Shimadzu Corporation, 2020).

En la Figura 2.10 se presenta un esquema básico del sistema de formación de gradiente de baja presión.



**Figura 2.10.** Sistema de formación de gradiente de baja presión. **Fuente:** Quattrocchi, Abelaira de Andrizzi & Laba, 1992.

La fase móvil que se crea en ese preciso instante en base al programa deseado, es entregada a la bomba. Este sistema permite mezclar 2 a 4 solventes individuales, regulando el ciclo de apertura de cada válvula individual (Quattrocchi, Abelaira de Andrizzi, & Laba, 1992).

#### 2.2.4.2. Desgasificador

El gas disuelto en la fase móvil puede provocar un mal funcionamiento de la bomba, errores en la mezcla de solventes y cambios en los tiempos de retención. Por estas razones se utilizan desgasificadores en línea, este accesorio se encuentra integrado en muchos sistemas cromatográficos, su funcionamiento consiste en hacer pasar los



solventes a través de tubos poliméricos semiporosos dentro de una cámara de vacío, el gas disuelto sale por las paredes del tubo mientras que la fase móvil permanece dentro de la tubería (Dong, 2006). El desgasificador DGU-20A<sub>5</sub> es una unidad en línea que utiliza una membrana de fluoroetileno, posee un volumen interno menor a 400  $\mu\text{L}$ , permite una alta permeabilidad a los gases gracias a nuevo material (Systec AF®) y cuenta con cinco canales, cuatro para los solventes y uno adicional para el enjuague del inyector automático (Shimadzu Corporation, 2020).

#### **2.2.4.3. Columna**

La columna es el componente principal del cromatógrafo porque proporciona los medios para separar una mezcla en sus componentes. La selectividad, la capacidad y la eficiencia de la columna se ven afectadas por la naturaleza del material de empaque o los materiales de construcción (Weston & Brown, 1997).

Ascentis® C18 es una columna para cromatografía líquida de alta resolución, ésta ofrece estabilidad, alta reproducibilidad, simetría del pico y tiene una retención excelente incluso para compuestos complejos. Sus principales características son las que se mencionan a continuación:

- Endcapped.
- Temperatura máxima de operación: 70 °C.
- Rango de presión operativo: 400 bar.
- Rango de pH operativo: 2 – 8.
- Matriz: gel de sílice de alta pureza esférica.
- Matriz del grupo activo: fase C18 (octadecilo).
- Tamaño de partícula: 5  $\mu\text{m}$ .
- Tamaño de poro: 100 Å.
- Área superficial: 450  $\text{m}^2 / \text{g}$ .

Esta columna es compatible con todos los solventes orgánicos comunes de grado HPLC. Las soluciones tampón preparadas con sales de acetato, citrato, formiato y fosfato en concentraciones hasta 0,2 M no causan efectos adversos a la columna, sin embargo, se debe limitar el uso de ácidos y bases fuertes a las cantidades necesarias para ajustar el pH de la fase móvil (Sigma-Aldrich, 2020).

#### **2.2.4.4. Pre-columna**

Es una pequeña columna, ubicada entre el inyector y la columna analítica, su función es proteger a la columna analítica de la contaminación por partículas de la muestra y por especies que se retienen fuertemente. Normalmente, está empaquetada con el mismo material que el de la columna analítica y usualmente es del mismo diámetro, pero es mucho más corta y de menor costo (Polo, 2015). El uso de la pre-columna no afecta el rendimiento de la separación, pero ésta debe ser reemplazada a intervalos de tiempo regulares o después de un cierto número de inyecciones para garantizar una máxima vida útil de la columna de separación (Meyer, 2010).

#### **2.2.4.5. Detector**

Es el detector adecuado para la elución en gradiente, mide la absorbancia del eluato cumpliendo la ley de Beer. El detector visible UV registra compuestos que absorben la luz ultravioleta o visible (Meyer, 2010).

El detector UV-Vis SPD-20A tiene un nivel de ruido de  $0,5 \times 10^{-5}$  AU como máximo, que lo convierte en el detector UV-Vis más sensible del mundo, éste presenta las siguientes características:

- Una celda de flujo con control de temperatura elimina las inconsistencias causadas por los cambios en la absorbancia debido a las fluctuaciones de la temperatura ambiente, esto favorece a la estabilidad de la línea de base y confiabilidad del análisis.
- Con la tecnología de procesamiento de señales se mejoró la función de corrección de luz parásita y la linealidad del detector.
- Utiliza como fuente de luz una lámpara de deuterio (D2).
- El rango de la longitud de onda va desde 190 a 700 nm.

Este detector ofrece un nivel excepcional de sensibilidad y estabilidad (Shimadzu Corporation, 2020).

#### **2.2.4.6. Inyector automático**

Los inyectores automáticos disponen de una jeringa dirigida por un motor para llenar el bucle, esto otorga flexibilidad en los volúmenes de inyección, permite programar el orden de inyección, número de inyecciones y volumen inyectado (Polo, 2015).

El inyector SIL-20A es un muestreador automático que permite la inyección de alta velocidad y el procesamiento de múltiples muestras, entre sus cualidades, se destacan las siguientes:

- Tiene una velocidad de inyección a razón de 10 segundos para una inyección de 10  $\mu$ L.
- Precisión en la inyección de muestras mediante la incorporación de una bomba dosificadora de alto rendimiento.
- Rango de inyección 0,1 - 100  $\mu$ L.
- Capacidad de procesamiento de 105 viales de 1,5 mL.

El diseño de este inyector garantiza una mayor estabilidad y permite el procesamiento de muestras sin desperdiciar las mismas (Shimadzu Corporation, 2020).

#### 2.2.4.7. Fases móviles en la cromatografía de fase inversa

La fase móvil es el solvente que mueve el soluto (analito) a través de la columna, en HPLC, la fase móvil interactúa tanto con el soluto como con la fase estacionaria y tiene una poderosa influencia en la retención y separación de solutos (Dong, 2006).

La fase móvil es generalmente una mezcla de agua y acetonitrilo (ACN) o metanol (MeOH). Un disolvente orgánico adecuado para la cromatografía de fase inversa debe ser miscible en agua, tener una viscosidad relativamente baja, estable para la condiciones de uso y transparencia a la menor longitud de onda posible para la detección UV (Snyder, Kirkland, & Dolan, 2009).

La Tabla 2.2 exhibe algunos disolventes utilizados como fases móviles en cromatografía de fase inversa.

**Tabla 2.2.** Fases móviles empleadas en cromatografía de fase inversa

Solvente	Polaridad del solvente (P')
Agua	10,2
Dimetilsulfóxido	7,2
Etilenglicol	6,9
Acetonitrilo	5,8
Metanol	5,1
Acetona	5,1
Dioxano	4,8
Etanol	4,3

**Fuente:** Weston & Brown, 1997

La fuerza de elución del solvente está inversamente relacionada con su polaridad, como se indica en la Tabla 2.2, donde P' es el parámetro de polaridad del solvente (Weston & Brown, 1997).

El objetivo principal de añadir un tampón, de pH y concentración apropiada, a la fase móvil, es la de proporcionar una capacidad de tamponamiento suficiente para mejorar la forma de los picos y la reproducibilidad de su retención (Polo, 2015).

Esto implica la preparación y ajuste del pH de la fase móvil, para la preparación del tampón, normalmente, se disuelve en agua un peso conocido de sal para alcanzar una concentración determinada y posteriormente se añade un ácido o una base débil, con agitación, hasta obtener el pH deseado, el cual se mide antes de su mezcla con el modificador orgánico. Un determinado tampón amortigua los cambios de pH solamente a  $\text{pH} \pm 1$  alrededor del valor del  $\text{pK}_a$ , en la Tabla 2.3 se presentan las características de algunos tampones comunes utilizados en RP-HPLC (Polo, 2015).

**Tabla 2.3.** Tampones comunes para cromatografía de fase inversa

Tampón	pKa	Margen de pH	Corte UV (nm)
Fosfato	2,1	1,1 - 3,1	< 200
	7,2	6,2 - 8,2	
	12,3	11,3 - 13,3	
Acetato	4,8	3,8 - 5,8	210
Citrato	3,1	2,1 - 4,1	230
	4,7	3,7 - 5,7	
	5,4	4,4 - 6,4	
Carbonato	6,1	5,1 - 7,1	< 200
	10,3	9,3 - 11,0	
Formiato	3,8	2,8 - 4,8	210

**Fuente:** Polo, 2015

La concentración típica de los tampones está en un margen de 25 - 100 mM; por debajo de 10 mM su capacidad de taponamiento y su efecto cromatográfico son muy pequeños, al aumentar la concentración del tampón aumenta la polaridad de la fase móvil lo que puede afectar a la retención de los analitos. Para evitar el deterioro de los componentes del sistema cromatográfico no se debe utilizar concentraciones altas de tampón porque existen riesgos de precipitación de sales cuando la proporción de modificador orgánico es elevada (Polo, 2015).

## **2.3. Validación del método**

### **2.3.1. Definición**

El término validación ha sido definido en la literatura, de diversas maneras y por numerosos autores, aunque los términos dados son diferentes, el significado es siempre el mismo:

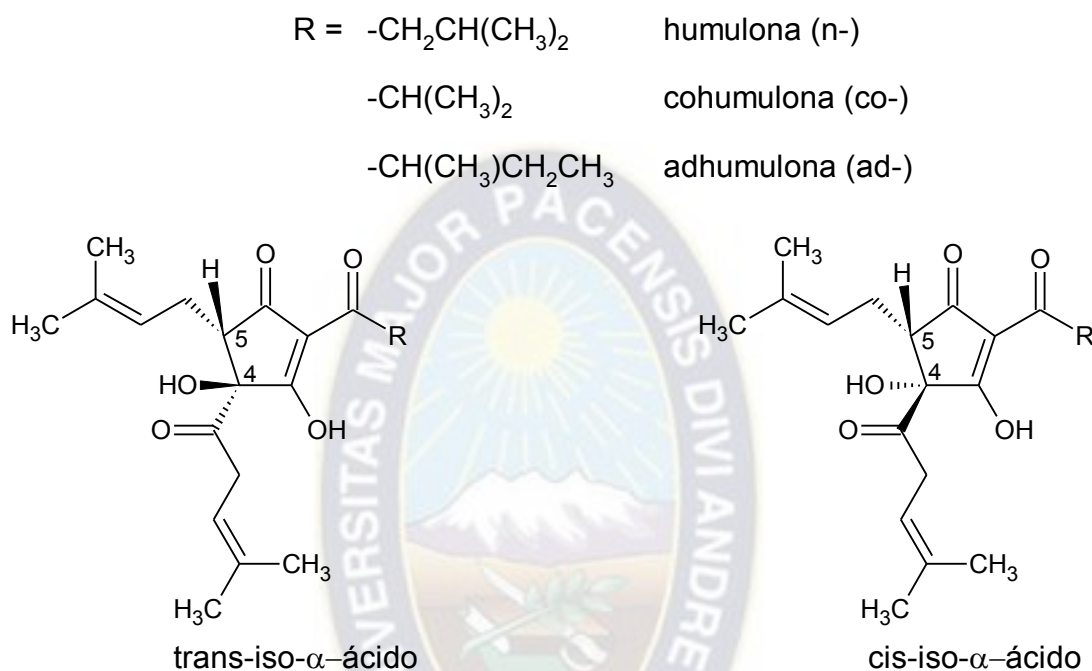
- a) Especificar e implementar;
- b) Probar que se cumplen las especificaciones y;
- c) Documentar.

La validación de un método analítico consiste en establecer evidencia documental de que un procedimiento analítico conducirá, con un alto grado de seguridad, a la obtención de resultados precisos y exactos, dentro de las especificaciones y los atributos de calidad previamente establecidos (A.E.F.I., 2001).

## 2.3.2. Características de los compuestos analizados

### 2.3.2.1. Iso- $\alpha$ -ácidos

Cada iso- $\alpha$ -ácido da lugar a dos isómeros, que se distinguen como cis-iso- $\alpha$ -ácidos y trans-iso- $\alpha$ -ácidos, dependiendo de la disposición espacial de la función del alcohol terciario en C4 y la cadena lateral prenil en C5 como indica la Figura 2.11.



**Figura 2.11.** Isómeros de los iso- $\alpha$ -ácidos. **Fuente:** Caballero, Blanco, & Porrás, 2012.

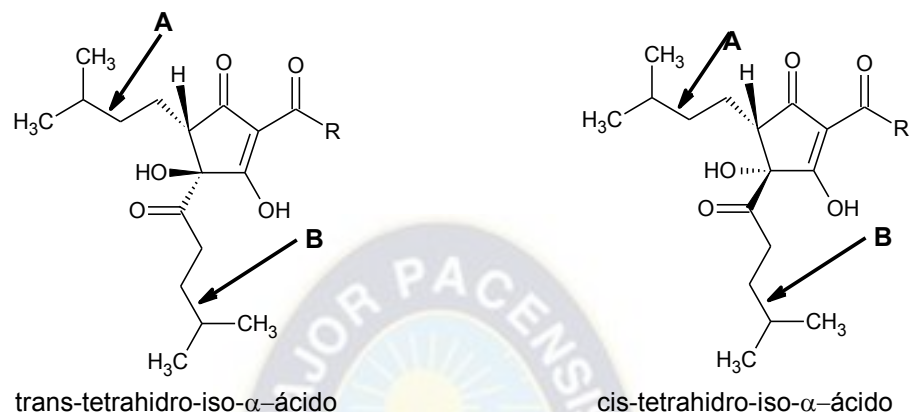
Cada estereoisómero tiene un potencial diferente para estabilizar la espuma, este comportamiento depende del carácter hidrófobo, las trans-iso-humulonas están presentes en la espuma en mayor proporción que las cis-iso-humulonas debido a su menor hidrofobicidad (Caballero, Blanco, & Porrás, 2012).

La cis- / trans-iso-humulona y la cis- / trans-iso-cohumulona son los congéneres que predominan cuantitativamente en todas las muestras de cerveza y representan aproximadamente el 43 y el 39% del contenido total de iso- $\alpha$ -ácidos respectivamente, seguidos de cis- / trans-iso-adhumulona con un contenido menor al 16,5% (Caballero, Blanco, & Porrás, 2012).

### 2.3.2.2. Tetrahidro-iso- $\alpha$ -ácidos

Son compuestos que también presentan la isomería cis- y trans-, la carencia del doble enlace en los puntos A y B tiene el efecto de incrementar la hidrofobicidad de la molécula; por lo tanto, se incrementa su tendencia a concentrarse en la espuma y de esa manera mejora la estabilidad de la misma. En la Figura 2.12 se indican los isómeros correspondientes a este compuesto.

R = $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	humulona (n-)
$-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	cohumulona (co-)
$-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$	adhumulona (ad-)



**Figura 2.12.** Isómeros de los tetrahidro-iso- $\alpha$ -ácidos. **Fuente:** Caballero, Blanco, & Porras, 2012.

El resultado de emplear estos compuestos da como resultado una cerveza con excelente estabilidad de la espuma y un amargor mejorado. Tetra tiene aproximadamente un amargor percibido de 1,7 a 1,8 veces mayor que los iso- $\alpha$ -ácidos (Bamforth, 2016).

### 2.3.3. Consideraciones

Las co-especies no presentan dificultad para su identificación, son más solubles por que presentan una mayor polaridad debido a la falta del grupo metileno ( $\text{CH}_2$ ) en su estructura molecular, en cambio los isómeros n- y ad- son los que enriquecen la espuma de la cerveza, sin embargo su separación es complicada porque éstos se diferencian únicamente por la ubicación del punto de ramificación de la cadena lateral (Stewart, Anstruther, & Russell, 2017).

Para la determinación de iso- $\alpha$ -ácidos e iso- $\alpha$ -ácidos reducidos por cromatografía líquida de alta resolución es apropiado utilizar una columna de fase inversa de tamaño convencional (25-30 cm de longitud), empaquetada con partículas esféricas de gel de sílice de  $5\ \mu\text{m}$  (Verzele & De Keukeleire, 1991).

Las impurezas en el relleno de la columna, especialmente el hierro residual en la sílice pueden causar la degradación química de algunos ácidos de lúpulo, particularmente de los iso- $\alpha$ -ácidos, por estas razones sólo deben utilizarse disolventes de alta pureza (Stewart, Anstruther, & Russell, 2017).

Para mejorar las separaciones cromatográficas, se sugiere que la elución se realice en modo gradiente, es decir, que la mezcla de disolventes cambie durante el

transcurso del análisis, ya sea como un cambio escalonado o por cambio gradual de uno a otro (Stewart, Anstruther, & Russell, 2017).

La adición de tampones ácidos o neutros a la fase móvil, mejora la separación y la reproducibilidad, sin embargo se debe controlar con precisión el pH, ya que pequeñas variaciones provocan cambios significativos en la selectividad cromatográfica (Vanhoenacker, De Keukeleire, & Sandra, 2004).

Los iso- $\alpha$ -ácidos y sus derivados reducidos muestran máximos de UV en longitudes de onda alrededor de 250-270 nm. Debido a su inestabilidad, no es posible utilizar como estándares de calibración a los ácidos individuales de lúpulo. Al realizar la calibración del cromatógrafo líquido de alto rendimiento con estos estándares, se debe determinar el área total de los picos correspondientes a cada estándar (Verzele & De Keukeleire, 1991).

En el caso de los iso- $\alpha$ -ácidos se utiliza el estándar Iso (ICS-I3), es un estándar externo, que consiste en una preparación purificada de las sales de dicitohexilamina de trans-iso- $\alpha$ -ácidos (DCHA-Iso). Sólo se considera presentes las formas principales de los siguientes iso- $\alpha$ -ácidos: trans-iso-cohumulona, trans-iso-humulona y trans-iso-adhumulona (Labor Veritas, 2009).

El estándar Tetra (ICS-T2) es una preparación purificada de tetrahidroiso- $\alpha$ -ácidos que contiene ambos isómeros (cis- y trans-) de cada tetrahidro-iso-cohumulona, tetrahidro-iso-humulona y tetrahidro-iso-adhumulona (Labor Veritas, 2004).

### **2.3.4. Criterios para la validación**

Siempre es apropiado algún grado de validación, aun cuando se usan métodos aparentemente bien caracterizados ya sean de referencia o publicados. Los parámetros de validación son los siguientes (A.E.F.I., 2001):

#### **2.3.4.1. Rango de trabajo**

El rango de trabajo es el intervalo entre la concentración superior e inferior de analito para el cual se ha demostrado la linealidad del método (A.E.F.I., 2001).

#### **2.3.4.2. Linealidad**

La linealidad es la capacidad del método para obtener resultados que son directamente proporcionales a la concentración de analito dentro de un rango dado (Swartz & Krull, 2012).

Para evaluar la linealidad existen criterios mínimos aplicables a cualquier procedimiento (A.E.F.I., 2001):

- Dentro del rango establecido se recomienda estudiar al menos 5 niveles de concentración y analizarlas por triplicado. Lo ideal es analizar las muestras de

forma aleatoria, no obstante, se establece como criterio práctico analizarlas en sentido creciente de concentración para minimizar posibles efectos memoria en el equipo.

- Para evaluar la linealidad de la trazas se suele utilizar sucesivas diluciones ya que normalmente se trabaja a niveles de concentración muy bajos y esto dificultaría las pesadas independientes.

### 2.3.4.3. Precisión

La precisión expresa el grado de concordancia entre resultados de ensayos individuales cuando el método se aplica repetidamente a múltiples alícuotas de una misma muestra homogénea (Quattrocchi, Abelaira de Andrizzi, & Laba, 1992).

La precisión incluye a la repetibilidad la cual estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra en las mismas condiciones operativas (por un mismo analista, con los mismos aparatos y reactivos, etc.), en un mismo laboratorio y en un periodo de tiempo corto. Para realizar este estudio, se requiere un mínimo de 3 muestras a tres niveles de concentración cubriendo el intervalo especificado dando un total de 9 pruebas (A.E.F.I., 2001).

### 2.3.4.4. Límite de Detección (LOD) y Límite de Cuantificación (LOQ)

El límite de detección se define como la concentración más baja de un analito en una muestra que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse. Se puede determinar en un cálculo basado en la desviación estándar de la respuesta y la pendiente de una curva de calibración (Swartz & Krull, 2012).

El límite de cuantificación corresponde a la concentración más baja de un analito en una muestra que puede cuantificarse con una precisión y exactitud aceptables bajo las condiciones operativas establecidas del método (Swartz & Krull, 2012).

Estos límites se calculan en base a la desviación estándar de la respuesta y la pendiente de la curva de calibración tal como indican las Ecuaciones 2.11 y 2.12.

$$LOD = \frac{3,3 \times S_a}{b} \quad \text{Ecuación 2.11.}$$

$$LOQ = \frac{10 \times S_a}{b} \quad \text{Ecuación 2.12.}$$

Dónde  $S_a$  es la desviación estándar de la respuesta y  $b$  es la pendiente de la curva de calibración, la pendiente se puede estimar a partir de la curva de calibración de cada analito (Swartz & Krull, 2012).



## CAPÍTULO III

### 3. DESCRIPCIÓN DE LA METODOLOGÍA

Con base a referencias previas realizadas en el presente documento, se desarrollaron las metodologías tanto en la preparación de reactivos y solventes utilizando los equipos, materiales e insumos que se detallan a continuación:

#### 3.1. Equipos

##### a) Balanza analítica



**Figura 3.1.** Balanza analítica. **Fuente:** Elaboración Propia

Marca: Precisa  
Modelo: LS 220A SCS  
Procedencia: Suiza  
Resolución: 0,1 mg  
Capacidad: Máx. 220 g  
Min. 0,01 g

b) Baño de ultrasonido



**Figura 3.2.** Baño de ultrasonidos. **Fuente:** Elaboración Propia

Marca: Rocker Scientific Co.  
Modelo: Ultrasonic Cleaner Soner 203 H  
Procedencia: Taiwán  
Calentamiento: Máximo hasta 60° C  
Capacidad del tanque: 3 L  
Capacidad de desgasificación 100 W

c) Columna Cromatográfica



**Figura 3.3.** Columna cromatográfica. **Fuente:** Elaboración Propia

Marca: Supelco®  
Modelo: Ascentis® C18  
Código de producto: 581325-U  
Procedencia: Estados Unidos  
Tamaño de partícula: 5 µm.  
Longitud: 25 cm.  
Diámetro Interno: 4,6 mm

d) Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución



**Figura 3.4.** Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución. **Fuente:** Elaboración Propia

Marca: Shimadzu Corporation

Modelo: Prominence™

Procedencia: Japón

Componentes:

Software LCsolution

Módulo de comunicación CBM-20A.

Inyector automático SIL-20A.

Detector de Índice de Refracción RID-10A.

Detector UV SPD-20A.

Desgasificador DGU-20A<sub>5</sub>.

Bomba LC 20-AD.

Válvula gradiente de baja presión

Mezclador cuaternario de solventes

Horno de columna CTO-10AS<sub>VP</sub>.

e) Bomba de vacío



**Figura 3.5.** Bomba de vacío. **Fuente:** Elaboración Propia

Marca: Rocker Scientific Co.  
Modelo: Rocker 600  
Procedencia: Taiwán  
Presión máxima de vacío: 650 mmHg  
Flujo máximo: 62 L/min

f) Micropipetas



**Figura 3.6.** Micropipetas. **Fuente:** Elaboración Propia

Marca: Thermo Scientific  
Modelo: Finnpiette® F1  
Procedencia: Finlandia  
Rango volumétrico: a) 2  $\mu$ L a 20  $\mu$ L  
b) 20-200  $\mu$ L  
c) 100-1000  $\mu$ L

g) pH-metro



**Figura 3.7.** pH-metro. **Fuente:** Elaboración Propia

Marca: HACH®  
Modelo: HQ440D

Procedencia: Estados Unidos  
Exactitud de temperatura:  $\pm 0,3$  °C  
Exactitud de pH:  $\pm 0,002$  pH

h) Purificador de agua tipo 1



**Figura 3.8.** Purificador de agua tipo 1. **Fuente:** Elaboración Propia

Marca: Evoqua

Modelo: Ultra Clear™ TP

Procedencia: Alemania

Caudal de producción de agua: hasta 2 L/min.

Conductividad a 25 °C: 0,055  $\mu$ S/cm.

Carbono Orgánico Total de entrega: 1-3 ppb.

### 3.2. Material de Laboratorio

- Filtros membrana de nitrato de celulosa 0,20  $\mu$ m, Sartorius AG
- Frascos Schott 1000 mL, Duran®
- Frascos Schott 25 mL, Duran®
- Frascos Schott 500 mL, Duran®
- Guantes de Nitrilo talla M, Nipro Medical Corporation
- Jeringas de 5 mL, Nipro Medical Corporation
- Kit de filtración, Pobel S.A.
- Matraz aforado clase A 10 mL, Isolab GmbH
- Matraz aforado clase A 1000 mL, Duran®
- Matraz aforado clase A 25 mL, LMS Consult GmbH & Co.
- Matraz aforado clase A 50 mL, LMS Consult GmbH & Co.
- Parafilm, Bemis Company, Inc.
- Pipeta graduada 10 mL, HBG GmbH

- Pizeta 500 mL, Pobel S.A.
- Portafiltros para Jeringa KS13, Advantec MFS Inc.
- Probeta de Vidrio 100 mL clase A, Duran®
- Probeta de Vidrio clase A 1000 mL, LMS Consult GmbH & Co.
- Propipeta, Boeco GmbH
- Tips 200-1000  $\mu$ L, Genfollower™
- Tips 20-200  $\mu$ L, Genfollower™
- Vaso de Precipitados 100 mL forma baja, Normax Lda
- Vaso de Precipitados forma baja 250 mL, Pobel S.A.
- Vial de vidrio 2 mL, Shimadzu Corporation

### 3.3. Reactivos y Estándares

#### 3.3.1. Reactivos

- Acetonitrilo,  $\geq 99,9\%$  grado HPLC Scharlab S.L.
- Ácido cítrico monohidratado, 99,5% J.T. Baker®
- Ácido orto fosfórico, 85 % J.T. Baker®
- Hidróxido de Potasio, Merck
- Metanol,  $\geq 99,9\%$  grado HPLC Merck
- 1-Octanol, 99% Sigma-Aldrich

#### 3.3.2. Estándares

##### a) Estándar de Iso- $\alpha$ -ácido

Nombre: DCHA-Iso, ICS-I3  
 Contenido de Iso- $\alpha$ -ácido: 62,3%  
 Fabricante: Labor Veritas AG

##### b) Estándar de Tetrahidroiso- $\alpha$ -ácido

Nombre: Tetra, ICS-T3  
 Contenido de Tetrahidroiso- $\alpha$ -ácido: 99,4%  
 Fabricante: Labor Veritas AG

En el Anexo A se explica la metodología para la preservación de estos estándares de calibración.

### 3.4. Estudio de validación del método

#### 3.4.1. Rango de trabajo

El rango de trabajo consistió en 5 niveles de concentración comprendidos entre 3 y 15 ppm a intervalos igualmente distribuidos tanto para iso- $\alpha$ -ácidos (IAA) y tetrahidro-iso- $\alpha$ -ácidos (THIAA).

La Tabla 3.1 muestra los niveles y la concentración establecidos para el rango de trabajo.

**Tabla 3.1.** Rango de trabajo

Nivel de Concentración	C <sub>IAA</sub> (mg/L)	C <sub>THIAA</sub> (mg/L)	Descripción
1	3	3	Concentración Baja
2	6	6	
3	9	9	Concentración Media
4	12	12	
5	15	15	Concentración Alta

Fuente: Elaboración Propia

### 3.4.2. Linealidad

A partir del rango de trabajo se prepararon 15 muestras que fueron distribuidas en 5 niveles de concentración con 3 réplicas por nivel de los estándares IAA y THIAA. La Ecuación 3.1 corresponde a la expresión algebraica de la recta de calibración.

$$Y = a + b \cdot X \quad \text{Ecuación 3.1.}$$

Para demostrar la linealidad del método se realizaron los cálculos que se explican a continuación.

#### 3.4.2.1. Cálculo de los parámetros de la regresión por ajuste de mínimos cuadrados

Para n=15 ensayos, Y<sub>i</sub> corresponde a las respuestas (áreas) y X<sub>i</sub> las concentraciones de estudio, los parámetros determinados son los que se indican a continuación:

Pendiente

$$b = \frac{\sum X_i \cdot Y_i - \frac{\sum X_i \cdot \sum Y_i}{n}}{\sum X_i^2 - \frac{(\sum X_i)^2}{n}} \quad \text{Ecuación 3.2.}$$

Ordenada en el origen

$$a = \frac{\sum Y_i - b \cdot \sum X_i}{n} \quad \text{Ecuación 3.3.}$$

Coefficiente de correlación

$$r = \frac{\sum x_i \cdot y_i - \frac{\sum x_i \cdot \sum y_i}{n}}{\sqrt{\left(\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n}\right) \left(\sum y_i^2 - \frac{(\sum y_i)^2}{n}\right)}} \quad \text{Ecuación 3.4.}$$

Varianza residual

$$S_{X,Y}^2 = \frac{\sum y_i^2 - a \sum y_i - b \cdot \sum x_i \cdot y_i}{n-2} \quad \text{Ecuación 3.5.}$$

Desviación estándar de la pendiente

$$S_b = \sqrt{\frac{S_{X,Y}^2}{\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n}}} \quad \text{Ecuación 3.6.}$$

Desviación estándar de la ordenada en el origen

$$S_a = \sqrt{S_b^2 \cdot \frac{\sum x_i^2}{n}} \quad \text{Ecuación 3.7.}$$

### 3.4.2.2. Prueba t-Student para verificar la regresión lineal en función del coeficiente de correlación

- Formulación de la hipótesis: Prueba bilateral

Hipótesis nula  $H_0$ : No existe correlación proporcional entre X e Y

Hipótesis alterna  $H_a$ : Existe correlación proporcional entre X e Y

- Selección y cálculo del estadístico:

El estadístico seleccionado está descrito en la Ecuación 3.8

$$t_{\text{Calculado}} = \frac{|r| \times \sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}} \quad \text{Ecuación 3.8.}$$



Su cálculo fue determinado a partir del coeficiente de correlación “r” y el número de mediciones “n”. El valor  $t_{\text{Tabla}}$  se obtuvo con n-2 grados de libertad con un nivel de confianza del 95%.

- Decisión:

Si  $t_{\text{Calculado}} < t_{\text{Tabla}}$ : Se acepta la Hipótesis nula.

Si  $t_{\text{Calculado}} > t_{\text{Tabla}}$ : Se acepta la Hipótesis alterna.

### 3.4.2.3. Prueba t de student de la pendiente

- Formulación de la hipótesis: Prueba bilateral

Hipótesis nula  $H_0$ :  $b = 0$

Hipótesis alterna  $H_a$ :  $b \neq 0$

- Selección y cálculo del estadístico:

El cálculo del estadístico seleccionado se realizó con la Ecuación 3.9.

$$t_{\text{Calculado}} = \frac{|b|}{S_b} \quad \text{Ecuación 3.9.}$$

El valor de  $t_{\text{Calculado}}$  se determinó mediante la relación entre la pendiente en valor absoluto “b” y la desviación estándar de la pendiente “ $S_b$ ”. El valor  $t_{\text{Tabla}}$  se obtuvo con n-2 grados de libertad con un nivel de confianza del 95%.

Decisión:

Si  $t_{\text{Calculado}} < t_{\text{Tabla}}$ : Se acepta la Hipótesis nula.

Si  $t_{\text{Calculado}} > t_{\text{Tabla}}$ : Se acepta la Hipótesis alterna.

### 3.4.2.4. Prueba t de student del intercepto

- Formulación de la hipótesis: Prueba bilateral

Hipótesis nula  $H_0$ :  $a = 0$

Hipótesis alterna  $H_a$ :  $a \neq 0$

- Selección y cálculo del estadístico:

El estadístico seleccionado fue calculado con la Ecuación 3.10.

$$t_{\text{Calculado}} = \frac{|a|}{S_a} \quad \text{Ecuación 3.10.}$$

Para calcular este estadístico se halló la relación entre la ordenada en el origen en valor absoluto “a” y la desviación estándar de la ordenada en el origen “Sa”. El valor  $t_{\text{Tabla}}$  se obtuvo con n-2 grados de libertad con un nivel de confianza del 95%.

Decisión:

Si  $t_{\text{Calculado}} < t_{\text{Tabla}}$ : Se acepta la Hipótesis nula.

Si  $t_{\text{Calculado}} > t_{\text{Tabla}}$ : Se acepta la Hipótesis alterna.

### 3.4.2.5. Intervalos de confianza de la pendiente y ordenada en el origen

Los intervalos de confianza para la pendiente y la ordenada en el origen se calcularon con la Ecuación 3.11 y Ecuación 3.12 respectivamente, para ambos intervalos se empleó un nivel de confianza de 95% y n-2 grados de libertad.

Pendiente:  $b = b \pm t_{(0,05; n-2)} \cdot S_b$  Ecuación 3.11.

Ordenada en el origen:  $a = a \pm t_{(0,05; n-2)} \cdot S_a$  Ecuación 3.12.

### 3.4.2.6. Criterios de Aceptación para el estudio de linealidad

Los criterios aceptación para el estudio de linealidad se muestran en la siguiente tabla:

**Tabla 3.2.** Criterios de aceptación para el estudio de linealidad

Prueba	Criterio de aceptación	Conclusión
Prueba t de student para verificar la regresión lineal	$t_{\text{Calculado}} > t_{\text{Tabla}}$	Existe correlación proporcional entre X e Y
Prueba t de student de la pendiente	$t_{\text{Calculado}} > t_{\text{Tabla}}$	La pendiente 'b' es diferente de cero
Prueba t de student del intercepto	$t_{\text{Calculado}} < t_{\text{Tabla}}$	El intercepto 'a' es igual a cero

**Fuente:** Elaboración Propia

### 3.4.3. Precisión

Para la determinación de la precisión expresada en términos de repetibilidad del método se utilizaron 3 niveles de concentraciones (baja, media y alta) de IAA y THIAA con 3 réplicas para cada nivel, los cálculos realizados son los siguientes:

#### 3.4.3.1. Normalidad de las áreas para cada nivel de concentración

Se estudió la normalidad para los tres niveles de concentración mediante la prueba de normalidad de Anderson – Darling, esta prueba consistió en analizar los gráficos elaborados con el software Minitab® 18.1 y el Valor p:

Si Valor p  $\geq$  0,05: Las áreas tienen distribución normal.

Si Valor p  $<$  0,05: Las áreas no tienen distribución normal.

#### 3.4.3.2. Cálculo de los coeficientes de variación ( $RSD_{\text{Calculado}}$ )

El coeficiente de variación es la relación entre la desviación estándar y el promedio expresado en porcentaje correspondientes a las áreas de los tres niveles de concentración analizados, tal como indica la Ecuación 3.13.

$$RSD_{\text{Calculado}} = \frac{S}{X_p} \times 100\% \quad \text{Ecuación 3.13.}$$

#### 3.4.3.3. Cálculo de los coeficientes de variación de Horwitz ( $RSD_{\text{Horwitz}}$ )

Los coeficientes de variación de Horwitz se calcularon con la consideración de que el término “c” de la Ecuación 3.14 está expresado en potencia de diez, y es igual a  $10^{-6}$ , debido a que la unidad establecida para denotar la concentración fue definida como miligramo por litro (mg / L).

$$RSD_{\text{Horwitz}} = 2^{1-0,5 \cdot \text{Log}(c \cdot 10^{-6})} \quad \text{Ecuación 3.14.}$$

#### 3.4.3.4. Homogeneidad de varianzas

Se utilizó la prueba de homogeneidad de varianzas de Cochran, estableciendo las siguientes hipótesis:

Hipótesis nula  $H_0$ : La concentración no influye significativamente en la variabilidad de los resultados.

Hipótesis alterna  $H_a$ : La concentración influye significativamente en la variabilidad de los resultados.

Si  $G_{\text{Calculado}} < G_{\text{Tabla}}$ : Se acepta la Hipótesis nula  
 Si  $G_{\text{Calculado}} > G_{\text{Tabla}}$ : Se acepta la Hipótesis alterna

Para la determinación del valor de  $G_{\text{Calculado}}$  se empleó la Ecuación 3.15.

$$G_{\text{Calc}} = \frac{\text{el mayor } S_i^2}{\sum_{i=1}^k S_i^2} \quad \text{Ecuación 3.15.}$$

Dónde  $S^2_{\text{MAX}}$  es el mayor valor de la varianza y  $S_i$  es la varianza perteneciente a cada nivel de concentración. El valor de  $G_{\text{Tabla}}$  fue determinado con  $k=3$ ,  $n=3$  y con un nivel de confianza del 95%.

### 3.4.3.5. Criterios de aceptación del estudio de repetibilidad

Los criterios aceptación para el estudio de repetibilidad se detallan en la Tabla 3.3.

**Tabla 3.3.** Criterios de aceptación para el estudio de repetibilidad

Prueba	Criterio de aceptación	Conclusión
Prueba de normalidad de Anderson-Darling	Valor $p \geq 0,05$	Las Áreas poseen una distribución normal
Comparación de los coeficientes de variación con el coeficiente de variación de Horwitz	$RSD_{\text{Calculado}} (\%) < 0,67 \times RSD_{\text{Horwitz}} (\%)$	El método es repetible
Prueba de Homogeneidad de Varianzas (Test de Cochran)	$G_{\text{Calculado}} < G_{\text{Tabla}}$	No hay diferencias significativas entre los niveles de concentración

Fuente: Elaboración Propia

### 3.4.4. Límite de detección (LOD) y Límite de cuantificación (LOQ)

Estos límites se calcularon de acuerdo a las Ecuaciones 2.11 y 2.12, donde el valor de la pendiente y la desviación estándar de la ordenada en el origen fueron hallados en el estudio de linealidad. Las unidades para el LOD y LOQ corresponden a miligramos por litro (mg / L).

### 3.5. Muestreo

Los elementos del muestreo fueron proporcionados por la Cervecería Boliviana Nacional. La selección de los muestras se realizó con la técnica de muestreo no probabilístico por conveniencia, bajo el criterio de que las muestras provenían de las principales plantas de producción de la empresa, ubicadas en distintas ciudades de Bolivia (La Paz, Cochabamba y Santa Cruz).

Los criterios establecidos para el muestreo se basaron en la identificación, almacenamiento y acondicionamiento de los ítems.

#### 3.5.1. Identificación

Los ítems de ensayo se identificaron a través de la información proporcionada por la descripción y características de la muestra, en función a estos atributos se asignó un código a las mismas. En la Tabla 3.4 se expone el formulario que reúne dicha información.

**Tabla 3.4.** Formulario para registro de las muestras

DESCRIPCIÓN DE LAS MUESTRAS						
Tipo de muestra						
Tipo de envase						
Responsable						
CARACTERÍSTICAS DE LAS MUESTRAS						
Número de ítem	Procedencia	Marca	Tipo	Lote	Presentación	Código Asignado
Observaciones :						

**Fuente:** Elaboración Propia

#### 3.5.2. Almacenamiento

Las cervezas se almacenaron bajo las consideraciones que se explican a continuación:

- Protección de la luz: Se eligió una ubicación dentro del laboratorio donde las muestras no estaban expuestas directamente a la luz.
- Posición: Las botellas de cerveza se almacenaron en posición vertical, de esa forma se evitó el contacto del líquido con la corcholata que podría haber ocasionado alteraciones para su posterior análisis.

- Condiciones de ambientales: Se evitó la exposición de las muestras a cambios de temperatura extremos, por lo que se almacenaron en un lugar fresco y a temperatura ambiente.

### **3.5.3. Acondicionamiento**

La siguiente secuencia de actividades fue aplicada antes de la introducción de las muestras en el cromatógrafo.

- Estabilización de las botellas de cerveza a temperatura ambiente.
- Abrir con precaución las botellas para evitar el desbordamiento vigoroso de la espuma.
- Verter la cerveza cuidadosamente para evitar la pérdida de espuma en vasos de precipitados.
- Preparación de las muestras de acuerdo a las indicaciones del método.
- Dilución de la muestra para proteger la columna cromatográfica.

### **3.6. Cuantificación de IAA y THIAA en muestras de cerveza**

Cada ítem fue analizado por duplicado bajo las condiciones operativas del método y se determinaron las concentraciones totales de IAA y THIAA en las muestras de cerveza.

#### **3.6.1. Procedimiento**

La preparación de las muestras de cerveza así como su dilución antes de ser introducidas al módulo del automuestreador del equipo se describen a continuación:

- 1) Verter con mucho cuidado la cerveza en un vaso de precipitado sin perder la espuma.
- 2) Agregar dos gotas de octanol.
- 3) Llevar el vaso de precipitado al baño de ultrasonidos y realizar la desgasificación por 15 minutos.
- 4) Retirar el vaso del equipo.
- 5) Verter 10 mL de muestra en un matraz aforado de 100 mL.
- 6) Completar hasta la marca con el eluyente "A" y mezclar.
- 7) Armar el cartridge de filtración con el correspondiente filtro de nitrato de celulosa de 0,2  $\mu\text{m}$ .
- 8) Extraer con una jeringa la muestra diluida
- 9) Filtrar la muestra a través del cartridge al vial.

Una vez culminado los respectivos análisis, el software del equipo proporcionó la identificación e integración de los picos cromatográficos correspondientes a los analitos de estudio.

Se determinó el área total de los picos cromatográficos de IAA y THIAA, a partir de esta información, se calculó la concentración de estos analitos en las muestras con las ecuaciones de las rectas de calibración de cada estándar. La estimación del error asociado a la concentración fue calculada por medio de la Ecuación 3.16.

$$S_{x_0} = \frac{S_{x,y}}{b} \cdot \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(Y_0 - \bar{Y})^2}{b^2 \sum_i (X_i - \bar{X})^2}} \quad \text{Ecuación 3.16.}$$

Dónde

$Y_0$ : Valor experimental a partir del cual se determinó el valor de la concentración  $X_0$ .

$m$ : Número de réplicas para obtener el valor de  $Y_0$ .

$S_{x_0}$ : Desviación estándar estimada de la concentración.

En esta ecuación,  $Y_0$  es el valor experimental a partir del cual se determinó el valor de la concentración  $X_0$ ,  $S_{x_0}$  es la desviación estándar estimada de la concentración y “ $m$ ” es el número de réplicas para obtener el valor de  $Y_0$ ,  $b$  corresponde al valor de la pendiente de la recta de calibración,  $n$  es el número de ensayos realizados para la calibración y  $S_{x,y}$  es la desviación estándar residual (Miller & Miller, 2002).

El intervalo de confianza de las concentraciones de IAA y THIAA en las muestras analizadas se calculó con la Ecuación 3.17 al 95% de nivel de confianza y con  $n-2$  grados de libertad, donde  $X_0$ ,  $C_{Prom}$  son las concentraciones promedio y  $E_{Abs}$  es el error absoluto (Miller & Miller, 2002).

$$X = X_0 \pm t_{(n-2)} \cdot S_{x_0} = C_{Prom} \pm E_{Abs} \quad \text{Ecuación 3.17.}$$

El valor real fue establecido como (que se acerca al valor exacto) la media aritmética simple de los resultados para cada muestra analizada. El cálculo del error relativo,  $e_R$  (%), se realizó con la Ecuación 3.18.

$$e_R(\%) = \frac{E_{Abs}}{C_{Prom}} \times 100\% \quad \text{Ecuación 3.18.}$$

### 3.6.2. Criterios de aceptación

En la Tabla 3.5 se presenta los criterios para la aceptación del valor de la concentración de IAA y THIAA en muestras de cerveza.

**Tabla 3.5.** Criterios de aceptación para los ítems analizados

Parámetro	Criterio de Aceptación	Conclusión
Concentración IAA y THIAA (mg / L)	> LOQ	La concentración del analito analizado es cuantificable
	$e_R(\%) < 5\%$	El resultado es aceptable

**Fuente:** Elaboración Propia

Los valores de concentración de los analitos son válidos si éstos son superiores al límite de cuantificación del método. El valor máximo del error relativo se fijó al 5% debido porque las concentraciones de estos compuestos en las muestras fueron a nivel traza (mg / L).

### 3.7. Estructura de costos

La necesidad de la empresa es cuantificar IAA y THIAA en muestras de cerveza por duplicado y con una frecuencia mensual, es por esta razón que el estudio se realizó bajo estas condiciones.

Para la elaboración de la estructura de costos se reunió información de los costos de energía eléctrica, agua potable, reactivos, materiales y consumibles del cromatógrafo líquido de alta resolución. Este estudio se realizó en función del número de inyecciones, que a su vez, depende de la cantidad de muestras y sus correspondientes réplicas de acuerdo a la siguiente relación:

$$\# \text{ Inyecciones} = \text{Cantidad de muestras} \times \text{Réplicas} \quad \text{Ecuación 3.19.}$$

A continuación se describen otros aspectos considerados por el IIDEPROQ que son incluidos en la estructura de costos:

- Fondo de mantenimiento y reposición: Es un fondo para cubrir requerimientos de mantenimiento de los equipos y restitución de materiales que intervienen en la realización del análisis, representa al 5 % del costo total.
- Gastos generales y administrativos: Estos gastos involucran actividades financieras realizadas en el área desconcentrada de la Facultad de Ingeniería y corresponden a un 10 % del costo total.
- Utilidad: Es la ganancia que recibe el IIDEPROQ por la prestación de servicios de análisis y representa a un 5,5 % del costo total.



- Impuestos: Son costos relacionados a la facturación y otros, emitidos por el área desconcentrada de la Facultad de Ingeniería y pertenece a un 26 % del costo total.

Los costos fueron clasificados en costos fijos y costos variables, cada categoría está compuesta de actividades que son descritas a continuación:

### **3.7.1. Costos fijos mensuales**

Las actividades que conforman a los costos fijos mensuales son las siguientes:

- Mano de obra: El costo de mano de obra se aplica a un analista de laboratorio que esté encargado de realizar los análisis de las muestras de cerveza en el cromatógrafo líquido de alta resolución y su compromiso para implementar, mantener y mejorar los requisitos de la norma ISO/IEC 17025:2017.
- Fondo de acreditación: Es un fondo destinado a la acreditación del método analítico con la norma ISO/IEC 17025:2017, es otorgada por la Dirección Técnica de Acreditación (DTA) y tiene una validez de tres años (el primer y segundo año es seguimiento, mientras que el tercer año se realiza la re-acreditación). La implementación de la norma mencionada asegura la competencia, la imparcialidad y la operación coherente del laboratorio.
- Mantenimiento del equipo previo al análisis: Este mantenimiento consiste en el uso de energía eléctrica, solventes y consumibles del cromatógrafo para la desgasificación de las fases móviles que intervienen en el análisis y la estabilización de la columna cromatográfica, estas actividades tienen como objetivo acondicionar el equipo para obtener resultados coherentes.
- Mantenimiento del equipo posterior al análisis: Comprende el uso de solventes, energía eléctrica y consumibles del equipo para realizar ciclos de limpieza para la columna y los componentes internos del equipo con la finalidad de hacer un uso eficiente de los mismos y evitar su deterioro acelerado.
- Uso de equipos de protección personal en el laboratorio: Debido a que se trabaja con solventes tóxicos, se utiliza gafas de seguridad, una bata de laboratorio y guantes de nitrilo.
- Consumo de agua potable: Incluye los servicios higiénicos y también el requerimiento de agua potable para el lavado de material, producción de agua destilada, agua desionizada y limpieza del laboratorio.
- Depreciación: Es la pérdida del valor económico del cromatógrafo líquido de alta resolución a lo largo de un periodo de tiempo, definido como vida útil.

### 3.7.2. Costos variables mensuales

Dentro de los costos variables mensuales se definen las actividades que son descritas a continuación:

- Preparación eluyente A: La preparación de esta fase móvil implica el uso de energía eléctrica, consumo de reactivos y materiales, el costo referente a esta actividad es aplicable hasta 24 muestras.
- Preparación de la muestra: Las muestras deben ser acondicionadas antes de ser introducidas al equipo y para esta tarea se utiliza energía eléctrica, reactivos y materiales.
- Análisis de la muestra en el cromatógrafo: Las muestras son introducidas al módulo del auto muestreador del equipo y según a la cantidad de las mismas se utilizan solventes, energía eléctrica y los consumibles del cromatógrafo.
- Re-Calibración del método: El método analítico será nuevamente calibrado cuando se realicen cambios que influyen en el desempeño del mismo como ser reparaciones en el equipo, cambio de consumibles cuando cumplan sus ciclos de operación, sustitución de columnas y reemplazo de la precolumna. El costo de re-calibración se realizó en base a las recomendaciones del método, en el que indica que se haga un cambio de precolumna cada 150 inyecciones aproximadamente, por lo que el costo mensual referente a la re-calibración depende de la cantidad de muestras que serán analizadas tomando como ciclo de operación 150 inyecciones.

## CAPÍTULO IV

### 4. TRABAJO Y ACTIVIDADES DESARROLLADAS

#### 4.1. Trabajo desarrollado

##### 4.1.1. Limpieza del área de trabajo

La limpieza del área de trabajo tiene como finalidad eliminar o reducir aquellas perturbaciones que pueden afectar a la validez de los resultados. Entre estas alteraciones, cabe mencionar la presencia de polvo, humedad, etc. que afectan al funcionamiento del equipo, contaminan los reactivos, fases móviles y muestras.

##### 4.1.2. Trabajo preliminar a la implementación del método

El método analítico fue facilitado por la Cervecería Boliviana Nacional S.A. a partir de la documentación de los procedimientos físico-químicos del área de aseguramiento de calidad de la empresa multinacional AB InBev.

Para asegurar la correcta implementación de esta metodología, se evaluaron preliminarmente las especificaciones de la misma y fueron contrastadas con las características del equipo y condiciones ambientales del IIDEPROQ, a partir de esa información se realizaron algunas modificaciones que se exponen en la Tabla 4.1.

**Tabla 4.1.** Modificación al método analítico proporcionado

Características	Modificación (Si / No)	Valor aplicado
Longitud de onda	No	N / A
Temperatura del horno	Si	T = 25 °C
Volumen de inyección	No	N / A
Longitud de la columna	No	N / A
Diámetro interno de la columna	No	N / A
Empaque de la columna	No	N / A
Perfil del gradiente	No	N / A
Preparación de la muestra	Si	Factor de dilución: 10

**Fuente:** Elaboración Propia

Las nuevas condiciones, se determinaron en el IIDEPROQ, de acuerdo a las siguientes consideraciones:

Temperatura del horno: Los picos cromatográficos de los analitos relevantes se eluyeron con una resolución aceptable y mejor repetibilidad de los tiempos de retención a la temperatura de 25 °C.

Preparación de la muestra: La elución de los analitos IAA y THIAA en muestras de cerveza se realizaron sin una precolumna, las medidas adoptadas para proteger la columna son las siguientes:

- El método original indica la inyección directa de las muestras de cerveza, sin embargo éstas se filtraron con filtros de nitrato de celulosa de 0,20 µm.
- Las muestras han sido diluidas con un tampón acuoso y se aplicó un factor de dilución igual a 10.

#### 4.1.3. Verificación del equipo previo a su uso

La verificación se llevó a cabo a través de un control visual que incluye las siguientes etapas:

- Detección de contaminantes (material particulado, polvo, etc.) en los recipientes de las fases móviles como se muestra en la Figura 4.1.



**Figura 4.1.** Revisión de las fases móviles. **Fuente:** Elaboración Propia

- Revisión del estado operativo del UPS y estabilizador.
- Comprobación del funcionamiento de todos los módulos del cromatógrafo después de haber sido encendido.





c) Flujo con los solventes que indica el método.

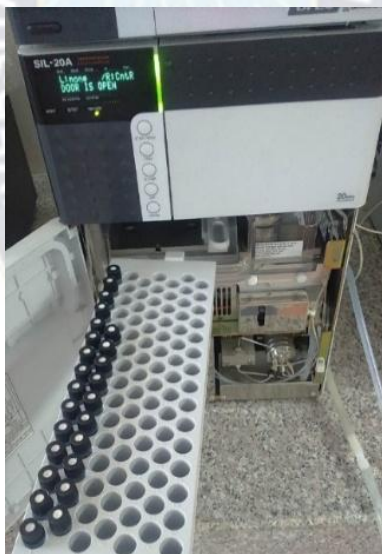
Finalmente se ajustó el caudal al valor que especifica el método empleado y se procedió a la realización de los análisis en el cromatógrafo líquido

#### 4.2.4. Seguimiento del desempeño de la columna cromatográfica

Para comprobar el funcionamiento correcto de la columna se procedió al seguimiento de su desempeño mediante el registro de la presión en la hoja de control del cromatógrafo.

#### 4.2.5. Preparación e inyección de las soluciones estándar de trabajo y muestras

La naturaleza de la muestra define el modo básico de su preparación antes de ser inyectada al cromatógrafo. Las soluciones estándar de trabajo y las muestras de cerveza son líquidas y requieren un tratamiento previo sencillo, ambas son desgasificadas en el baño de ultrasonidos y filtradas con un filtro de 0,20  $\mu\text{m}$ . La Figura 4.5 muestra la introducción de las muestras para ser analizadas.



**Figura 4.5.** Introducción de muestras en el automuestreador. **Fuente:** Elaboración Propia.

Las muestras líquidas filtradas están contenidas en viales, estos recipientes de vidrio tienen un volumen de 1,5 mL y son depositados en un rack cuya capacidad es de 105 viales.

## CAPITULO V

### 5. RESULTADOS LOGRADOS

#### 5.1. Estudio de validación del método

El método analítico es capaz de eluir dos picos de Iso- $\alpha$ -ácidos y cinco picos de Tetrahydro-iso- $\alpha$ -ácidos, sin embargo para el estudio de validación se consideró las concentraciones globales, en los anexos B, C y D se encuentran los cromatogramas y los valores de las áreas correspondientes a los niveles de concentración estudiados para ambos compuestos.

##### 5.1.1. Linealidad

El estudio de linealidad se realizó para demostrar que el método analítico tiene la capacidad para obtener respuestas, en este caso, áreas, proporcionales al nivel de concentración dentro del rango de trabajo establecido. Las respuestas correspondientes a cada nivel de concentración de Iso- $\alpha$ -ácidos y Tetrahydro-iso- $\alpha$ -ácidos se presentan en la Tabla 5.1.

**Tabla 5.1.** Respuestas obtenidas para la linealidad

Concentración (mg / L)	Áreas IAA			Áreas THIAA		
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
3	344063	341835	342525	349255	358150	351965
6	597952	599656	595983	708125	696419	712180
9	958021	952750	948749	1048567	1057512	1048689
12	1262485	1271094	1262553	1411947	1411027	1417062
15	1532434	1522489	1527634	1786993	1779119	1774431

**Fuente:** Elaboración Propia

El cálculo de los parámetros de la regresión lineal fue realizado por ajuste de mínimos cuadrados a través de las ecuaciones 3.2 a 3.7. Los resultados se exponen en la Tabla 5.2.

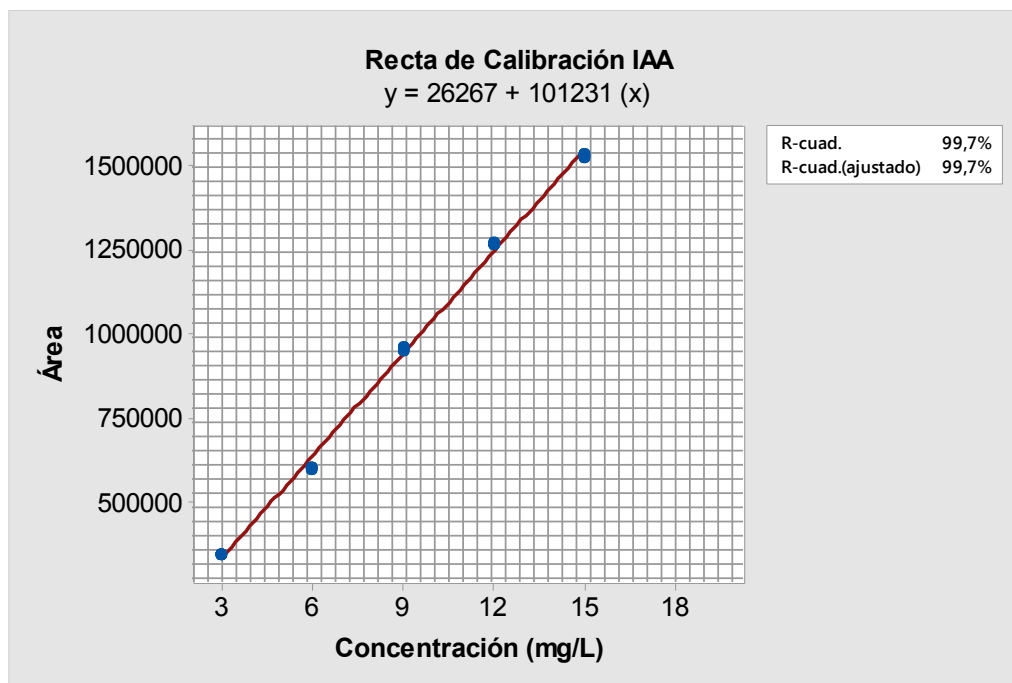
**Tabla 5.2.** Resultados de la regresión lineal

Parámetros de Regresión Lineal	IAA	THIAA
Ordenada en el origen (a)	26267,3	-7803,067
Pendiente (b)	101231,211	118729,533
Coefficiente de determinación ( $R^2$ )	0,9972	0,9998
Coefficiente de correlación (r)	0,9986	0,9999
Varianza residual ( $S^2_{x, y}$ )	608181733	64648654,78
Desviación estándar de la ordenada en el origen ( $S_a$ )	14933,183	4868,727
Desviación estándar de la pendiente ( $S_b$ )	1500,841	489,326

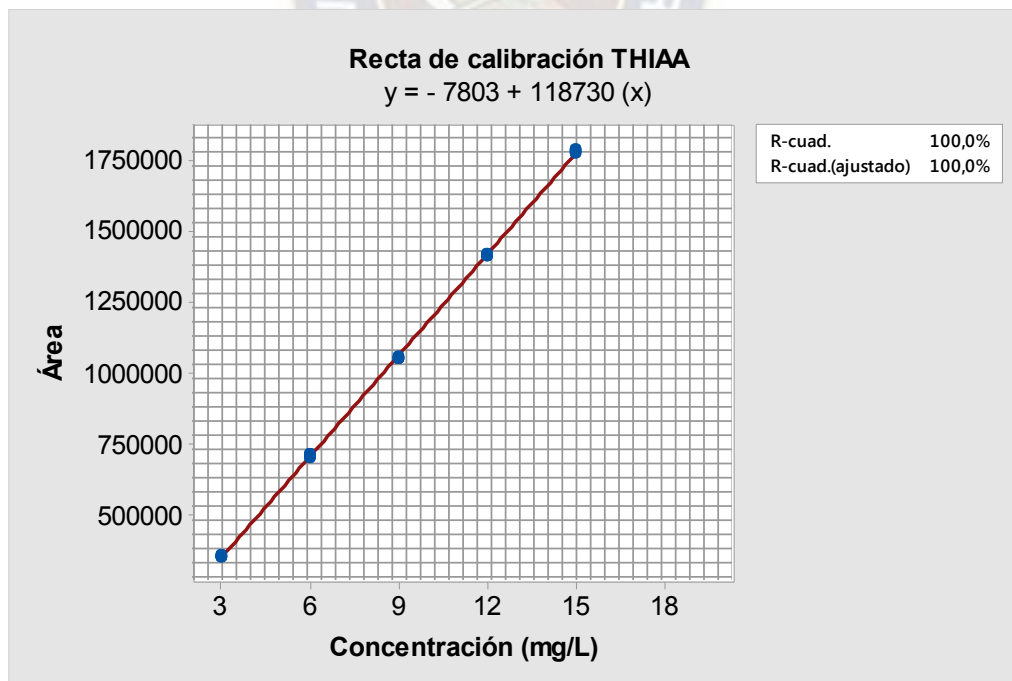
**Fuente:** Elaboración Propia



La representación gráfica de la concentración de Iso- $\alpha$ -ácidos y Tetrahydro-iso- $\alpha$ -ácidos frente a sus respuestas (áreas) se pueden observar en la Figura 5.1. y Figura 5.2 respectivamente.



**Figura 5.1.** Recta de calibración para IAA. **Fuente:** Elaboración Propia



**Figura 5.2.** Recta de calibración para THIAA. **Fuente:** Elaboración Propia

En la Prueba t de student para verificar la regresión lineal en base al coeficiente de correlación con un nivel de confianza del 95%, el valor  $t_{\text{Tabla}}$  se obtiene con 13 grados de libertad y el  $t_{\text{Calculado}}$  fue hallado con la Ecuación 3.8, dando como resultado los valores que se exponen en la Tabla 5.3.

**Tabla 5.3.** Valores del estadístico t para evaluar la regresión lineal

	$t_{\text{Calculado}}$	$t_{\text{Tabla}}$
IAA	68,043	2,16
THIAA	254,925	2,16

**Fuente:** Elaboración Propia

Para evaluar la pendiente se empleó un nivel de confianza del 95%, el valor  $t_{\text{Tabla}}$  se obtiene con 13 grados de libertad y el  $t_{\text{Calculado}}$  fue obtenido de la Ecuación 3.9. La Tabla 5.4 presenta los valores obtenidos para esta prueba.

**Tabla 5.4.** Valores del estadístico t para evaluar la pendiente

	$t_{\text{Calculado}}$	$t_{\text{Tabla}}$
IAA	67,45	2,16
THIAA	242,639	2,16

**Fuente:** Elaboración Propia

El análisis estadístico del intercepto se realizó con un nivel de confianza del 95%, el valor  $t_{\text{Tabla}}$  se obtiene con 13 grados de libertad y el  $t_{\text{Calculado}}$  se calculó con la Ecuación 3.10, los resultados se indican en la Tabla 5.5.

**Tabla 5.5.** Valores del estadístico t para evaluar el intercepto

	$t_{\text{Calculado}}$	$t_{\text{Tabla}}$
IAA	1,759	2,16
THIAA	1,603	2,16

**Fuente:** Elaboración Propia

Finalmente los intervalos de confianza para la ordenada en el origen y la pendiente fueron calculados con un 95% de nivel de confianza mediante las ecuaciones 3.11 y 3.12, los resultados se muestra en la Tabla 5.6.

**Tabla 5.6.** Intervalos de confianza de la pendiente y ordenada en el origen

	IAA		THIAA	
	Límite Inferior	Límite Superior	Límite Inferior	Límite Superior
Ordenada en el origen (a)	-5988,375	58522,975	-18319,517	2713,383
Pendiente (b)	97989,394	104473,028	117672,589	119786,477

**Fuente:** Elaboración Propia

### 5.1.2. Precisión

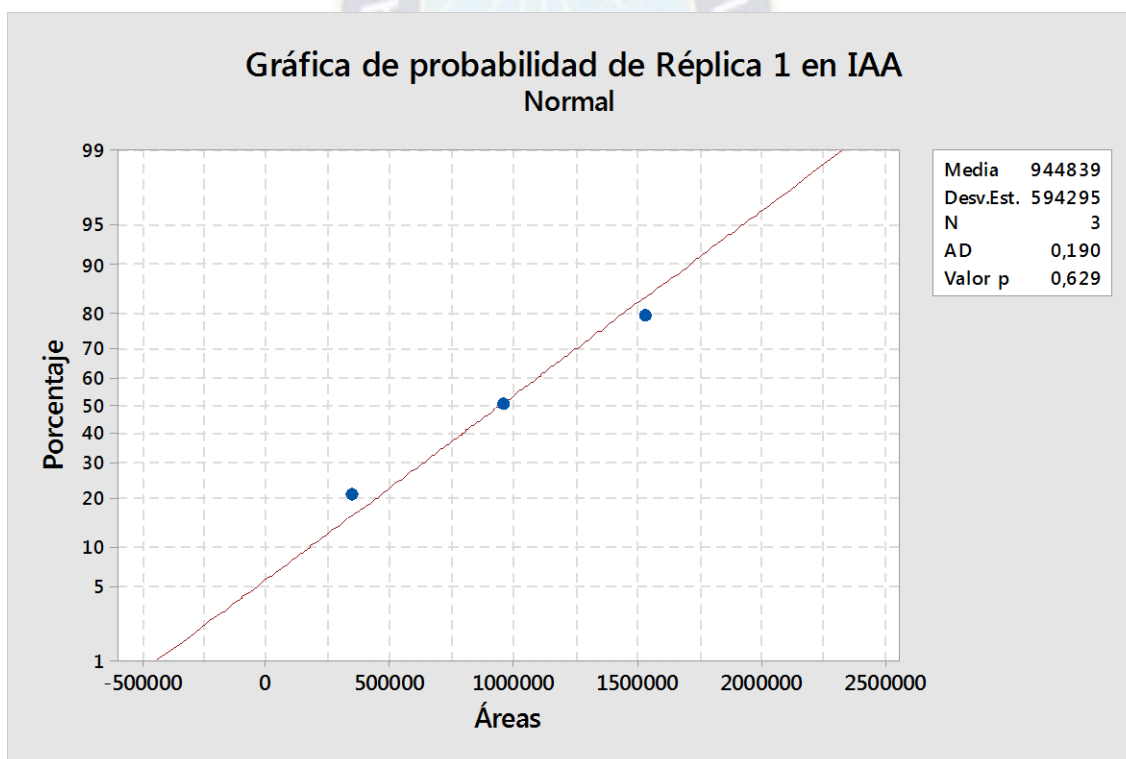
Una manera de expresar la precisión del método es a través de la repetibilidad, la Tabla 5.7 manifiesta los resultados para la repetibilidad de IAA y THIAA respectivamente.

**Tabla 5.7.** Respuestas obtenidas para la repetibilidad

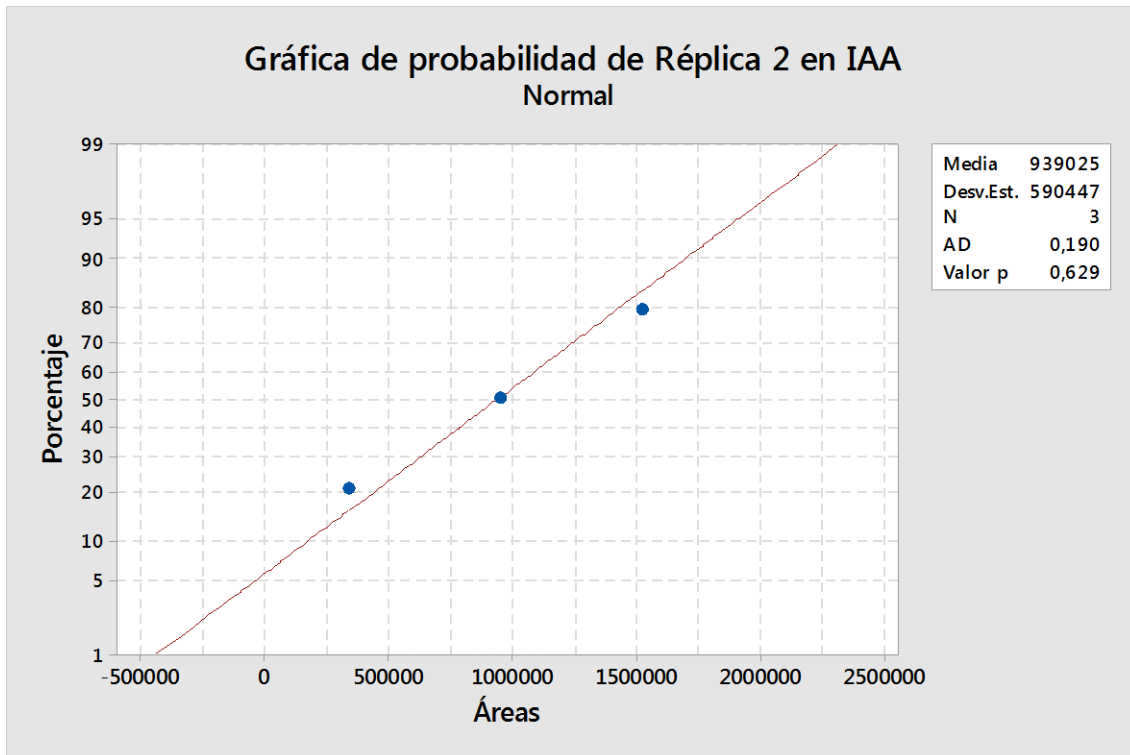
Concentración (mg / L)	Áreas IAA			Áreas THIAA		
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
3	344063	341835	342525	349255	358150	351965
9	958021	952750	948749	1048567	1057512	1048689
15	1532434	1522489	1527634	1786993	1779119	1774431

**Fuente:** Elaboración Propia

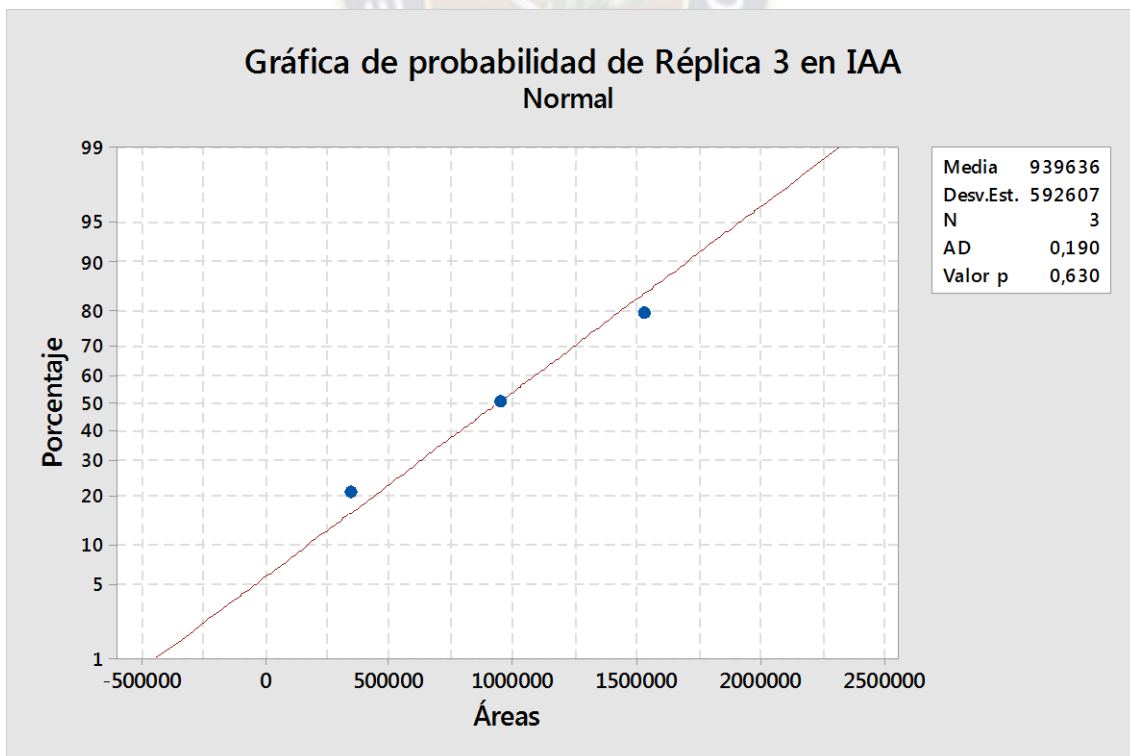
Los gráficos de normalidad permiten determinar si las áreas obtenidas tienen una distribución normal, para las concentraciones de IAA estos gráficos se muestran en las Figuras 5.3 a 5.5.



**Figura 5.3.** Gráfico de normalidad para la réplica 1 de IAA. **Fuente:** Elaboración Propia.

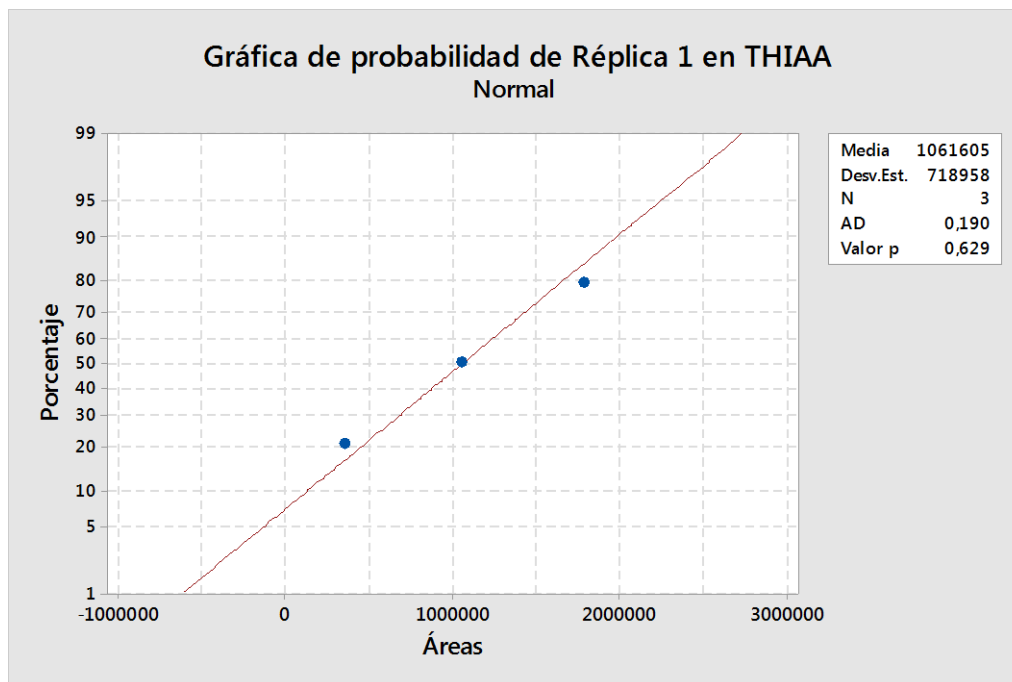


**Figura 5.4.** Gráfico de normalidad para la réplica 2 de IAA. **Fuente:** Elaboración Propia.

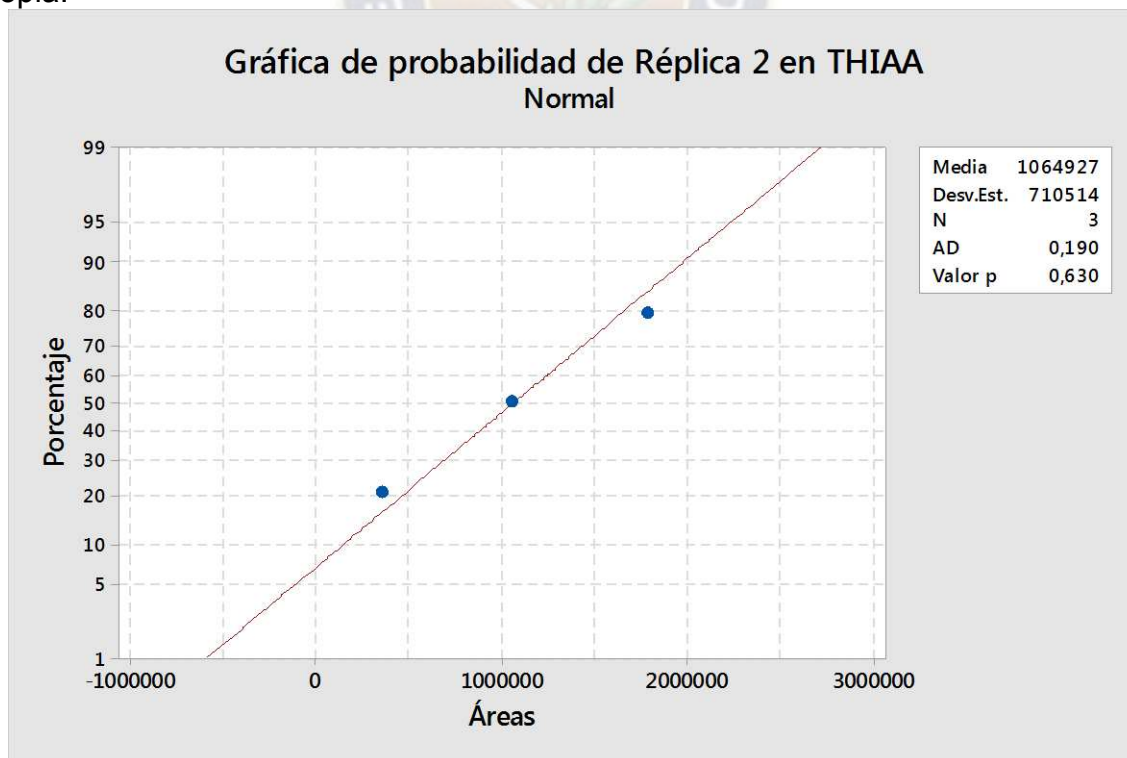


**Figura 5.5.** Gráfico de normalidad para la réplica 3 de IAA. **Fuente:** Elaboración Propia.

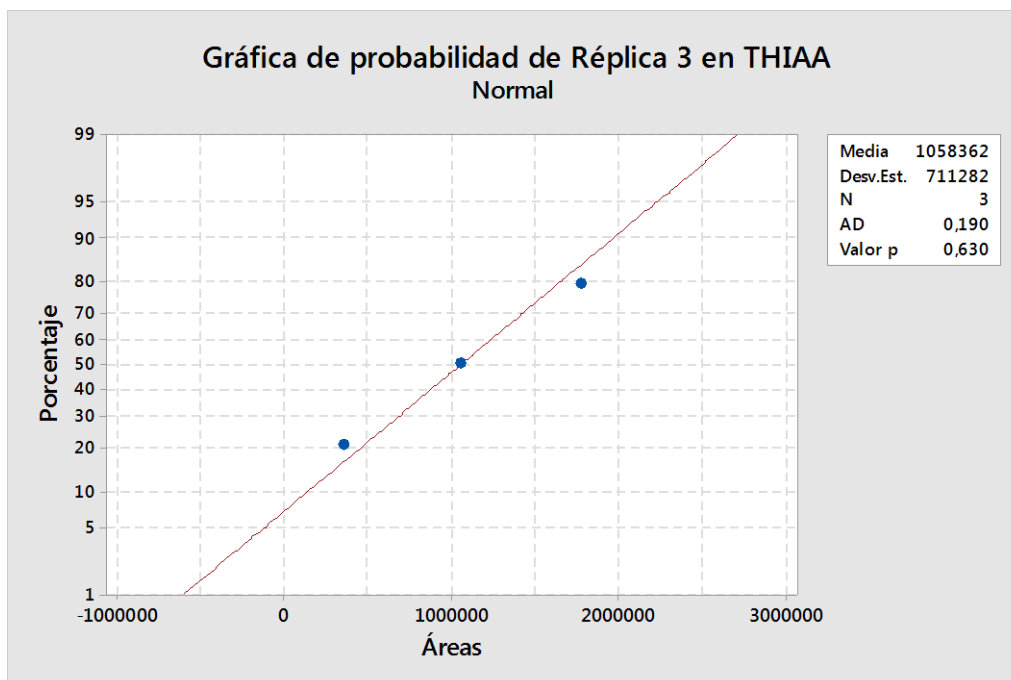
De la misma manera, los gráficos de normalidad para las tres réplicas de THIAA se presentan en las Figuras 5.6 a 5.8.



**Figura 5.6.** Gráfico de normalidad para la réplica 1 de THIAA. **Fuente:** Elaboración Propia.



**Figura 5.7.** Gráfico de normalidad para la réplica 2 de THIAA. **Fuente:** Elaboración Propia.



**Figura 5.8.** Gráfico de normalidad para la réplica 3 de THIAA. **Fuente:** Elaboración Propia

Los coeficientes de variación calculados y el coeficiente de variación de Horwitz se hallaron con las ecuaciones 3.13 y 3.14 para ambos analitos y estos valores se presentan en la Tabla 5.8.

**Tabla 5.8.** Coeficientes de variación calculados

	IAA	THIAA	
C (mg / L)	RSD Calculado (%)	RSD Calculado (%)	0,67 x RSD Horwitz (%)
3	0,333	1,291	9,086
9	0,488	0,488	7,701
15	0,326	0,357	7,131

**Fuente:** Elaboración Propia

La Ecuación 3.15 permite hacer el cálculo del estadístico “G” para aplicar la prueba homogeneidad de varianzas en ambos analitos, estos valores se exponen en la Tabla 5.9.

**Tabla 5.9.** Valores de “G” del Test de Cochran

	G Calculado	G Tabla
IAA	0,519	0,8709
THIAA	0,461	0,8709

**Fuente:** Elaboración Propia

### 5.1.3. Límite de detección (LOD) y Límite de cuantificación (LOQ)

La Tabla 5.10 indica los valores de los límites de detección y cuantificación expresados en mg / L para IAA y THIAA calculados a partir de las rectas de calibración y las ecuaciones 2.11 y 2.12.

**Tabla 5.10.** Límites de detección y cuantificación

	LOD (mg / L)	LOQ (mg / L)
IAA	0,487	1,475
THIAA	0,135	0,410

**Fuente:** Elaboración Propia

### 5.2. Muestreo

Los elementos del muestreo realizado se exponen en la Figura 5.9



**Figura 5.9.** Elementos muestreados. **Fuente:** Elaboración Propia

La codificación asignada fue resultado de la combinación de la marca de la cerveza y su respectivo lote, en la Tabla 5.11 se detalla la codificación de las muestras analizadas en base a su información.

**Tabla 5.11.** Registro y codificación de las muestras analizadas

DATOS DE LA MUESTRA						
Tipo de muestra	Cerveza					
Tipo de envase	Vidrio					
Responsable	Marcelo Medrano Tapia					
CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA						
Número de ítem	Procedencia	Marca	Tipo	Lote	Presentación	Código Asignado
1	Santa Cruz	Paceña	Pilsener	162S	Botella 710 mL	Paceña 162S
2	Cochabamba	Paceña	Pilsener	245Q	Botella 710 mL	Paceña 245Q
3	La Paz	Paceña	Pilsener	240P	Botella 620 mL	Paceña 240P
Observaciones: Sin observaciones						

Fuente: Elaboración Propia

**5.3. Cuantificación de IAA y THIAA en muestras de cerveza**

El error absoluto se calculó a través de las ecuaciones 3.16 y 3.17, los resultados se exponen en la Tabla 5.12 y 5.13 para IAA y THIAA respectivamente.

**Tabla 5.12.** Error absoluto de la concentración de IAA

Código	Réplica	Área	Área Promedio	Factor de Dilución	C <sub>IAA</sub> Promedio (mg / L)	S <sub>x0</sub>	Error Absoluto
Paceña 162S	1	37757	37672	10	1,127	0,203	0,438
	2	37587					
Paceña 245Q	1	44992	44626,5	10	1,814	0,202	0,436
	2	44261					
Paceña 240P	1	115096	113627,5	10	8,630	0,196	0,423
	2	112159					

Fuente: Elaboración Propia

**Tabla 5.13.** Error absoluto de la concentración de THIAA

Código	Réplica	Área	Área Promedio	Factor de Dilución	C <sub>THIAA</sub> Promedio (mg / L)	S <sub>x0</sub>	Error Absoluto
Paceña 162S	1	93226	92515	10	8,449	0,061	0,132
	2	91804					
Paceña 245Q	1	75498	76142	10	7,070	0,061	0,132
	2	76786					
Paceña 240P	1	114776	119291	10	10,705	0,061	0,132
	2	123806					

Fuente: Elaboración Propia



El reporte de los resultados de los ítems analizados se muestra en la Tabla 5.14 y 5.15 para IAA y THIAA respectivamente.

**Tabla 5.14.** Resultados del parámetro Iso- $\alpha$ -ácido

Código	Parámetro	Método	Unidades	Resultado
Paceña 162S	Iso- $\alpha$ -ácido	Método C.B.N.	mg / L	1,127 $\pm$ 0,438
Paceña 245Q	Iso- $\alpha$ -ácido	Método C.B.N.	mg / L	1,814 $\pm$ 0,436
Paceña 240P	Iso- $\alpha$ -ácido	Método C.B.N.	mg / L	8,630 $\pm$ 0,423

**Fuente:** Elaboración Propia

**Tabla 5.15.** Resultados del parámetro Tetrahydro-iso- $\alpha$ -ácido

Código	Parámetro	Método	Unidades	Resultado
Paceña 162S	Tetrahydro-iso- $\alpha$ -ácido	Método C.B.N.	mg / L	8,449 $\pm$ 0,132
Paceña 245Q	Tetrahydro-iso- $\alpha$ -ácido	Método C.B.N.	mg / L	7,070 $\pm$ 0,132
Paceña 240P	Tetrahydro-iso- $\alpha$ -ácido	Método C.B.N.	mg / L	10,705 $\pm$ 0,132

**Fuente:** Elaboración Propia

Los intervalos de las concentraciones de las muestras de cerveza fueron calculados con un nivel de confianza del 95%. En los anexos E y F se encuentran los cromatogramas y el cálculo del intervalo de confianza para ambos analitos.

#### 5.4. Estructura de costos

El estudio de costos se estableció con un límite de 24 inyecciones y en base a este valor se calculó el precio unitario, para cantidades superiores esta estructura no es válida porque hay una modificación considerable en los costos involucrados en la preparación del eluyente "A". En el Anexo G se muestra las cotizaciones que se utilizaron para este propósito.

##### 5.4.1. Servicio de energía eléctrica y agua potable

El costo del servicio de energía eléctrica corresponde a la tarifa Industrial de mediana demanda y baja tensión, mientras que para el servicio de agua potable la tarifa pertenece a la categoría industrial. La Tabla 5.16 muestra la tarifa de dichos servicios.

**Tabla 5.16.** Tarifa de los servicios de energía eléctrica y agua potable

Servicios	Tarifa (Bs)	Unidad
Energía Eléctrica	0,80	Bs/kWh
Agua Potable	12,20	Bs/m <sup>3</sup>

**Fuente:** Elaboración Propia

#### 5.4.2. Precio de los reactivos

En la Tabla 5.17 reúne la información sobre los precios de todos los reactivos que se emplean en el método analítico y su precio unitario, los costos fueron proporcionados por diversas empresas importadoras de reactivos de la ciudad de La Paz.

**Tabla 5.17.** Precios unitarios de los reactivos utilizados en el método

Reactivos	Presentación	Unidad	Precio (Bs)	Precio Unitario
Metanol grado HPLC	4000	mL	665	0,17
Acetonitrilo grado HPLC	4000	mL	2775	0,69
Eluyente "A"	1000	mL	151,01	0,15
Octanol	1000	mL	2986,20	2,99
Hidróxido de Potasio	1000	g	390	0,39
Ácido Orto Fosfórico 85 %	1000	mL	1290	1,29
Ácido Cítrico monohidratado	1000	g	1484	1,48
Estándar IAA	250	mg	2610	10,44
Estándar THIAA	250	mg	2610	10,44
Solvente anti buffer	1000	mL	124,20	0,12

**Fuente:** Elaboración Propia

La estimación de los precios unitarios del eluyente "A" y el solvente anti buffer fueron calculados en función de reactivos que se emplea para su preparación, cabe aclarar que éstos son preparados en el laboratorio a partir de Ácido Cítrico monohidratado, Hidróxido de Potasio y Acetonitrilo grado HPLC.

#### 5.4.3. Precio de los materiales

Los materiales requeridos para la preparación de las soluciones de estándar de trabajo y muestras de cerveza fueron jeringas, filtros de nitrato de celulosa con un tamaño de poro de 0,20  $\mu\text{m}$  y guantes de nitrilo.

**Tabla 5.18.** Precios unitarios de los materiales utilizados en el método

Materiales	Presentación (unidades)	Precio (Bs)	Precio Unitario
Jeringas de 5 mL	100	240	2,40
Filtros de membrana	100	1342	13,42
Guantes de Nitrilo	100	182	1,82

**Fuente:** Elaboración Propia

El precio de estos materiales se expone en la Tabla 5.18 en el que se indica la presentación y su precio unitario.

#### 5.4.4. Precio de los consumibles del cromatógrafo líquido

El costo de los consumibles del cromatógrafo líquido Shimadzu Prominence™, fue proporcionado por la empresa SPEKTRA LTDA, representante de la marca a nivel nacional, esta información fue agrupada en la Tabla 5.19.

**Tabla 5.19.** Precios de los consumibles utilizados en el método

Consumibles Cromatógrafo líquido	Precio (Bs)	Vida útil (# de Inyecciones)	Precio (Bs/Inyección)
Lámpara de deuterio para detector UV-VIS	8573	2000	4,30
Kit de Bomba LC-20AD	17360,36	564	30,80
Kit de Autosampler SIL-20A	10772,38	40000	0,30
Columna C18	9930	150	66,20
Precolumna C18	2100	150	14

Fuente: Elaboración Propia

#### 5.4.5. Depreciación

El costo del cromatógrafo fue facilitado por la empresa SPEKTRA LTDA, este dato corresponde a un valor estimado, ya que la serie del equipo (Prominence) se encuentra discontinuada, sin embargo todos sus accesorios y consumibles tienen un plazo de fabricación hasta 25 años, se tomó como referencia este periodo de tiempo como la vida útil del equipo. En la Tabla 5.20 se expone la información descrita.

**Tabla 5.20.** Depreciación del Cromatógrafo

Equipo	Precio inicial (Bs)	Vida útil (Años)	Precio (Bs/Día)
Cromatógrafo Líquido	765600	25	127,60

Fuente: Elaboración Propia

El cálculo de la depreciación se realizó mediante el método de la línea recta sin valor de salvamento, para conveniencia del estudio de costos, se expresó como Bs/Día, con la suposición de que 1 mes tiene 20 días laborales y que el equipo se utiliza por 5 días.

#### 5.4.6. Potencia eléctrica de los equipos de laboratorio

La Tabla 5.21 presenta información de la potencia eléctrica de los equipos utilizados, estos datos han sido obtenidos a partir de los correspondientes manuales de instrucciones de cada equipo.

**Tabla 5.21.** Potencia eléctrica de los equipos de laboratorio

Equipos	Potencia Eléctrica (kW)
Cromatógrafo líquido	1,08
Pc	0,20
Monitor	0,018
Estabilizador	5,00
UPS	0,84
Iluminación Laboratorio	0,54
Destilador	2,60
Equipo Evoqua	0,345
Baño de Ultrasonidos	0,10
Bomba de vacío	0,19

Fuente: Elaboración Propia

#### 5.4.7. Costos fijos y variables mensuales

En base a la información recolectada se elaboró la siguiente tabla con los costos fijos y variables para un periodo de tiempo mensual. El Anexo H muestra con más detalle el cálculo de los costos fijos y variables.

**Tabla 5.22.** Costos fijos y variables mensuales para 24 inyecciones

Costos fijos mensuales		Costos variables mensuales	
Actividad	Costo (Bs)	Actividad	Costo (Bs)
Mano de Obra	800,00	Preparación eluyente A	182,80
Fondo de acreditación	500,00	Preparación de la muestra	72,90
Mantenimiento del cromatógrafo previo al análisis	435,00	Análisis de la muestra en el cromatógrafo	3274,60
Mantenimiento del cromatógrafo posterior al análisis	663,60	Re-Calibración del método	132,00
Uso de equipos de protección personal en el laboratorio (Guantes de Nitrilo)	3,60	<b>Total</b>	<b>3662,30</b>
Consumo de agua potable	0,60		
Depreciación	638		
<b>Total</b>	<b>3040,80</b>		

Fuente: Elaboración Propia

#### 5.4.8. Precio unitario

El precio unitario es aplicable hasta 24 inyecciones, los costos implicados para su cálculo están detallados en la Tabla 5.23.

**Tabla 5.23.** Precio unitario para el análisis de una muestra por duplicado

Nº	Detalle	Monto (Bs)
1	Total costos fijos	3040,80
2	Total costos variables	3662,30
3	<i>Subtotal mensual</i>	<i>6703,10</i>
4	Fondo de mantenimiento y reposición (5%)	626,50
5	Gastos generales y administrativos (10%)	1252,90
6	Utilidad (5,5%)	689,10
7	Impuestos (26%)	3257,60
8	<i>Subtotal facturación y otros</i>	<i>5826,10</i>
9	<b>Costo total facturado</b>	<b>12529,20</b>
10	<b>PRECIO UNITARIO (Bs / INYECCIÓN)</b>	<b>522,10</b>

Fuente: Elaboración Propia

El costo subtotal mensual es la suma de los costos fijos y variables que se encuentran en la fila 1 y 2 respectivamente, mientras que el subtotal facturado y otros es la suma de las filas 4 a 7 considerando los porcentajes asignados por el IIDEPROQ, el Costo total facturado se obtiene de la suma de la fila 3 a la 7, finalmente este valor se divide entre el número de inyecciones, hallado a partir de la Ecuación 3.19, para 24 inyecciones se tiene 12 muestras con 2 réplicas.

# CAPÍTULO VI

## 6. EVALUACIÓN

### 6.1. Estudio de validación del método

#### 6.1.1. Linealidad

Las rectas de calibración para IAA y THIAA presentados en las figuras 5.1 y 5.2 muestran a simple vista el comportamiento lineal para ambos analitos respecto a la respuesta proporcionada por el equipo en el rango de trabajo establecido, sin embargo para corroborar tal afirmación es necesario considerar el coeficiente de determinación ya que éste define la calidad del ajuste.

De acuerdo a la Tabla 5.2, los coeficientes de determinación calculados para IAA y THIAA son 0,9972 y 0,9998 respectivamente, a partir de ello se afirma que la relación entre el área y concentración para los iso- $\alpha$ -ácidos está ajustada a un 99,72%, mientras que para los tetrahydro-iso- $\alpha$ -ácidos el ajuste es del 99,98%.

Los resultados del análisis estadístico presentado en las Tablas 5.3 a 5.5 son comparados con los criterios de aceptación como se expone en la Tabla 6.1.

**Tabla 6.1.** Evaluación estadística de los resultados de la linealidad

Prueba	IAA		THIAA		Criterio de aceptación
	t Calculado	t Tabla	t Calculado	t Tabla	
Prueba t de student para verificar la regresión lineal	68,043	2,16	254,925	2,16	t Calculado > t Tabla
Prueba t de student de la pendiente	67,45	2,16	242,639	2,16	t Calculado > t Tabla
Prueba t de student del intercepto	1,759	2,16	1,603	2,16	t Calculado < t Tabla

**Fuente:** Elaboración Propia

De acuerdo a la Tabla 6.1, se infiere lo siguiente para ambos analitos:

- Existe una correlación proporcional entre la concentración y la respuesta del equipo.
- La pendiente es distinta de cero y con ello se asegura que hay una relación lineal entre la concentración y el área.
- El valor del intercepto es estadísticamente igual a cero.

Los valores de la Tabla 5.6 indican que para IAA y THIAA los intervalos de confianza para la pendiente están comprendidos entre valores positivos, en cambio para la ordenada en el origen se tienen valores negativos incluyendo al cero.

### 6.1.2. Precisión

La evaluación estadística de la normalidad de las áreas a través de la prueba de normalidad de Anderson – Darling permite evaluar el comportamiento de las mismas para poder emplear determinadas medidas de tendencia central, la Tabla 6.2 señala los valores obtenidos.

**Tabla 6.2.** Evaluación de la normalidad para la precisión

Número de Réplica	Valor p (IAA)	Valor p (THIAA)	Criterio de aceptación
Réplica 1	0,629	0,629	Valor p $\geq$ 0.05
Réplica 2	0,629	0,630	
Réplica 3	0,630	0,630	

**Fuente:** Elaboración Propia

Los valores de “p” de las réplicas para IAA y THIAA cumplen con el criterio de aceptación, de forma que, los valores de las áreas poseen una distribución normal en los tres niveles de concentración y es posible utilizar la media aritmética como medida de tendencia central.

En la Tabla 6.3 se presentan los coeficientes de variación calculados para los tres niveles de concentración analizados (concentración baja, media y alta) de ambos analitos los cuales fueron contrastados con el coeficiente de variación de Horwitz.

**Tabla 6.3.** Comparación de los resultados del coeficiente de variación

Concentración (mg / L)	RSD Calculado (%) IAA	RSD Calculado (%) THIAA	0,67 x RSD Horwitz (%)	Criterio de aceptación
3	0,333	1,291	9,086	RSD Calculado (%) < 0,67x RSD Horwitz (%)
9	0,488	0,488	7,701	
15	0,326	0,357	7,131	

**Fuente:** Elaboración Propia

Los resultados obtenidos cumplen con el criterio de aceptación para ambos analitos, mostrando poca variabilidad en los tres niveles de concentración estudiados, de esta manera el método analítico es repetible, y por lo tanto preciso para IAA y THIAA.

La comparación de los valores del estadístico “G” de la prueba de Cochran con los valores de tabla nos indica si existe influencia significativa de la concentración en la variabilidad de los resultados.

**Tabla 6.4.** Evaluación estadística de la homogeneidad de varianzas

	G Calculado	G Tabla	Criterio de aceptación
IAA	0,519	0,8709	G Calculado < G Tabla
THIAA	0,461	0,8709	

Fuente: Elaboración Propia

Según a los valores mostrados en la Tabla 6.4 se afirma que ambos analitos cumplen el criterio de aceptación, de modo que las concentraciones no representan una influencia significativa para la variabilidad de los resultados.

### 6.1.3. Límite de detección (LOD) y Límite de cuantificación (LOQ)

A partir de los resultados de la Tabla 5.2, se observa que el valor de la pendiente de la recta de calibración de los Tetrahydro-iso- $\alpha$ -ácidos es relativamente mayor, esto lleva a la suposición de que el método analítico es más sensible para la determinación de este analito.

Dicha conjetura se confirma con los resultados mostrados en la Tabla 5.10, donde se observa que límite de detección para THIAA es menor en comparación al valor de IAA.

### 6.2. Cuantificación de IAA y THIAA en muestras de cerveza

La evaluación de la concentración de IAA se realiza en base a los resultados de la Tabla 5.12, estos datos permiten el cálculo de los intervalos de confianza y el error relativo porcentual de cada muestra analizada

**Tabla 6.5.** Evaluación de la concentración de IAA en ítems analizados

Código	C <sub>IAA</sub> Promedio (mg / L)	Intervalo de confianza	Límite Inferior	Límite Superior	Error relativo porcentual calculado (%)
Paceña 162S	1,127	± 0,438	0,689	1,565	> 5%
Paceña 245Q	1,814	± 0,436	1,378	2,250	> 5%
Paceña 240P	8,630	± 0,423	8,207	9,053	4,902%

Fuente: Elaboración Propia

La comparación de las concentraciones de las muestras analizadas con el valor de 1,475 mg / L, que corresponde al límite de cuantificación para IAA, refleja que sólo el ítem Paceña 240P tiene una concentración superior al LOQ.

El resultado del ítem Paceña 162S se rechaza porque su concentración promedio es inferior al LOQ, al encontrarse esta concentración entre los valores del límite de



detección y cuantificación no se tiene certeza de su confiabilidad y es por eso que su error porcentual es superior al 5%.

La concentración del ítem Paceña 245Q también es rechazada, a pesar de que su concentración promedio es superior al límite de cuantificación, no es aceptable que su límite inferior quede debajo del valor del LOQ. Este ítem también presenta un error relativo porcentual alto, evidencia clara que una porción de su intervalo es inferior al límite de cuantificación.

Para aceptar un resultado y reportar valores confiables, es necesario que la concentración y sus intervalos sean mayores la límite de cuantificación. Sólo el ítem Paceña 240P cumple con los dos criterios establecidos.

En el Anexo I se encuentran valores aproximados de IAA para los diversos estilos de cervezas.

De igual manera, para el caso de la concentración de THIAA, la información de la Tabla 5.13 permite calcular los intervalos de confianza y el error relativo porcentual como se muestra en la Tabla 6.6.

**Tabla 6.6.** Evaluación de la concentración de THIAA en ítems analizados

Código	C <sub>THIAA</sub> Promedio (mg / L)	Intervalo de confianza	Límite Inferior	Límite Superior	Error relativo porcentual calculado (%)
Paceña 162S	8,449	± 0,132	8,317	8,581	1,562
Paceña 245Q	7,070	± 0,132	6,938	7,202	1,867
Paceña 240P	10,705	± 0,132	10,573	10,837	1,233

**Fuente:** Elaboración Propia

Las concentraciones de THIAA en las muestras de cerveza analizadas tienen un valor mayor al del límite de cuantificación (0,410 mg / L) del método y el error relativo porcentual calculado para los tres ítems muestra valores inferiores al establecido como criterio de aceptación. Los valores superiores al límite de cuantificación y errores relativos inferiores al 5% que presentan estas concentraciones implican la aceptación de esos resultados.

### 6.3. Estructura de costos

A partir de la información obtenida de la Tabla 5.17 a 5.19 se analiza aquellos consumibles, reactivos y materiales que tienen un efecto potencial en la determinación del precio unitario.

La Tabla 6.7 muestra dichos artículos ordenados de manera decreciente respecto a sus precios.

**Tabla 6.7.** Artículos que influyen considerablemente en el precio unitario

Descripción	Precio (Bs)
Kit de Bomba LC-20AD	17360,36
Kit de Autosampler SIL-20A	10772,38
Columna C18	9930
Lámpara de deuterio para detector UV-VIS	8573
Octanol (1000 mL)	2986,20
Acetonitrilo grado HPLC (4000 mL)	2775
Estándar IAA (250 mg)	2610
Estándar THIAA (250 mg)	2610
Precolumna C18	2100
Ácido Cítrico monohidratado (1000 g)	1484
Filtros de membrana (100 Unidades)	1342

**Fuente:** Elaboración Propia

La interpretación de la Tabla 6.7 revela que los costos de los consumibles del cromatógrafo son apreciables, sin embargo para reducir el precio unitario se evalúa la influencia del fondo de acreditación en la estructura de costos propuesta, como indica la siguiente tabla.

**Tabla 6.8.** Comparación del precio unitario con y sin fondo de acreditación

Fondo de acreditación	Precio unitario (Bs / Inyección)
Si	522,10
No	483,10
Diferencia (Bs)	39,00

**Fuente:** Elaboración Propia

Según los resultados de la Tabla 6.8 esta diferencia es insignificante, no obstante, tener un laboratorio acreditado garantiza la seriedad de un informe de resultados, se reducen los errores producidos en el mismo y de esa manera mejora la calidad de los servicios.

# CAPÍTULO VII

## 7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 7.1. Conclusiones

El método de Cromatografía Líquida de Alta Resolución de fase reversa con elución en gradiente es idóneo para la identificación y determinación de iso- $\alpha$ -ácidos y tetrahidro-iso- $\alpha$ -ácidos en muestras de cerveza. Por consiguiente, puede ser incorporado a los análisis de rutina que se desarrolla en el área de Calidad de la Cervecería Boliviana Nacional S.A.

El método analítico desarrollado es lineal para ambos analitos en el rango de trabajo establecido que comprende los valores de 3 a 15 mg / L, el planteamiento y evaluación de hipótesis estadísticas para el análisis de la regresión lineal, la pendiente y ordenada en el origen confirman el comportamiento lineal de la respuesta del equipo respecto a la concentración para ambos analitos, además con el ajuste de mínimos cuadrados se encuentra que los coeficientes de determinación son próximos a la unidad,  $R^2=0,9972$  para IAA y  $R^2=0,9998$  para THIAA.

El estudio de repetibilidad realizado a tres niveles de concentración 3,9 y 15 mg / L de los dos analitos, revela que las respuestas obtenidas a dichas concentraciones siguen una distribución normal y su variabilidad es medida a través del coeficiente de variación obteniéndose valores inferiores al 2 %, consecuentemente, la precisión del método analítico queda demostrada al evidenciar la homogeneidad de las áreas para cada nivel de concentración, además con la prueba de Cochran se establece que la variabilidad de los resultados no es influenciada por la concentración.

La capacidad del método para detectar y cuantificar iso- $\alpha$ -ácidos y tetrahidro-iso- $\alpha$ -ácidos en la matriz de cerveza se establece con el cálculo del límite de detección y cuantificación, estos límites tienen valores pequeños para ambos analitos, sin embargo el método es relativamente más sensible para la determinación de THIAA con valores de LOD= 0,135 mg / L y LOQ= 0,410 mg / L.

Los parámetros de validación evaluados: linealidad, precisión, límite de detección y límite de cuantificación, cumplen satisfactoriamente los criterios de aceptación, por esta razón, el método es válido para los fines propuestos.

La cuantificación de IAA y THIAA en muestras de cerveza es posible mediante la asignación de un código en base a la información de la muestra y fijando dos réplicas por cada ítem. Los valores de concentración obtenidos se encuentran dentro del rango de trabajo definido en la validación del método, cumpliendo los criterios de aceptación al presentar concentraciones superiores al límite de cuantificación LOQ= 1,475 mg / L para iso- $\alpha$ -ácidos y LOQ= 0,410 mg / L para tetrahidro-iso- $\alpha$ -ácidos y errores porcentuales relativos inferiores al 5 %.

La estimación de la estructura de costos es realizada por la clasificación de los mismos en fijos y variables, este estudio tiene un alcance de 24 inyecciones, que están en función de la cantidad de muestras y sus correspondientes réplicas. Se establece que el precio unitario es de 522,10 Bs/inyección, sin embargo éste reduce si no se considera el fondo de acreditación a un valor de 483,10 Bs/inyección.

## **7.2. Recomendaciones**

Se sugiere tomar en cuenta los valores de los intervalos de confianza de la pendiente y ordenada en el origen porque podrían servir como criterios de aceptación o rechazo para posteriores calibraciones.

Es indispensable anexar una pre columna C18 de tamaño de partícula 5  $\mu\text{m}$  a la columna cromatográfica para alargar su vida útil y protegerla de los contaminantes provenientes de solventes, soluciones buffer y matrices complejas.

Se recomienda evaluar el efecto de la instalación de una pre columna en los tiempos de retención de los analitos estudiados, si la caída de presión originada es considerable, la identificación de iso- $\alpha$ -ácidos y tetrahidro-iso- $\alpha$ -ácidos se verá afectada, en ese caso será necesario realizar una nueva validación del método.

Adquirir una unión PEEK para facilitar los ciclos de limpieza de los componentes internos del equipo y columna.

Implementar gráficos de control para el aseguramiento de calidad de los resultados que ofrece el método analítico validado.

Participar en ensayos de aptitud para evaluar la calidad de los resultados y monitorear el desempeño del laboratorio.

Identificar riesgos potenciales que puedan afectar a las actividades de laboratorio y a partir de ello, elaborar un plan de acción para prevenirlos o reducirlos.

El metanol grado HPLC y el Hidróxido de Potasio son sustancias controladas, reguladas por la Dirección General de Sustancias Controladas (D.G.S.C), se debe tomar todas las medidas necesarias en la renovación del certificado de registro para evitar el perjuicio en la compra de los mismos, y por consiguiente, el retraso en las actividades de laboratorio.

Reducir, en la medida de lo posible, los costos relacionados a materiales, reactivos e insumos estableciendo criterios para la evaluación y selección de proveedores que puedan ofrecer los mismos a menor costo y buena calidad.

Es recomendable utilizar una columna de menor longitud para acortar el tiempo de análisis de cada muestra, consecuentemente, el consumo de solventes queda

reducido, se prolonga la vida útil del equipo y sus consumibles. De esta manera se reduce el precio unitario determinado con la estructura de costos realizada.



## 8. BIBLIOGRAFÍA

- A.E.F.I. (2001). Validación de Métodos Analíticos. Barcelona: Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria.
- Bamforth, C. W. (2016). Brewing materials and processes. London: Academic Press.
- Boulton, C. (2013). Encyclopedia of Brewing. Chichester: Wiley.
- Bradford, B. (3 de Noviembre de 2015). Enantiomers of Linalool. Obtenido de The Whiskyphiles : <https://thewhiskyphiles.com/2015/11/03/the-chemistry-of-flowers-and-whisky/>
- Caballero, I., Blanco, C., & Porras, M. (2012). Iso- $\alpha$ -acids, bitterness and loss of beer quality during storage. Trends in Food Science & Technology, 26(1), pp. 21-30. doi:10.1016/j.tifs.2012.01.001
- Clark, J. G., Burroughs, L. J., & Guzinski, J. A. (1998). High-Performance Liquid Chromatography Analysis of Tetrahydro-Iso- $\alpha$ -Acids in Beer. Journal of the American Society of Brewing Chemists, 56(2), pp. 76-79. doi:10.1094/ASBCJ-56-0076
- Comunicaciones, L. (12 de Noviembre de 2020). Cervecería Boliviana Nacional S.A. Obtenido de Cbn.bo: <https://www.cbn.bo/>
- De Keukeleire, D. (1999). Fundamentals of beer and hop chemistry. Química Nova, 23(1), pp. 108-112. doi:10.1590/s0100-40422000000100019
- Dong, M. (2006). Modern HPLC for practicing scientists. New Jersey: Wiley-Interscience.
- Eßlinger, H. (2009). Handbook of brewing. Weinheim: Wiley-VCH.
- Everard, A., Geurts, L., Van Roye, M., Delzenne, N., & Cani, P. (2012). Tetrahydroiso-Alpha Acids from Hops Improve Glucose Homeostasis and Reduce Body Weight Gain and Metabolic Endotoxemia in High-Fat Diet-Fed Mice. Plos ONE, 7(3), pp. 1-8. doi:10.1371/journal.pone.0033858
- Fix, G. (1999). Principles of brewing science. Boulder: Brewers Publications.
- Gismera, M., Quintana, M., & Da Silva, M. (2009). Introducción a la Cromatografía Líquida de Alta Resolución. Madrid: Universidad Autónoma de Madrid.

- Jaskula-Goiris, B., Aerts, G., & De Cooman, L. (2010). Hop  $\alpha$ -acids isomerisation and utilisation: an experimental review. *Cerevisia*, 35(3), pp. 57-70. doi:10.1016/j.cervis.2010.09.004
- Khatib, A., Kyong Kim, H., Wilson, E., & Verpoorte, R. (2006). High Performance Liquid Chromatographic Method for Iso- $\alpha$ -Acids. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 29(2), pp. 293-302. doi:10.1080/10826070500416676
- Kondo, K. (2004). Beer and health: Preventive effects of beer components on lifestyle-related diseases. *Biofactors*, 22(1-4), pp. 303-310. doi:10.1002/biof.5520220160
- Kunze, W., & Manger, H. (2004). *Technology brewing and malting*. Berlin: VLB Berlin.
- Labor Veritas. (26 de Agosto de 2004). Products. Obtenido de Labor Veritas: [https://www.laborveritas.ch/files/en/produkte/ICS-T2/users\\_guide\\_ics\\_t2\\_rev\\_2.pdf](https://www.laborveritas.ch/files/en/produkte/ICS-T2/users_guide_ics_t2_rev_2.pdf)
- Labor Veritas. (2 de Febrero de 2009). Products. Obtenido de Labor Veritas: [https://www.laborveritas.ch/files/en/produkte/ICS-I3/users\\_guide\\_ics\\_i3\\_feb\\_09.pdf](https://www.laborveritas.ch/files/en/produkte/ICS-I3/users_guide_ics_i3_feb_09.pdf)
- Meyer, V. (2010). *Practical High Performance Liquid Chromatography*. Chichester: Wiley.
- Obara, K., Mizutani, M., Hitomi, Y., Yajima, H., & Kondo, K. (2009). Isohumulones, the bitter component of beer, improve hyperglycemia and decrease body fat in Japanese subjects with prediabetes. *Clinical Nutrition*, 28(3), pp. 278-284. doi:10.1016/j.clnu.2009.03.012
- Oficilia Mayor de Culturas, G. A. (12 de Noviembre de 2020). Aporte alemán en la historia de la ciudad de La Paz. Obtenido de Biblioteca Virtual de la Cooperación Alemana: <https://www.bivica.org/files/aporte-aleman-historia.pdf>
- Polo, L. (2015). *Fundamentos de cromatografía*. Madrid: Dextra.
- Quattrocchi, O., Abelaira de Andrizzi, S., & Laba, R. (1992). *Introducción a la HPLC*. Buenos Aires: Artes Gráficas Farro.
- Sánchez, C., Franco, L., Bravo, R., Rubio, C., Rodríguez, A., Barriga, C., & Cubero, J. (2010). Cerveza y salud, beneficios en el sueño. *Revista Española de Nutrición Comunitaria*, 16(3), pp. 160-163. doi:10.1016/s1135-3074(10)70034-x

- Shimadzu Corporation. (2020). HPLC Degassing Units. Obtenido de Shimadzu Corporation: <https://www.ssi.shimadzu.com/products/liquid-chromatography/dgu-20a3r-dgu-20a5r.html>
- Shimadzu Corporation. (2020). LC-20AD Pump. Obtenido de Shimadzu Corporation: <https://www.ssi.shimadzu.com/products/liquid-chromatography/lc-20ad.html>
- Shimadzu Corporation. (2020). SIL-20A/20AC Autosampler. Obtenido de Shimadzu Corporation: <https://www.ssi.shimadzu.com/products/liquid-chromatography/sil-20a-20ac.html>
- Shimadzu Corporation. (2020). SPD-20A/20AV UV-Vis Detector. Obtenido de Shimadzu Corporation: <https://www.ssi.shimadzu.com/products/liquid-chromatography/spd-20a-20av.html>
- Sigma-Aldrich. (2020). Ascentis® C18 HPLC Column. Obtenido de Sigma-Aldrich: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Supelco/Datasheet/1/hplc-care-and-use-t794165e.pdf>
- Snyder, L. R., Kirkland, J. J., & Dolan, J. W. (2009). Introduction to Modern Liquid Chromatography. New Jersey: Wiley.
- Stewart, G., Anstruther, A., & Russell, I. (2017). Handbook of Brewing. Boca Raton: CRC Press.
- Swartz, M. E., & Krull, I. S. (2012). Handbook of Analytical Validation. Boca Raton: CRC Press.
- Vanhoenacker, G., De Keukeleire, D., & Sandra, P. (2004). Analysis of iso- $\alpha$ -acids and reduced iso- $\alpha$ -acids in beer by direct injection and liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection or with mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1035, pp. 53-61. doi:10.1016/j.chroma.2004.02.038
- Verzele, M., & De Keukeleire, D. (1991). Chemistry and analysis of hop and beer bitter acids. Amsterdam: Elsevier.
- Weston, A., & Brown, P. (1997). HPLC and CE. San Diego: Academic Press.



# ANEXOS

## ANEXO A. Metodología para la conservación de los estándares

La conservación adecuada de los estándares DCHA-Iso, (ICS-I3) y Tetra (ICS-T3) se logra mediante la aplicación de acciones preventivas sobre los factores ambientales que contribuyen al deterioro de los mismos. En la siguiente tabla se explican las medidas establecidas.

Factor ambiental	Acción preventiva
Humedad	<ul style="list-style-type: none"><li>• Preservar los estándares en sus viales originales</li><li>• Introducir los viales en un envase hermético</li></ul>
Temperatura	<ul style="list-style-type: none"><li>• Mantener los estándares en un congelador ajustado a una temperatura entre -20 a -10 ° C.</li><li>• Evitar su transporte y manipulación a T &gt; 30 °C</li></ul>
Fuentes de luz (natural, artificial y radiación UV)	Cubrir estos viales con láminas de aluminio

Adicionalmente, los estándares no se deben almacenar junto con:

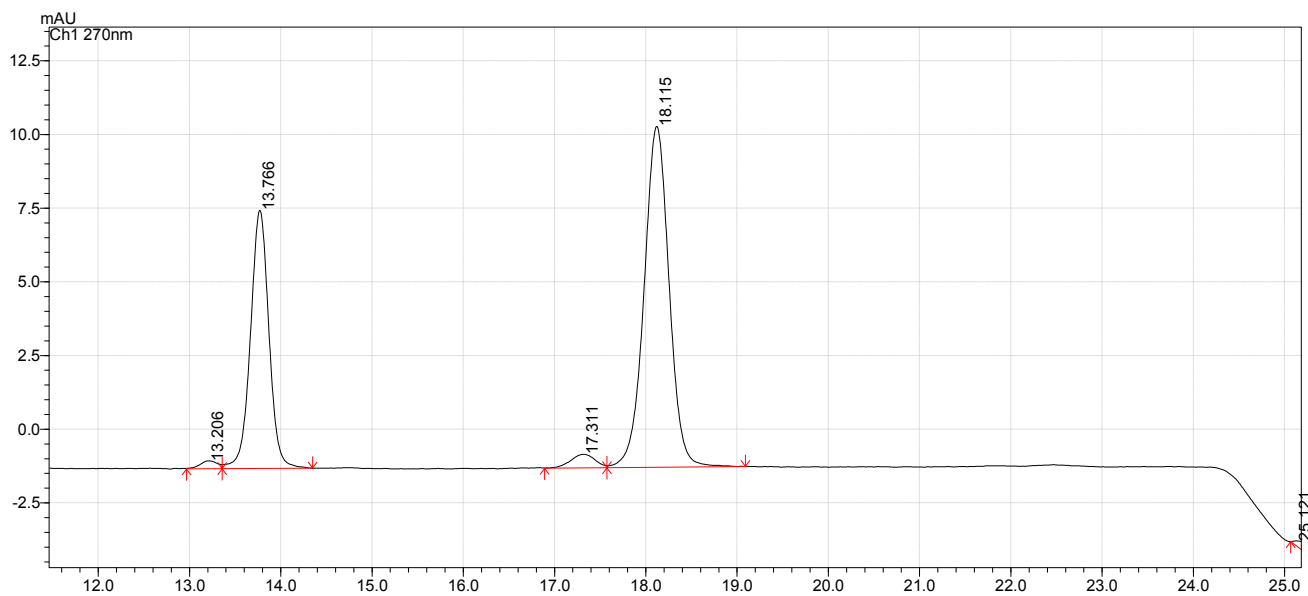
- Explosivos.
- Sólidos oxidantes.
- Líquidos oxidantes.
- Sustancias radioactivas.
- Sustancias Infecciosas.
- Alimentos y piensos.

Con estas consideraciones se garantiza que los estándares son estables por 2 años.

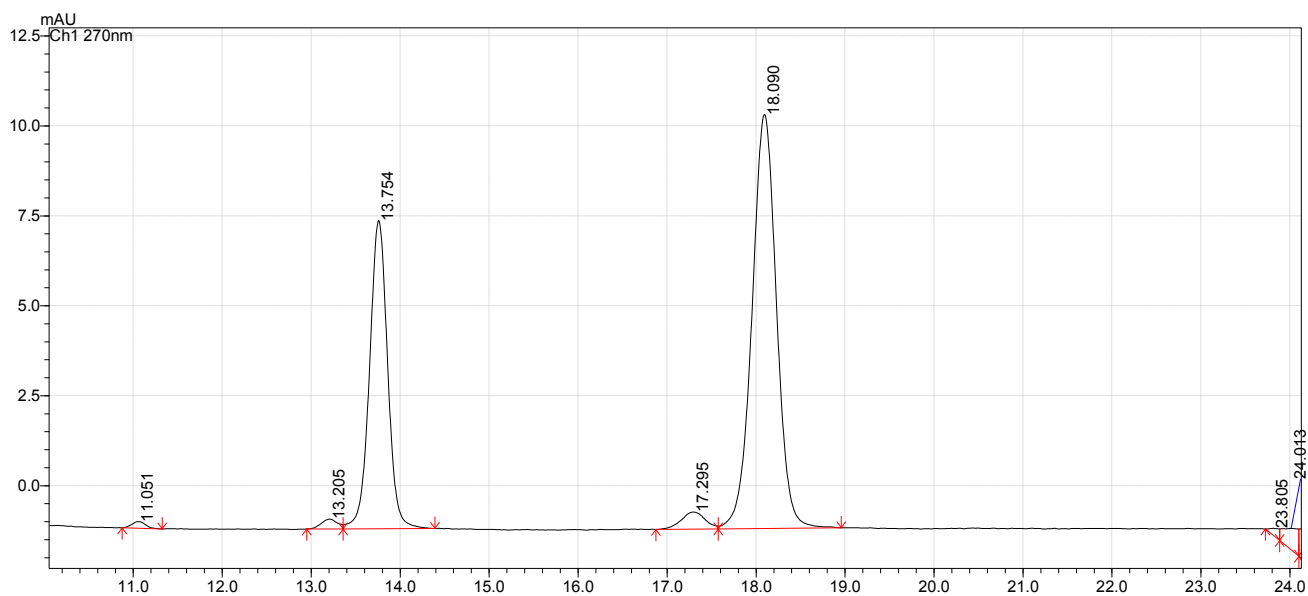
## ANEXO B. Cromatogramas del estándar de IAA

Concentración 3 ppm

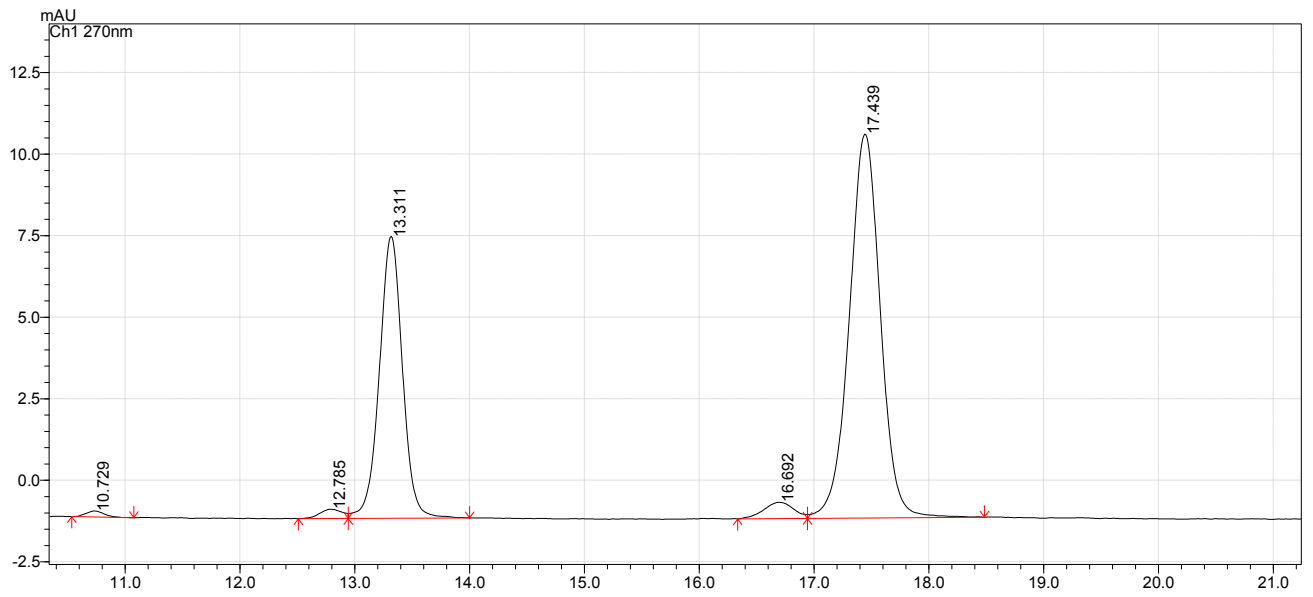
Prueba 1



Prueba 2



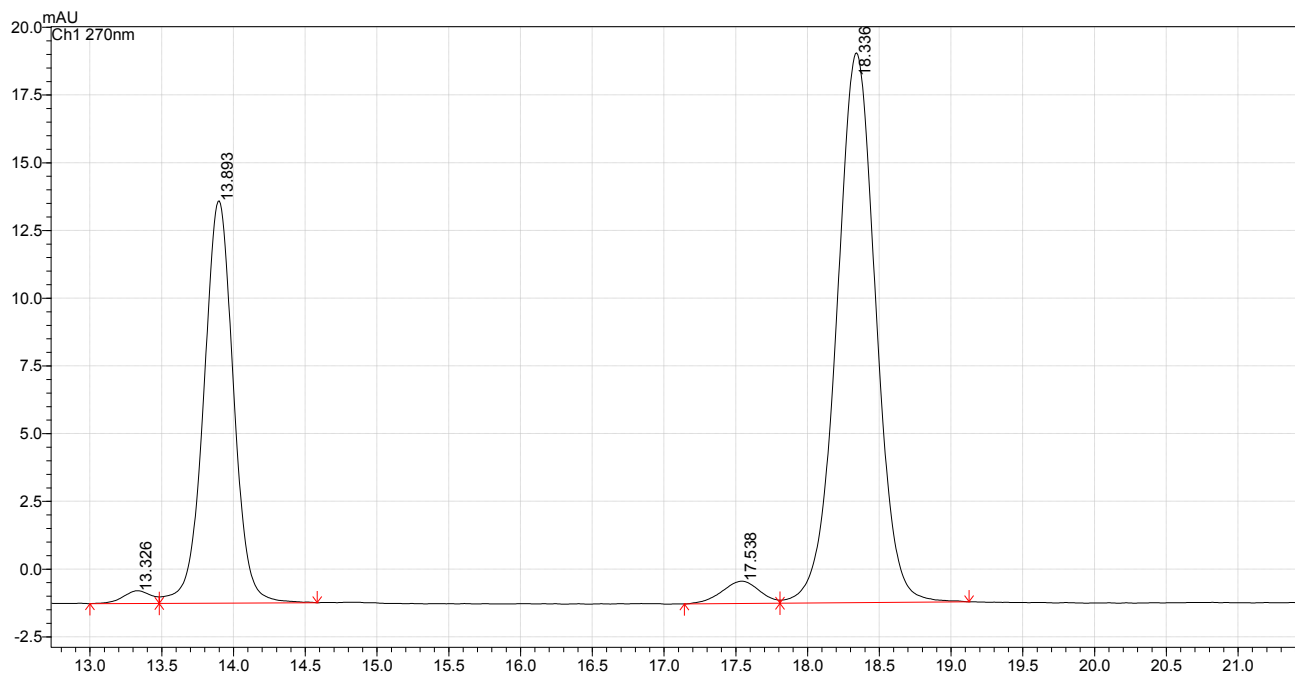
### Prueba 3



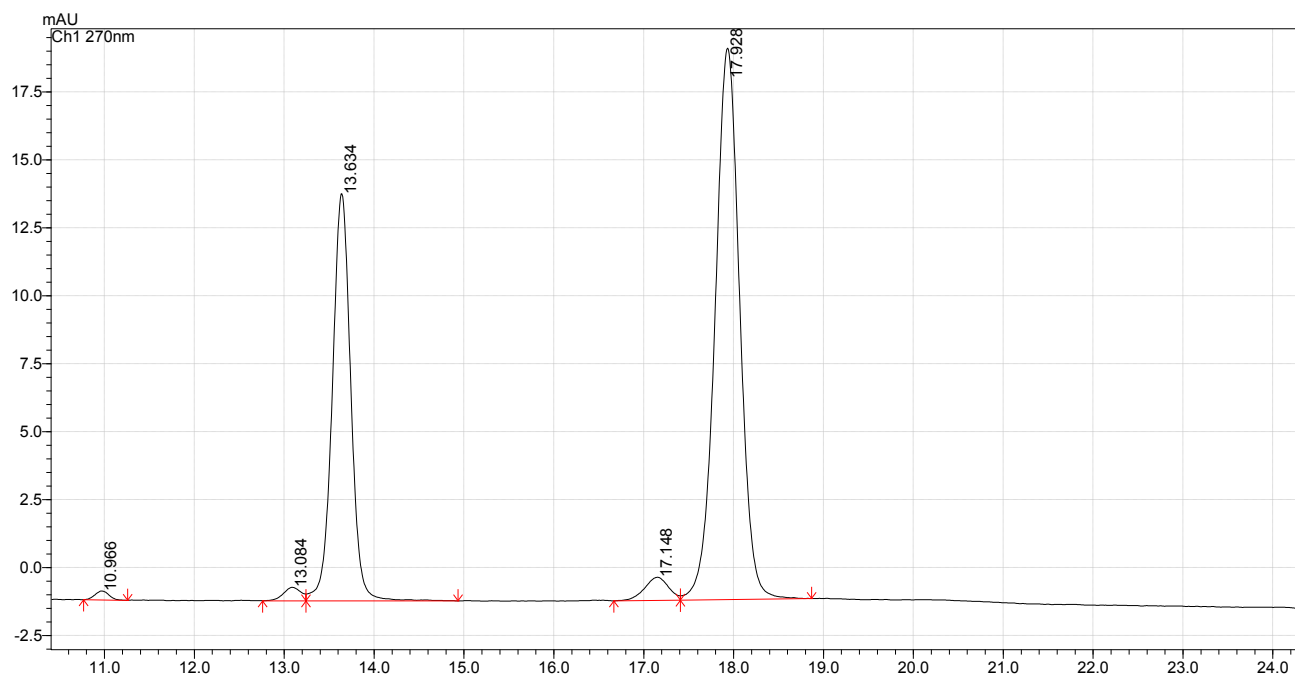
	Prueba 1			Prueba 2			Prueba 3		
Nombre	t <sub>R</sub> (min)	Área	R <sub>s</sub>	t <sub>R</sub> (min)	Área	R <sub>s</sub>	t <sub>R</sub> (min)	Área	R <sub>s</sub>
IAA 1	13,766	123398	1,446	13,754	121294	1,497	13,311	120977	1,284
IAA 2	18,115	220665	1,639	18,090	220541	1,619	17,439	221548	1,537

# Concentración 6 ppm

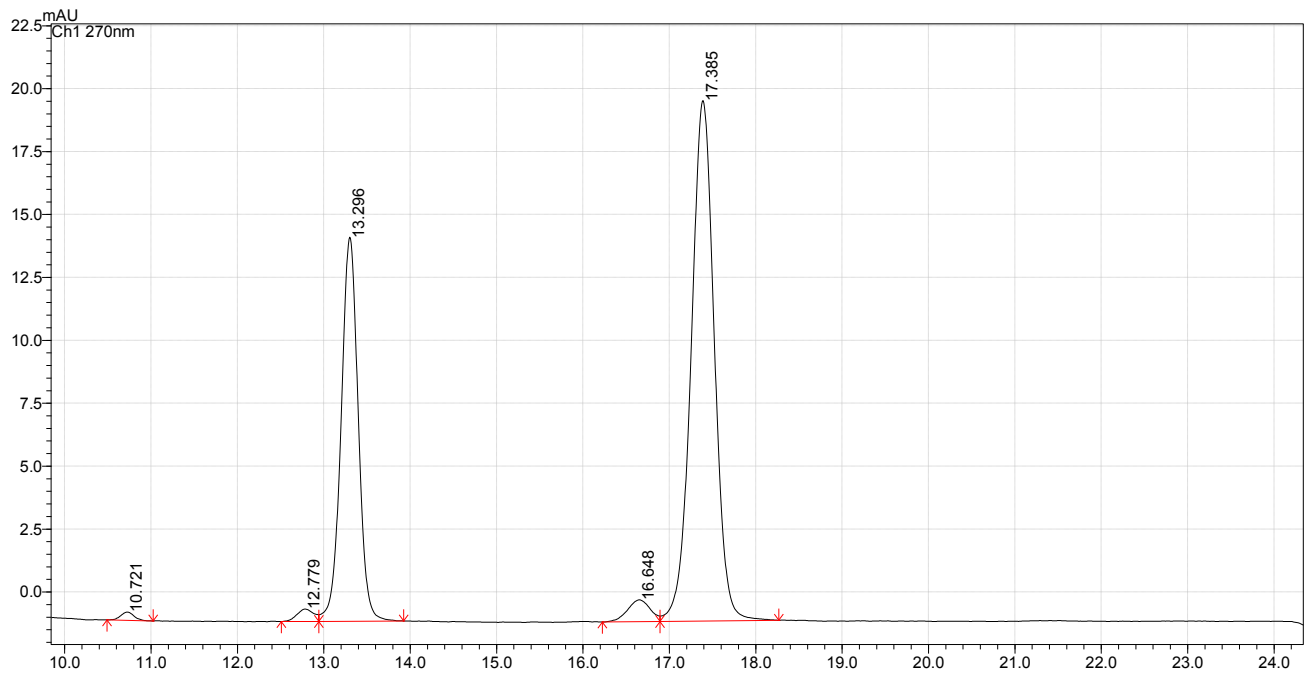
## Prueba 1



## Prueba 2



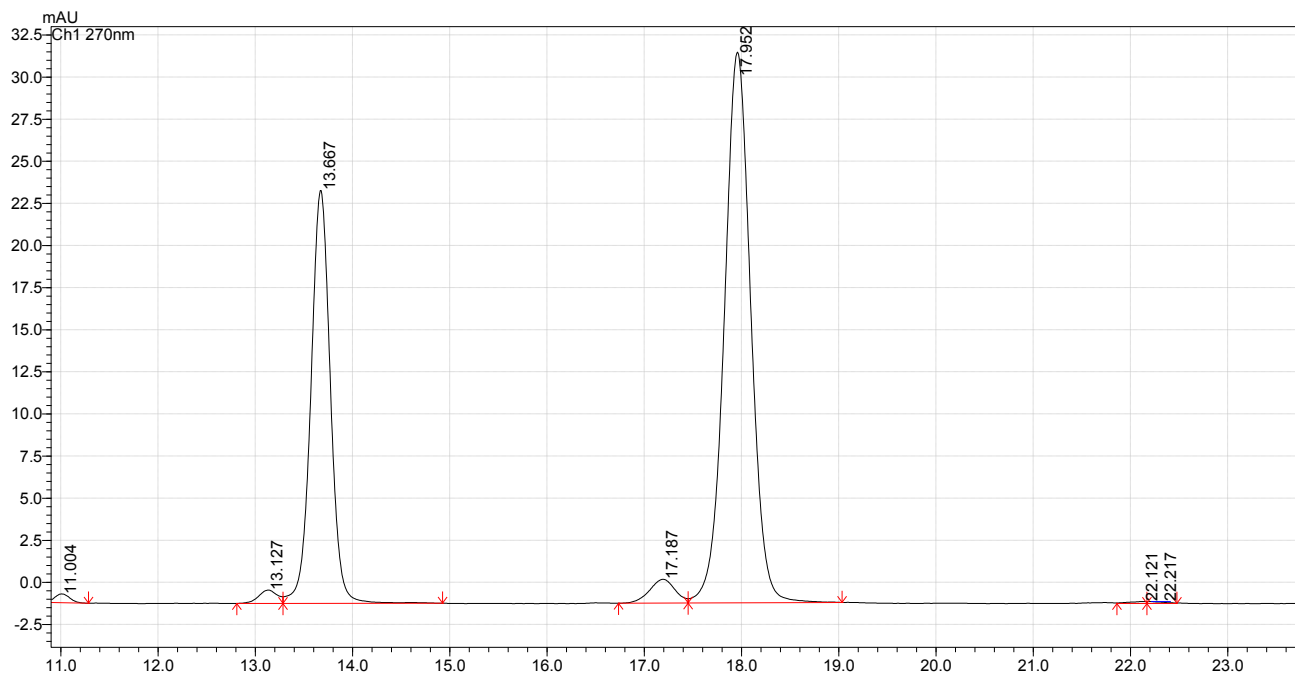
### Prueba 3



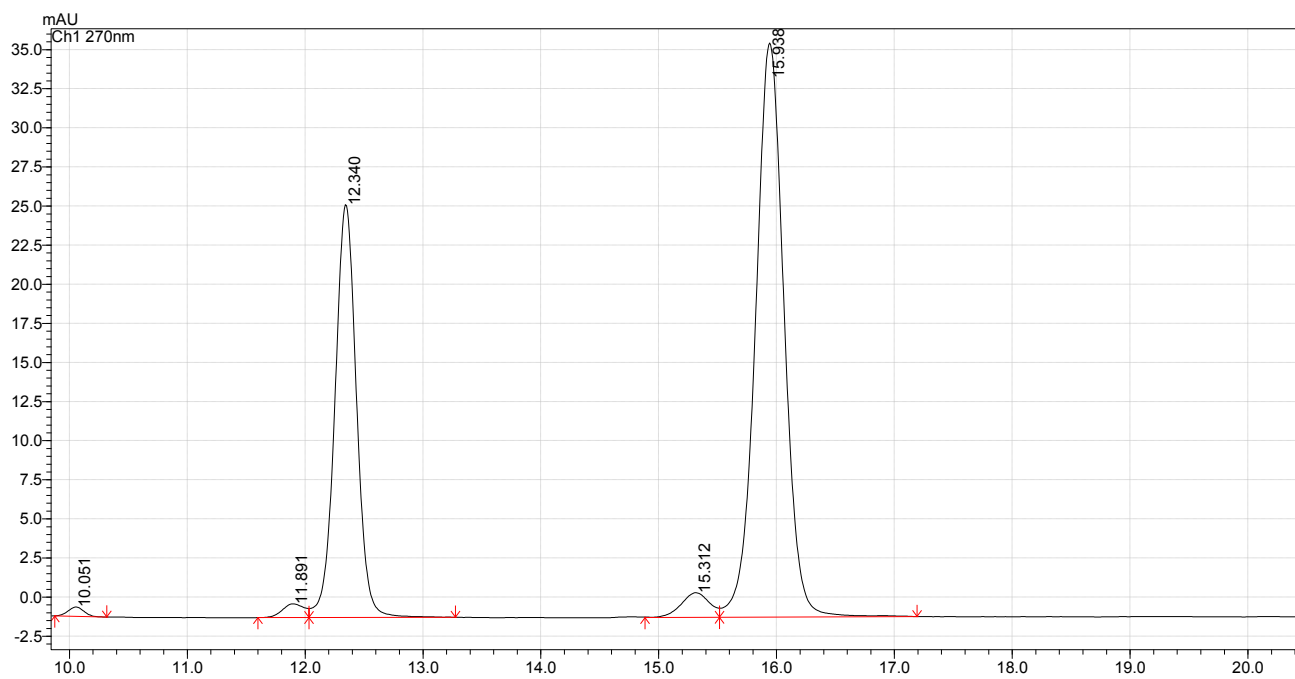
	Prueba 1			Prueba 2			Prueba 3		
Nombre	t <sub>R</sub> (min)	Área	R <sub>s</sub>	t <sub>R</sub> (min)	Área	R <sub>s</sub>	t <sub>R</sub> (min)	Área	R <sub>s</sub>
IAA 1	13,893	214137	1,426	13,634	213898	1,390	13,296	210437	1,326
IAA 2	18,336	383815	1,611	17,928	385758	1,568	17,385	385546	1,499

# Concentración 9 ppm

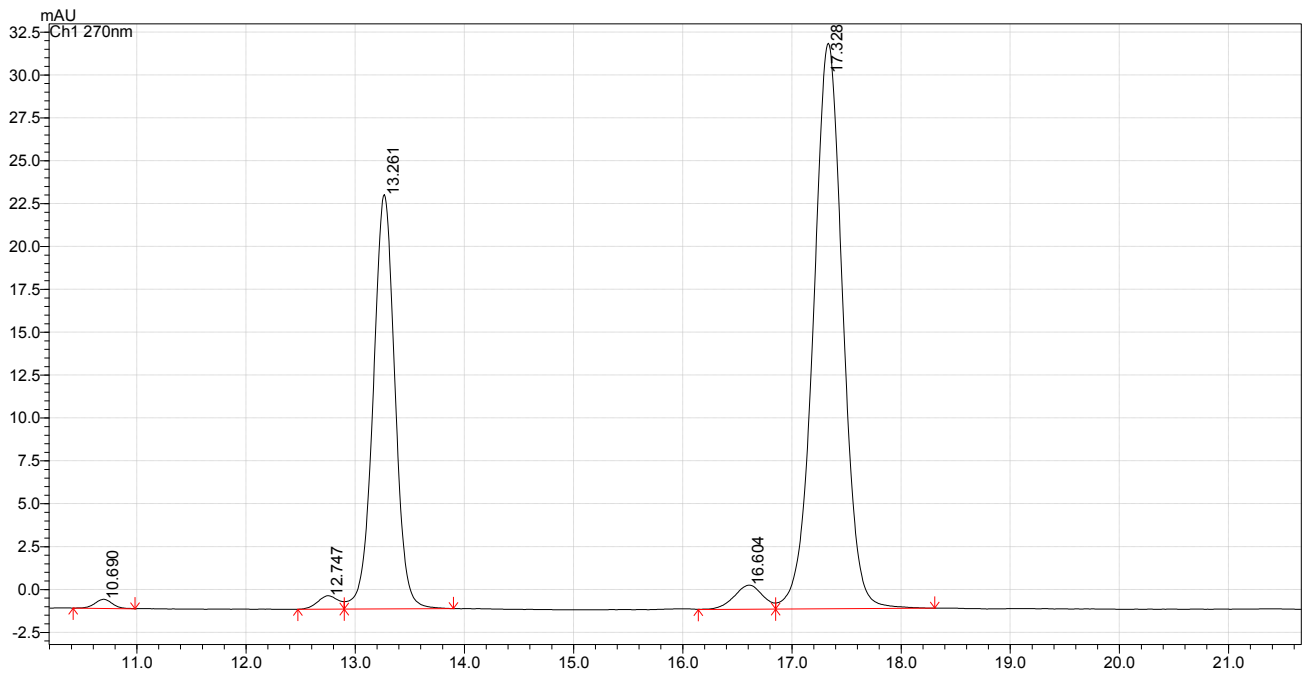
## Prueba 1



## Prueba 2



### Prueba 3

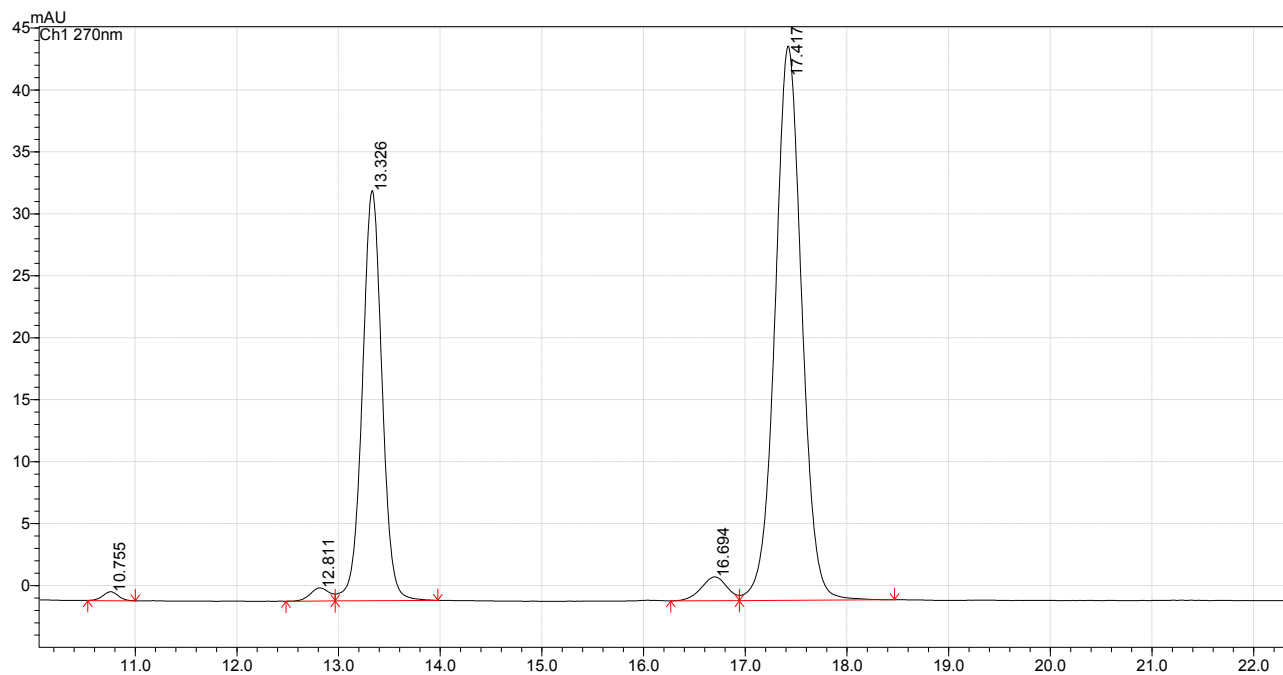


Nombre	Prueba 1			Prueba 2			Prueba 3		
	t <sub>R</sub> (min)	Área	R <sub>s</sub>	t <sub>R</sub> (min)	Área	R <sub>s</sub>	t <sub>R</sub> (min)	Área	R <sub>s</sub>
IAA 1	13,667	341695	1,420	12,340	335994	1,124	13,261	334459	1,304
IAA 2	17,952	616326	1,558	15,938	616756	1,385	17,328	614290	1,473

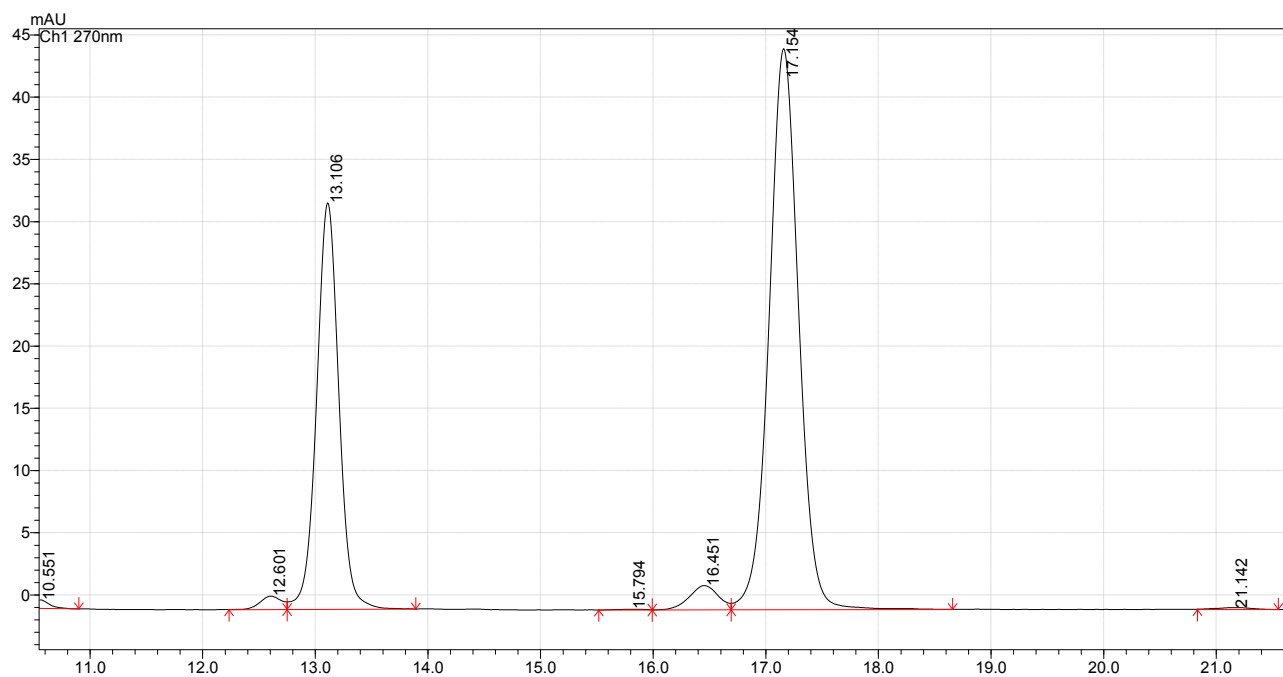


# Concentración 12 ppm

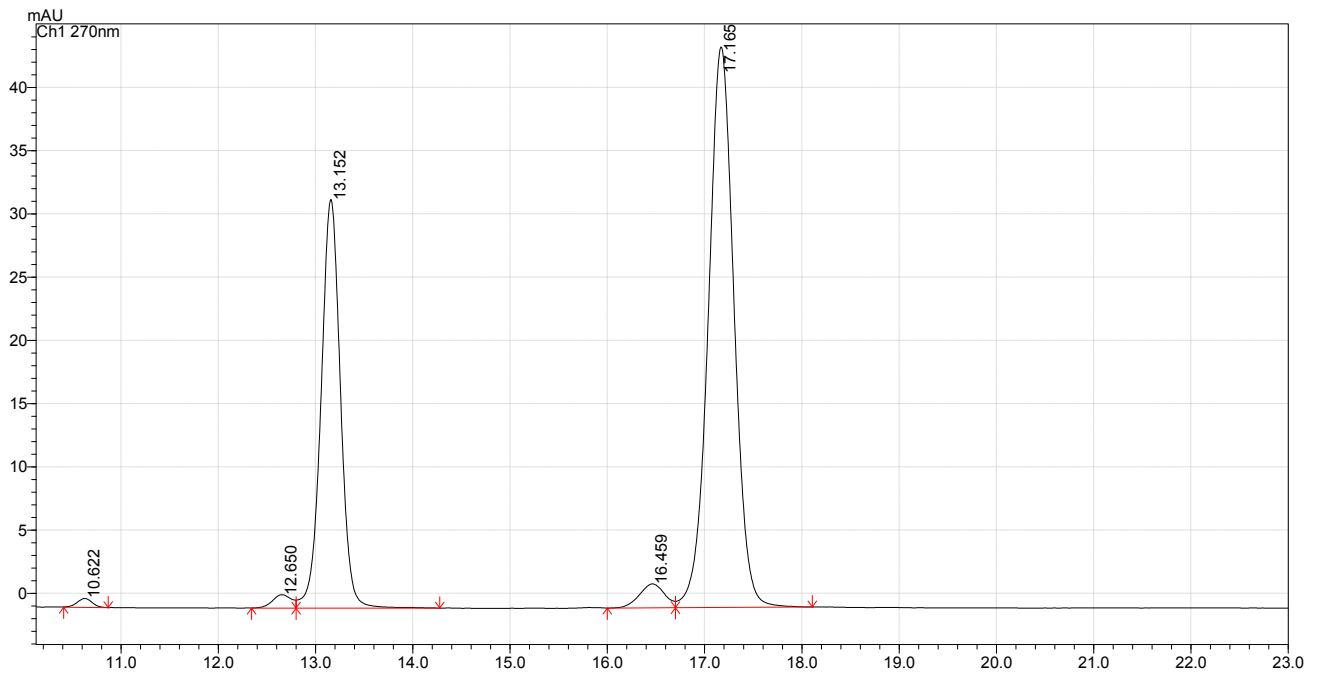
## Prueba 1



## Prueba 2



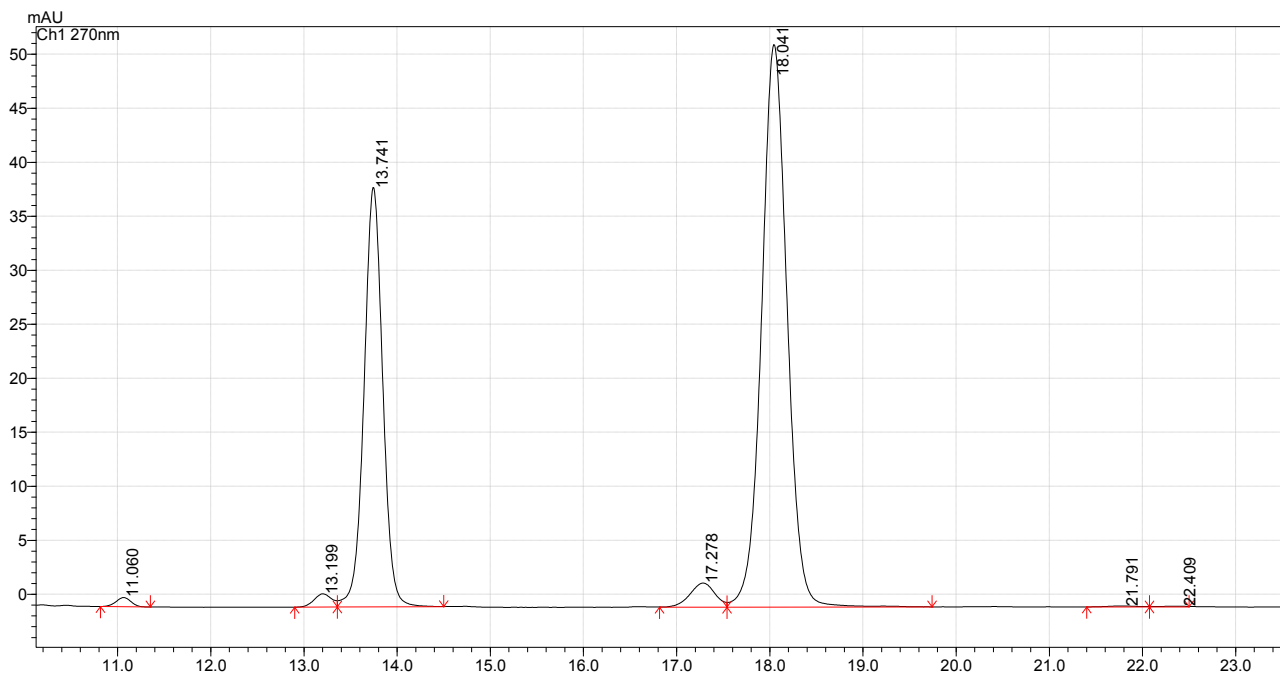
### Prueba 3



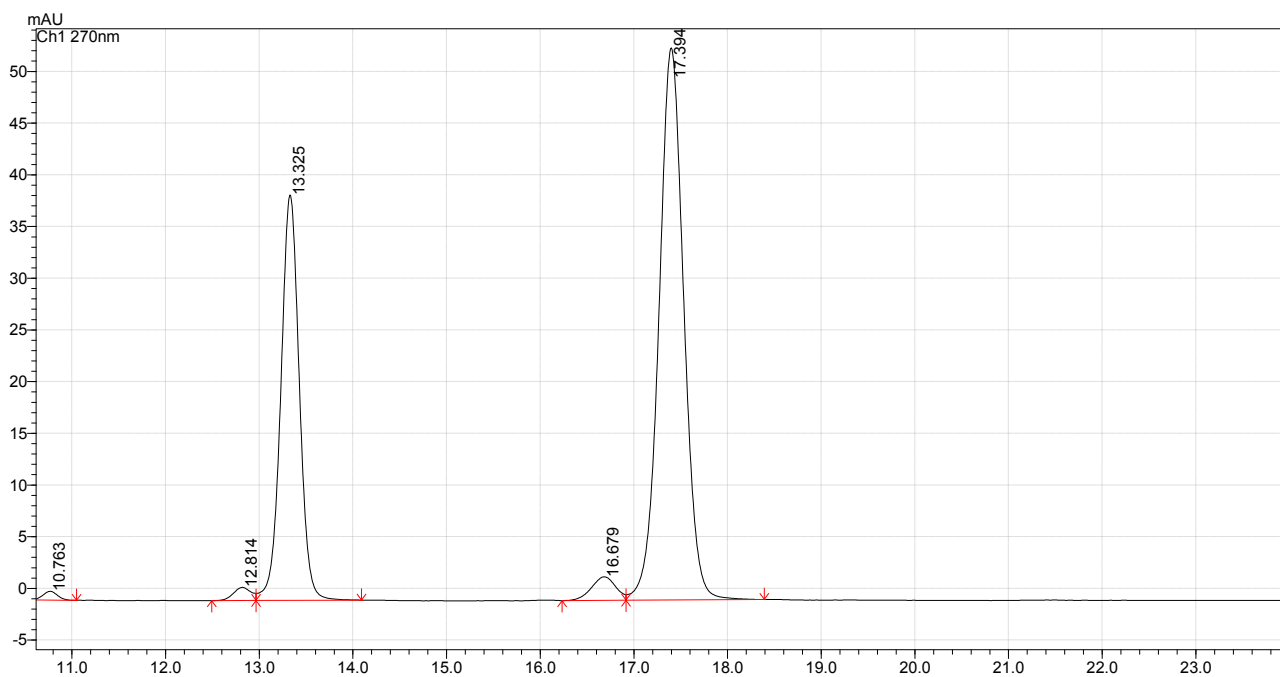
	Prueba 1			Prueba 2			Prueba 3		
Nombre	t <sub>R</sub> (min)	Área	R <sub>s</sub>	t <sub>R</sub> (min)	Área	R <sub>s</sub>	t <sub>R</sub> (min)	Área	R <sub>s</sub>
IAA 1	13,326	446359	1,367	13,106	449209	1,292	13,152	448095	1,256
IAA 2	17,417	816126	1,506	17,154	821885	1,458	17,165	814458	1,448

# Concentración 15 ppm

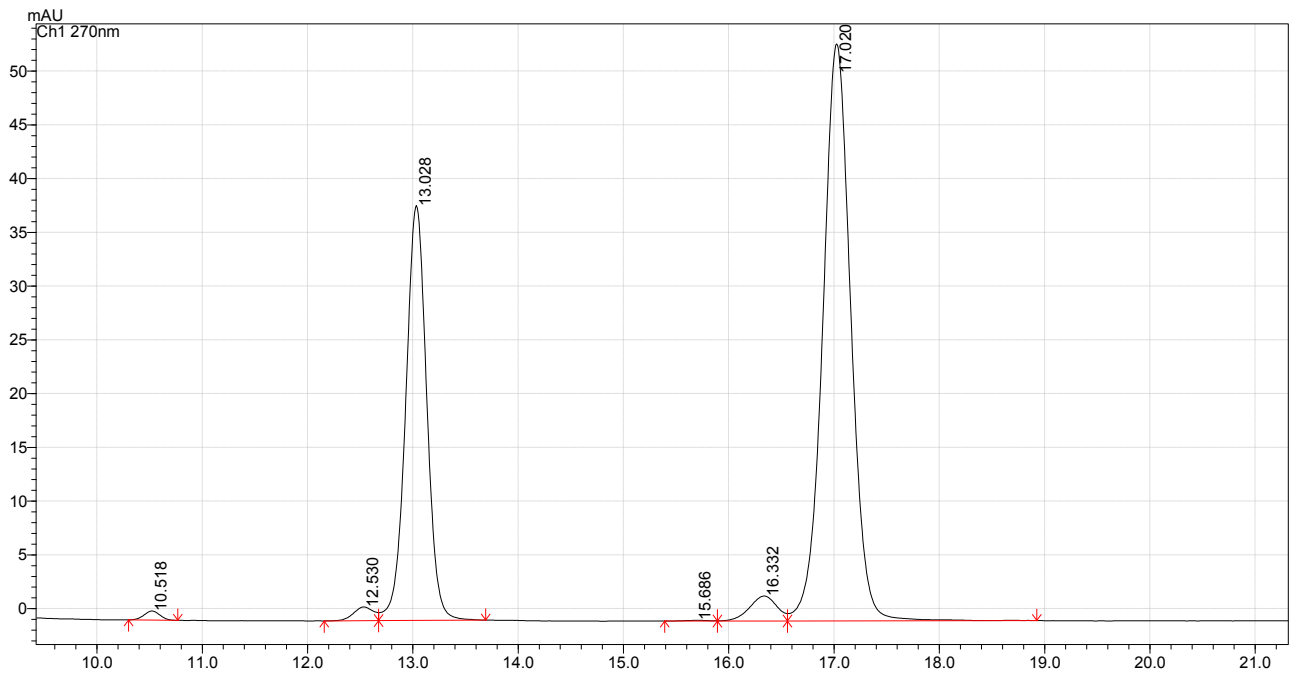
## Prueba 1



## Prueba 2



### Prueba 3

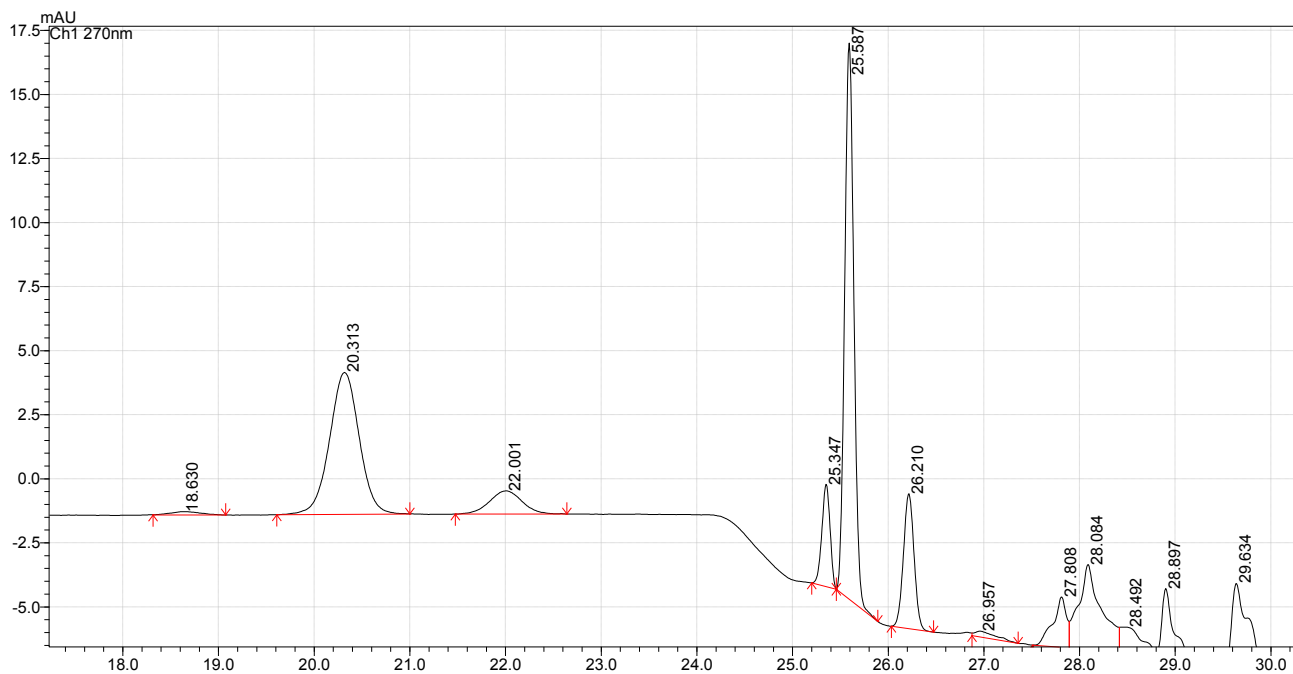


	Prueba 1			Prueba 2			Prueba 3		
Nombre	t <sub>R</sub> (min)	Área	R <sub>s</sub>	t <sub>R</sub> (min)	Área	R <sub>s</sub>	t <sub>R</sub> (min)	Área	R <sub>s</sub>
IAA 1	13,741	541858	1,428	13,325	538125	1,333	13,028	537090	1,245
IAA 2	18,041	990576	1,530	17,394	984364	1,468	17,020	990544	1,402

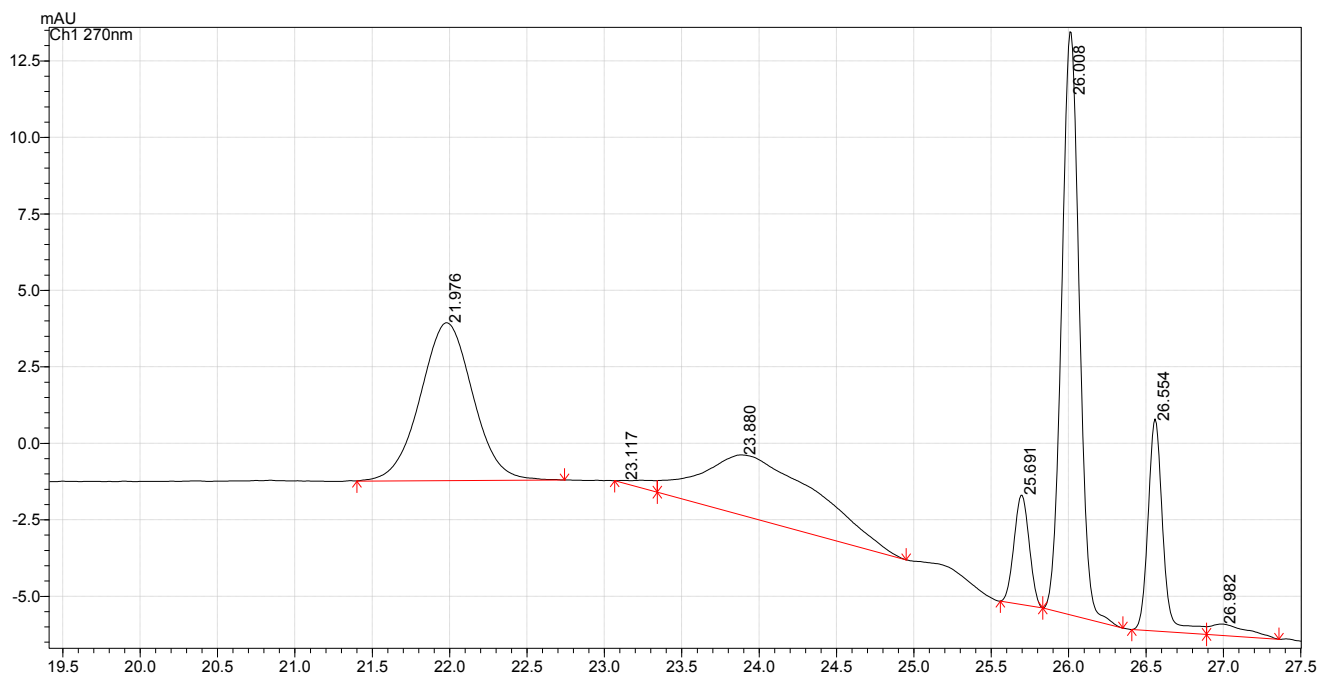
# ANEXO C. Cromatogramas del estándar THIAA

Concentración 3 ppm

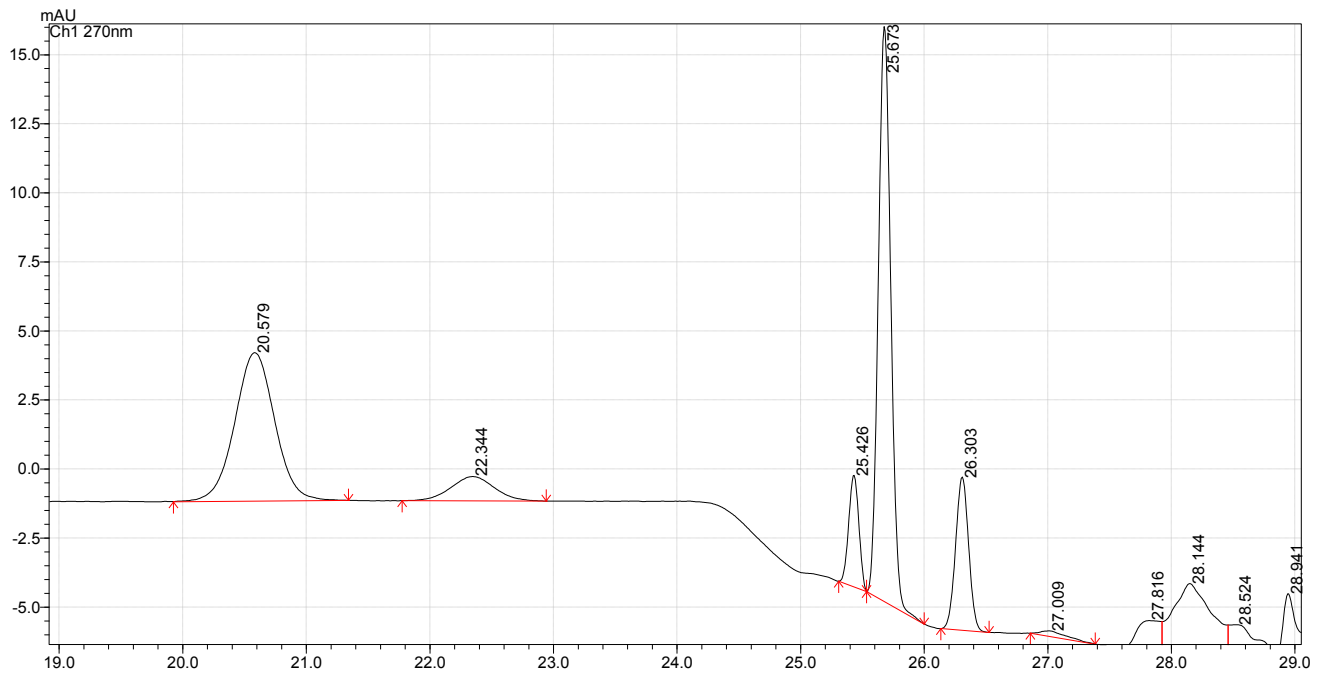
Prueba 1



Prueba 2



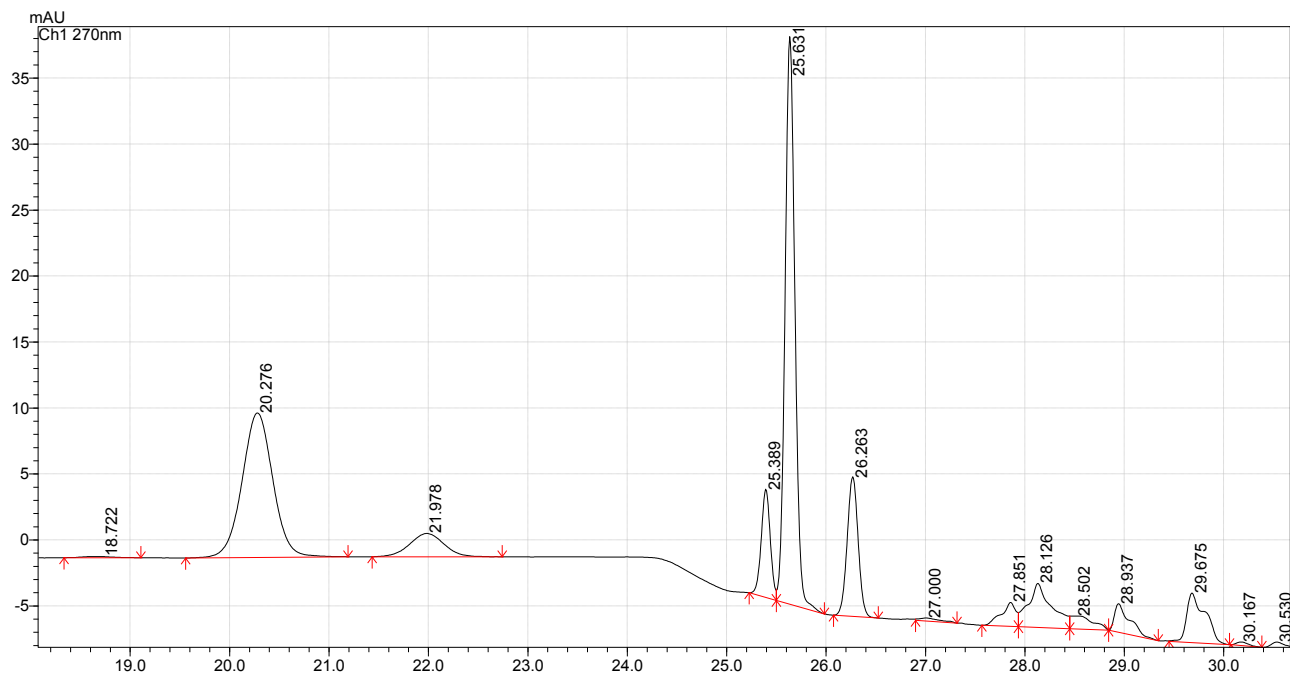
### Prueba 3



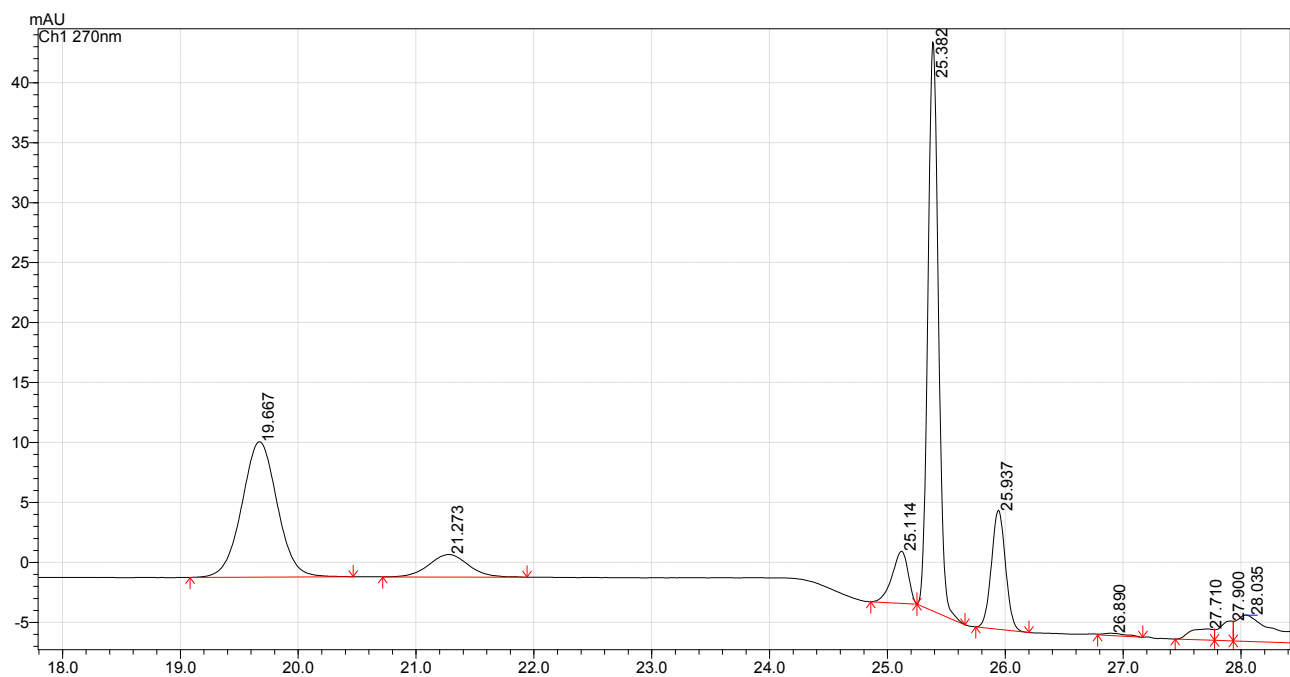
Nombre	Prueba 1			Prueba 2			Prueba 3		
	t <sub>R</sub> (min)	Área	R <sub>s</sub>	t <sub>R</sub> (min)	Área	R <sub>s</sub>	t <sub>R</sub> (min)	Área	R <sub>s</sub>
THIAA 1	20,313	119562	2,903	21,976	121960	8,638	20,579	121318	8,008
THIAA 2	22,001	21410	2,848	23,88	20788	--	22,344	21718	2,852
THIAA 3	25,347	23606	8,436	25,691	24263	2,073	25,426	22967	7,554
THIAA 4	25,587	144051	1,339	26,008	150518	1,541	25,673	145219	1,366
THIAA 5	26,21	40626	3,091	26,554	40621	2,764	26,303	40743	3,132

# Concentración 6 ppm

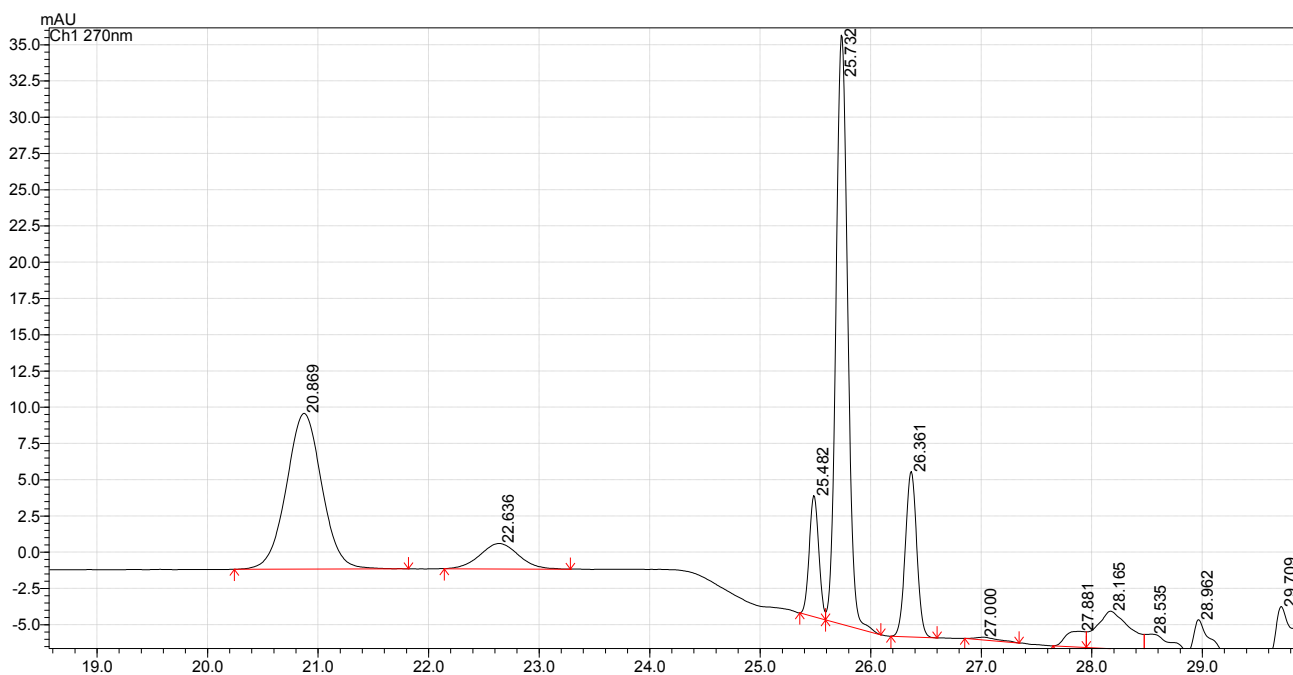
## Prueba 1



## Prueba 2



### Prueba 3

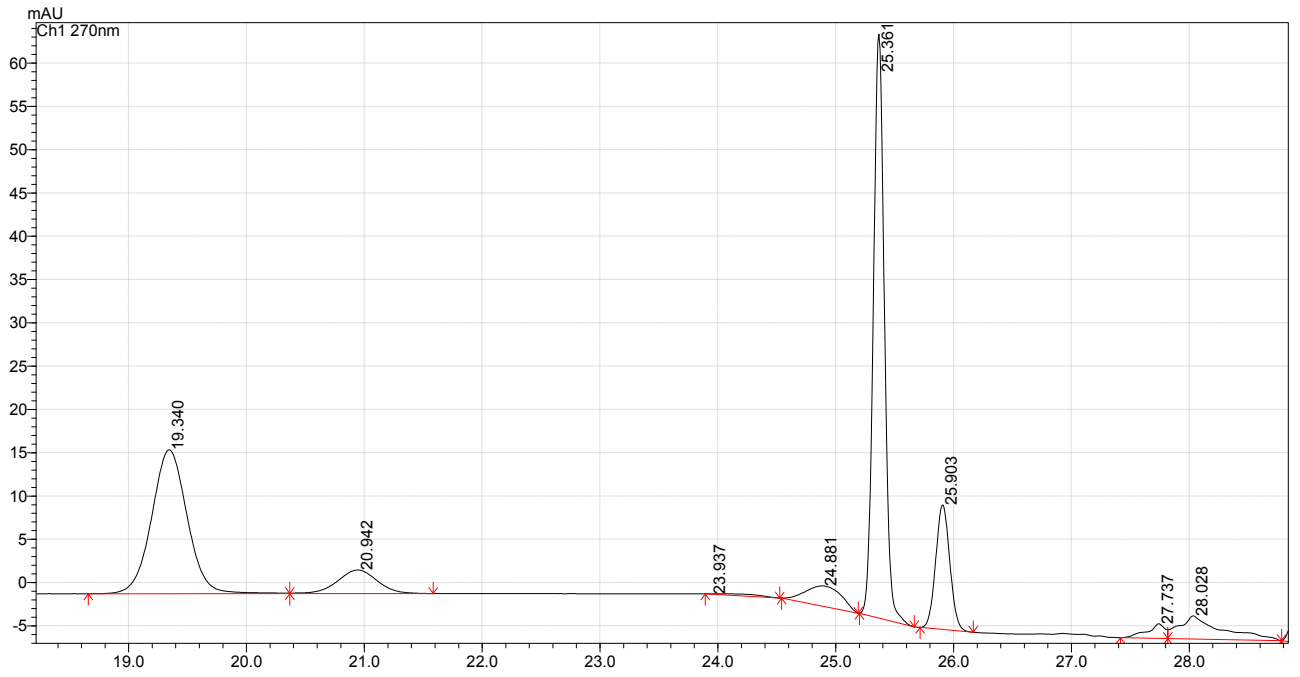


Nombre	Prueba 1			Prueba 2			Prueba 3		
	t <sub>R</sub> (min)	Área	R <sub>s</sub>	t <sub>R</sub> (min)	Área	R <sub>s</sub>	t <sub>R</sub> (min)	Área	R <sub>s</sub>
THIAA 1	20,276	236090	2,556	19,667	235615	8,241	20,869	239495	8,612
THIAA 2	21,978	42756	2,836	21,273	43906	2,775	22,636	42961	2,885
THIAA 3	25,389	52116	8,345	25,114	40751	8,851	25,482	49757	7,017
THIAA 4	25,631	296032	1,298	25,382	293777	1,239	25,732	297840	1,339
THIAA 5	26,263	81131	3,123	25,937	82370	2,746	26,361	82127	3,109

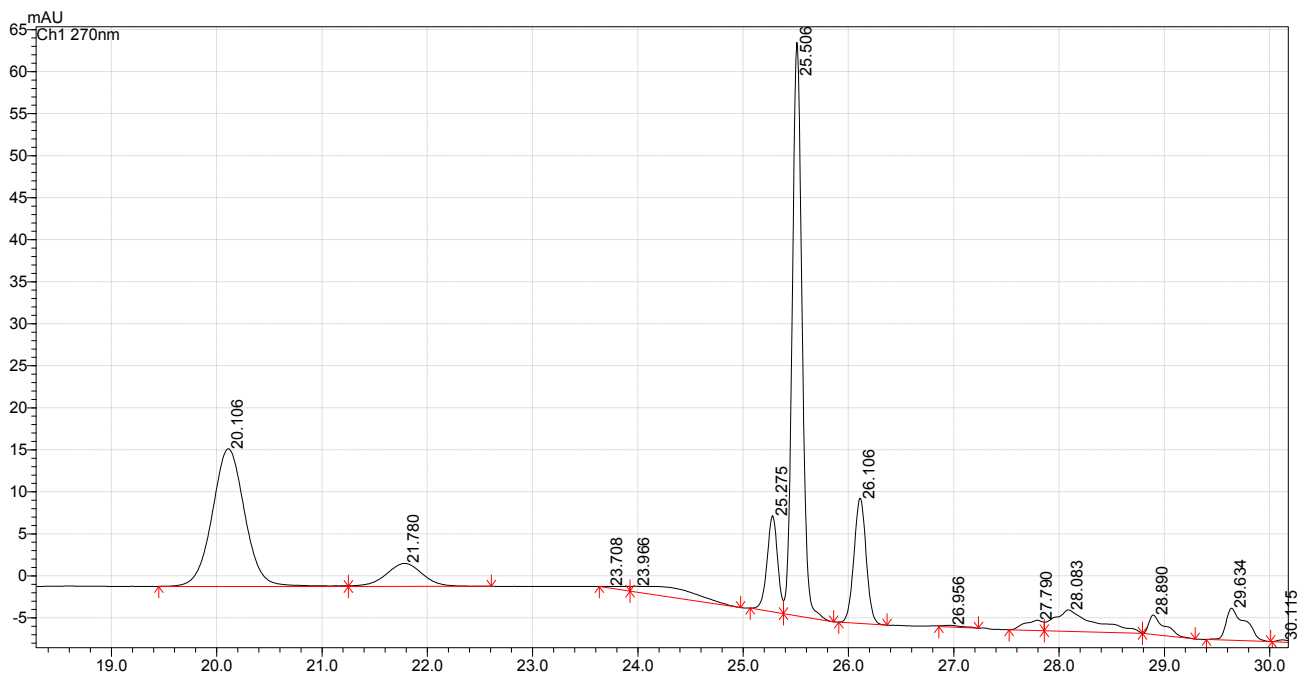


# Concentración 9 ppm

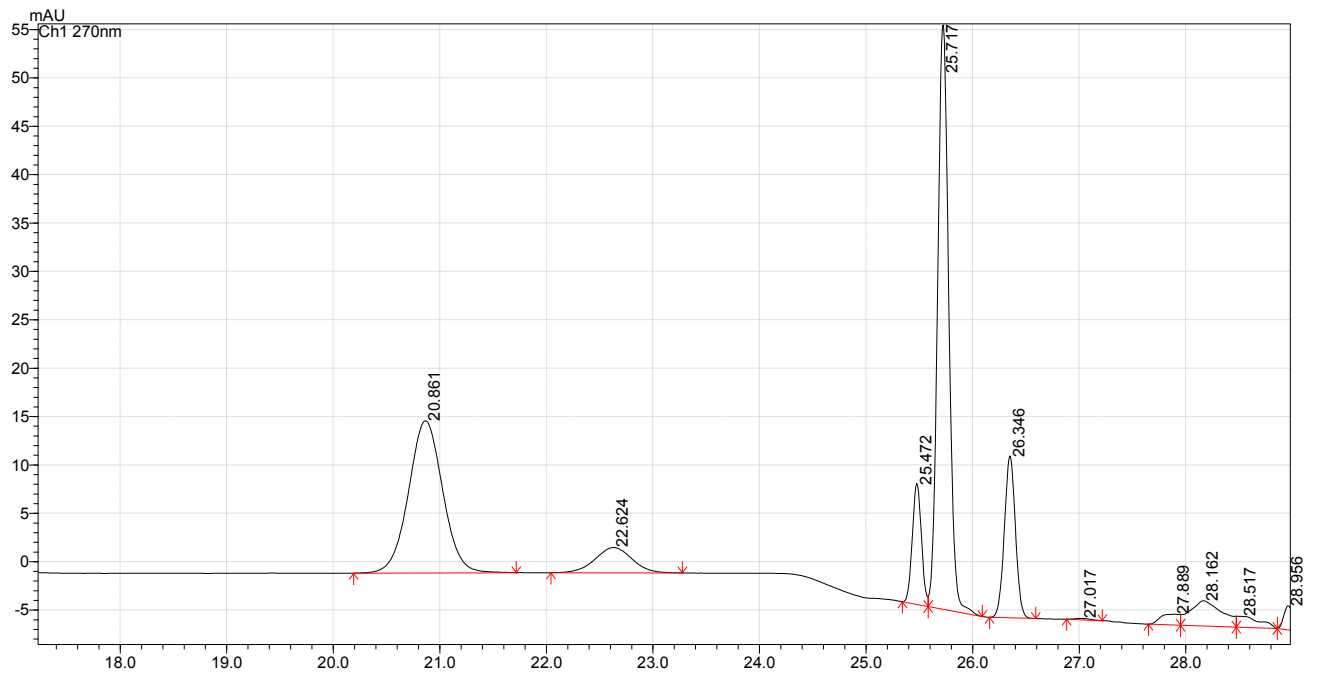
## Prueba 1



## Prueba 2



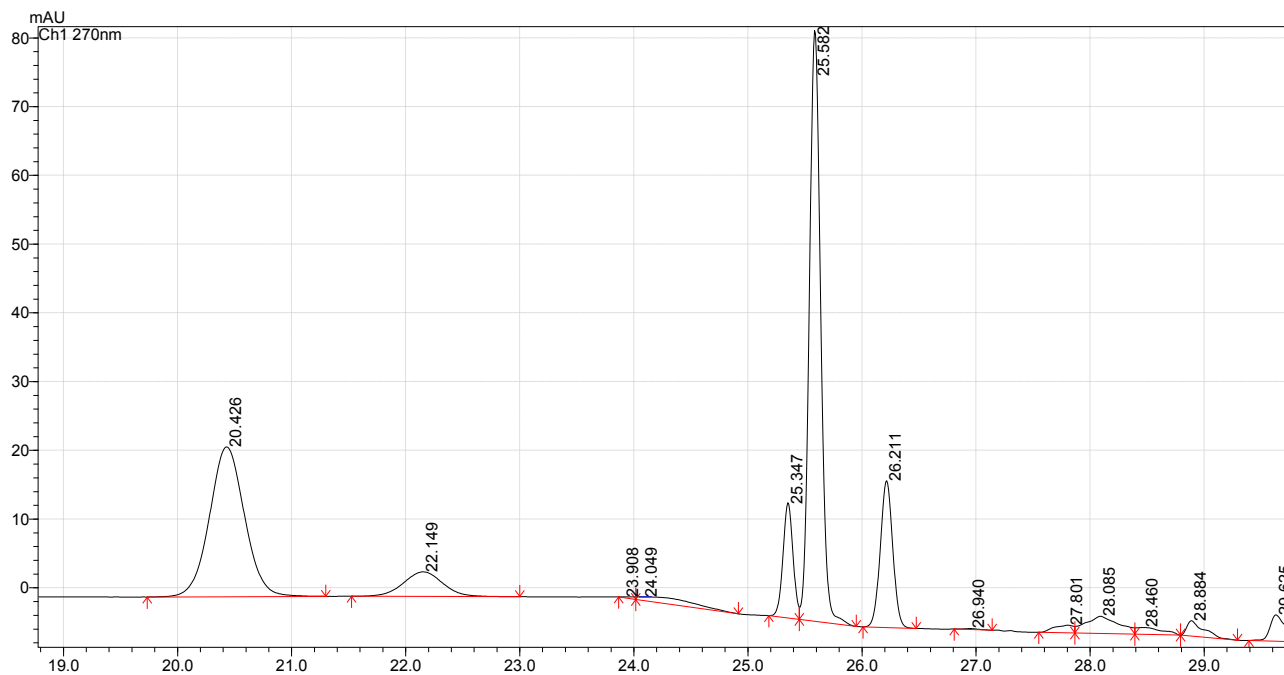
### Prueba 3



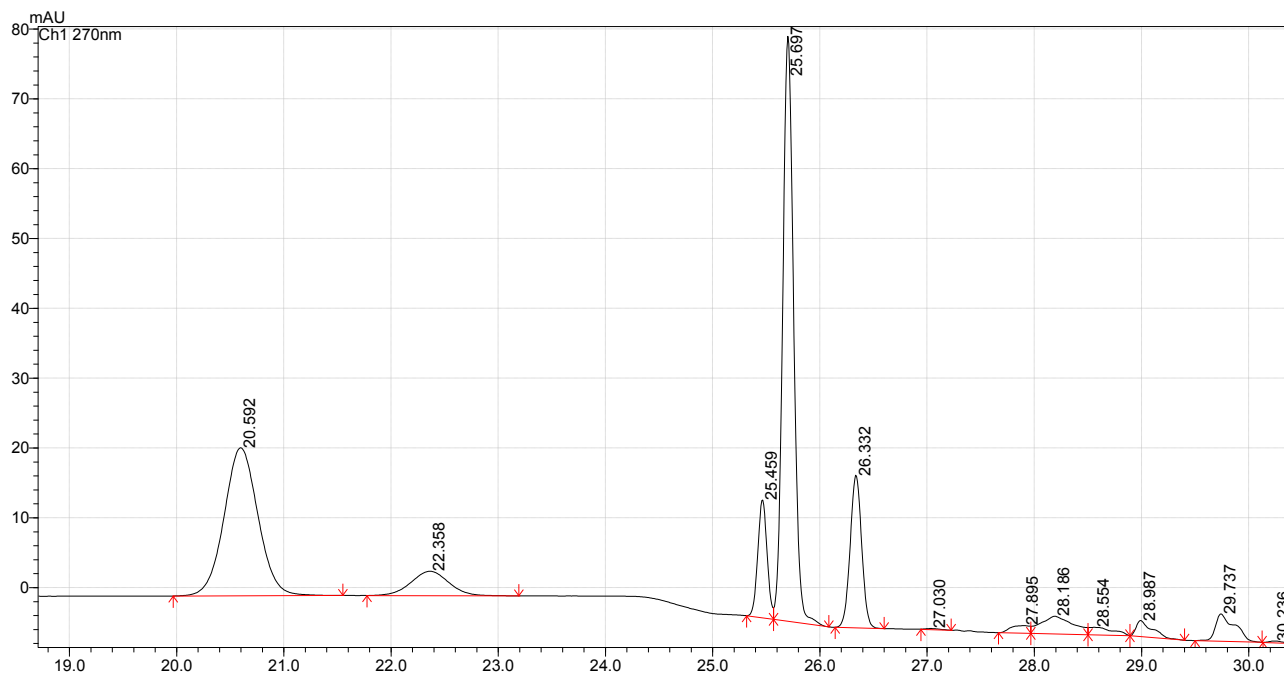
Nombre	Prueba 1			Prueba 2			Prueba 3		
	t <sub>R</sub> (min)	Área	R <sub>s</sub>	t <sub>R</sub> (min)	Área	R <sub>s</sub>	t <sub>R</sub> (min)	Área	R <sub>s</sub>
THIAA 1	19,34	349044	2,635	20,106	350402	8,163	20,861	351030	8,116
THIAA 2	20,942	64185	2,754	21,78	65446	2,829	22,624	63148	2,88
THIAA 3	24,881	79461	1,623	25,275	79702	1,87	25,472	74619	7,035
THIAA 4	25,361	436080	1,291	25,506	442052	1,231	25,717	438692	1,319
THIAA 5	25,903	119797	2,638	26,106	119910	2,987	26,346	121200	3,115

# Concentración 12 ppm

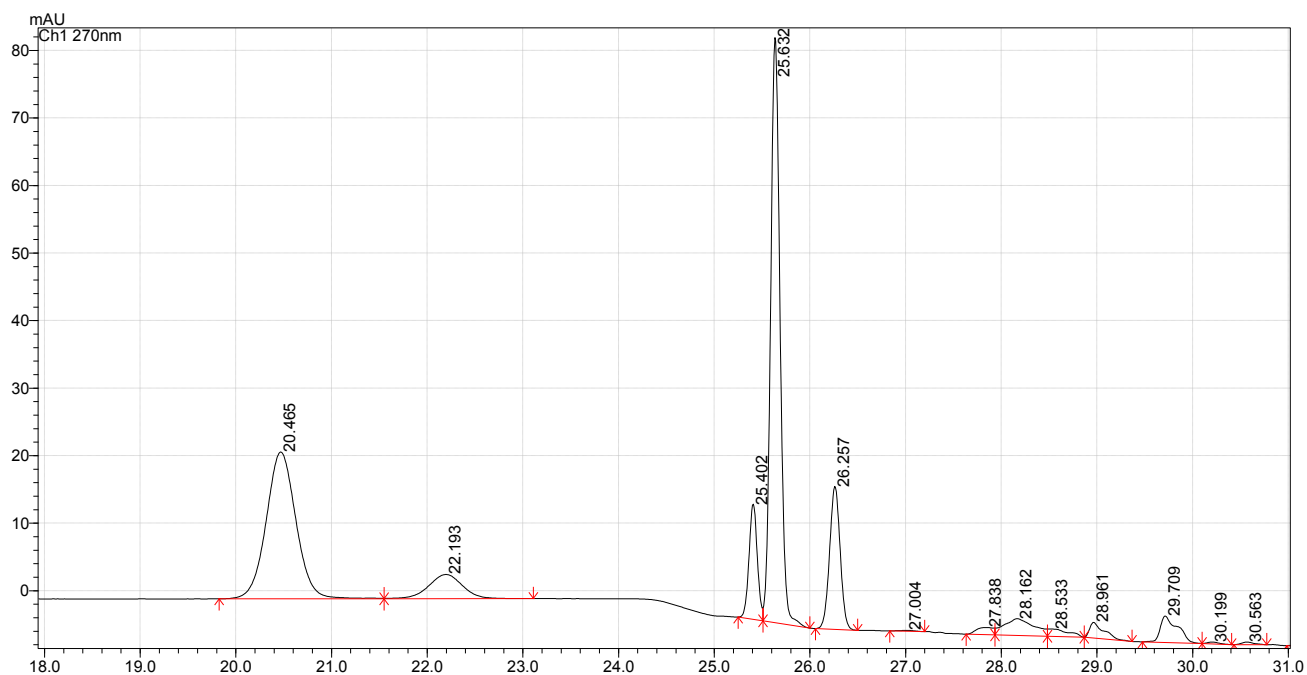
## Prueba 1



## Prueba 2



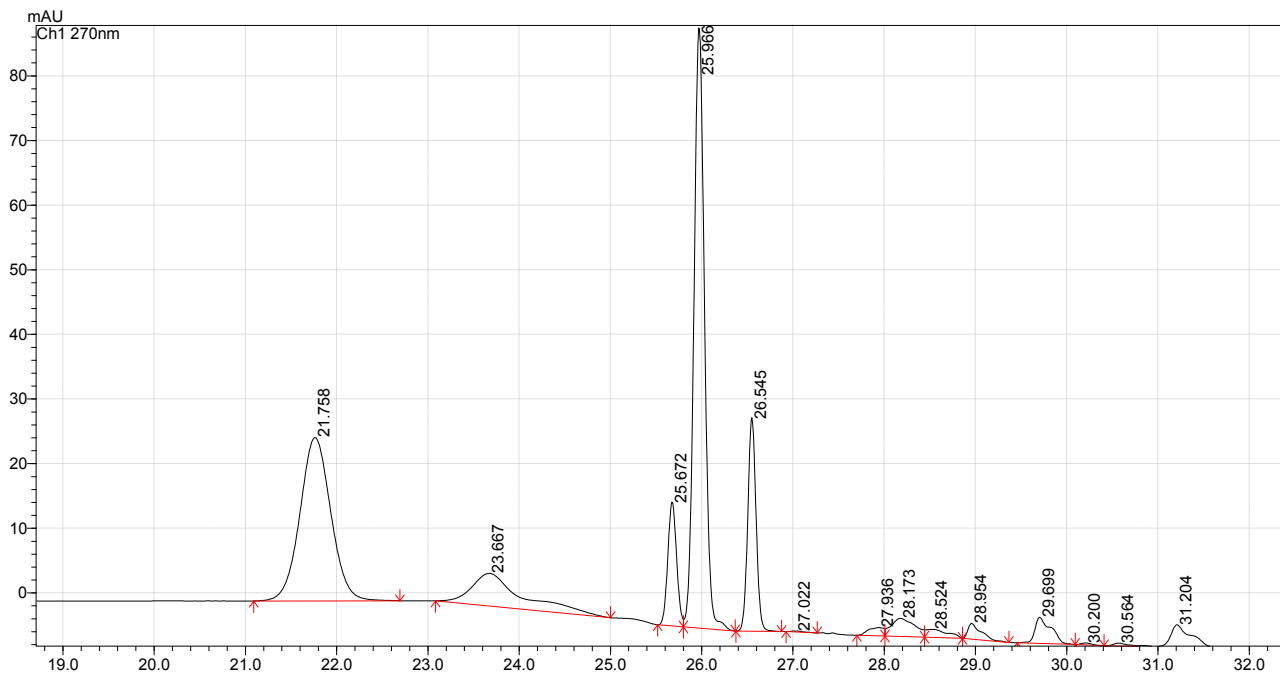
### Prueba 3



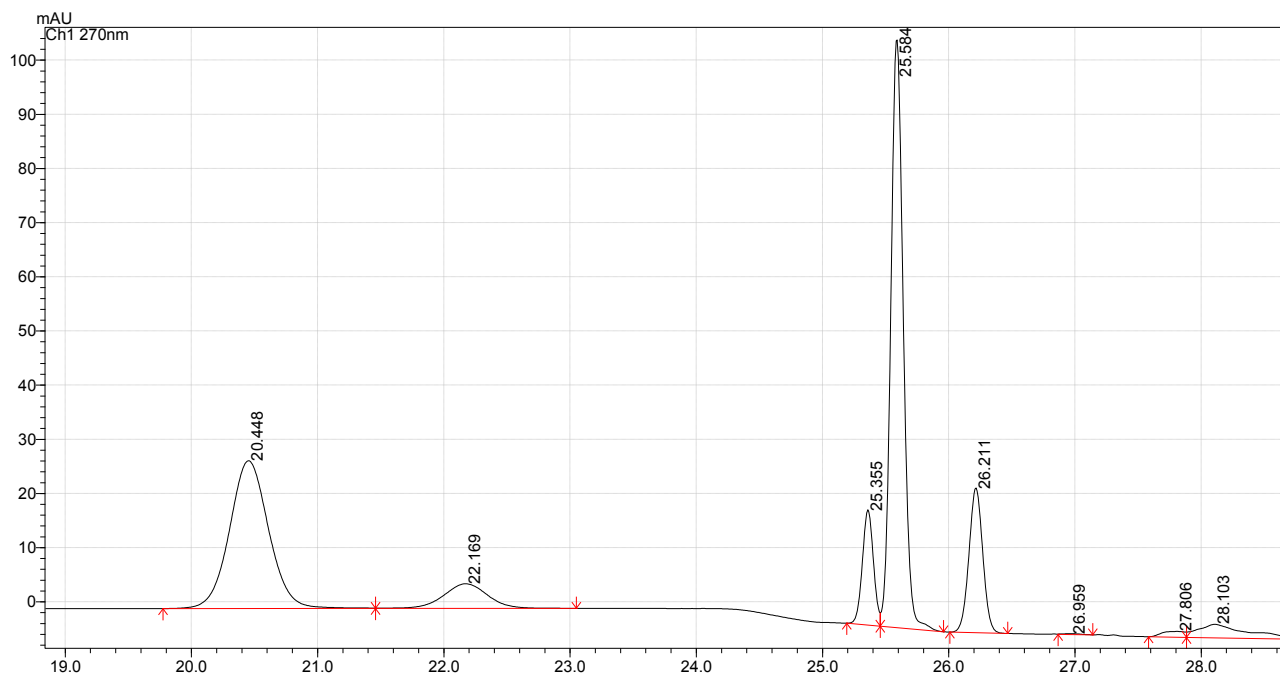
Nombre	Prueba 1			Prueba 2			Prueba 3		
	t <sub>R</sub> (min)	Área	R <sub>s</sub>	t <sub>R</sub> (min)	Área	R <sub>s</sub>	t <sub>R</sub> (min)	Área	R <sub>s</sub>
THIAA 1	20,426	466279	8,291	20,592	467402	7,187	20,465	470403	6,492
THIAA 2	22,149	86426	2,885	22,358	86509	2,860	22,193	88785	2,855
THIAA 3	25,347	103261	2,235	25,459	102446	7,486	25,402	103668	7,860
THIAA 4	25,582	592800	1,276	25,697	591385	1,291	25,632	591228	1,274
THIAA 5	26,211	163181	3,116	26,332	163285	3,146	26,257	162978	3,094

# Concentración 15 ppm

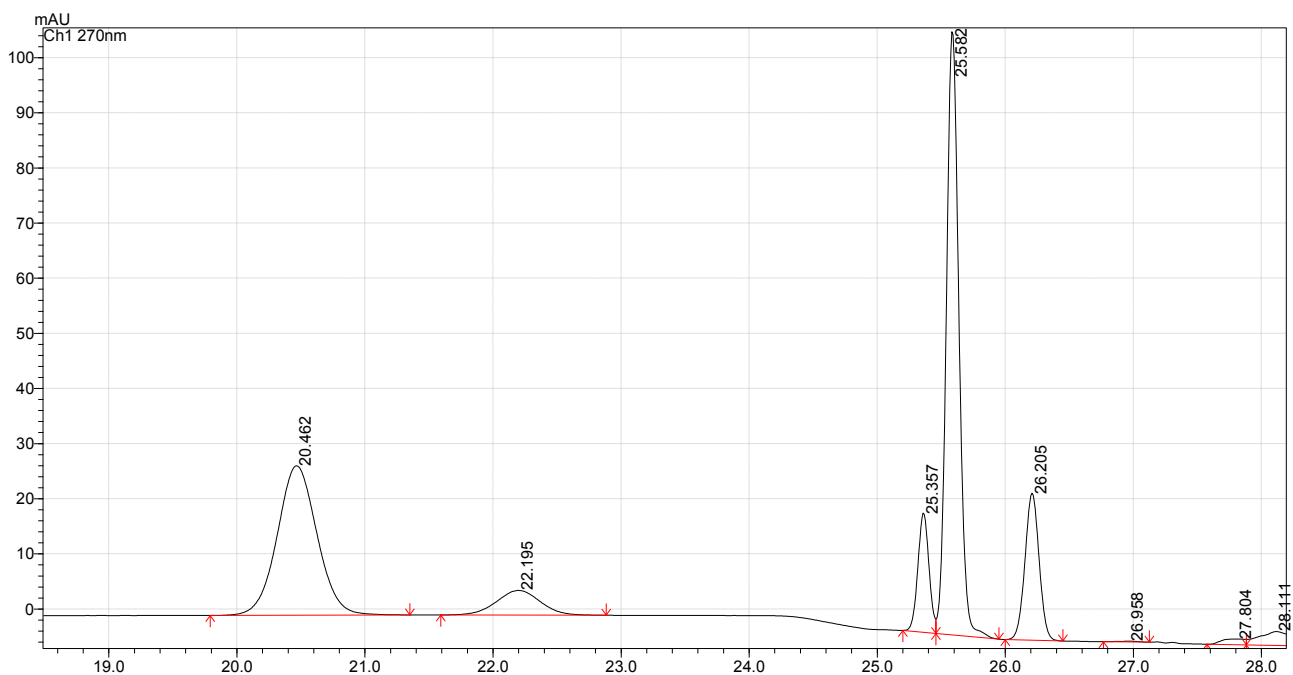
## Prueba 1



## Prueba 2



### Prueba 3



	Prueba 1			Prueba 2			Prueba 3		
Nombre	t <sub>R</sub> (min)	Área	R <sub>s</sub>	t <sub>R</sub> (min)	Área	R <sub>s</sub>	t <sub>R</sub> (min)	Área	R <sub>s</sub>
THIAA 1	21,758	596360	7,085	20,448	589432	6,860	20,462	586307	6,721
THIAA 2	23,667	105859	2,766	22,169	111173	2,878	22,195	106952	2,885
THIAA 3	25,672	129232	4,220	25,355	130199	7,883	25,357	131311	7,831
THIAA 4	25,966	746398	1,437	25,584	743500	1,251	25,582	744721	1,237
THIAA 5	26,545	209144	2,905	26,211	204815	3,112	26,205	205140	3,086

## ANEXO D. Validación del método analítico

### Linealidad

Ecuación de la recta de regresión  $Y=a+bX$

Áreas correspondientes a los niveles de concentración estudiados

Nº	c (mg/L)	Área IAA			Área THIAA					
		IAA 1	IAA 2	IAA TOT	THIAA 1	THIAA 2	THIAA 3	THIAA 4	THIAA 5	THIAA TOT
1	3	123398	220665	344063	119562	21410	23606	144051	40626	349255
2	3	121294	220541	341835	121960	20788	24263	150518	40621	358150
3	3	120977	221548	342525	121318	21718	22967	145219	40743	351965
4	6	214137	383815	597952	236090	42756	52116	296032	81131	708125
5	6	213898	385758	599656	235615	43906	40751	293777	82370	696419
6	6	210437	385546	595983	239495	42961	49757	297840	82127	712180
7	9	341695	616326	958021	349044	64185	79461	436080	119797	1048567
8	9	335994	616756	952750	350402	65446	79702	442052	119910	1057512
9	9	334459	614290	948749	351030	63148	74619	438692	121200	1048689
10	12	446359	816126	1262485	466279	86426	103261	592800	163181	1411947
11	12	449209	821885	1271094	467402	86509	102446	591385	163285	1411027
12	12	448095	814458	1262553	470403	88785	103668	591228	162978	1417062
13	15	541858	990576	1532434	596360	105859	129232	746398	209144	1786993
14	15	538125	984364	1522489	589432	111173	130199	743500	204815	1779119
15	15	537090	990544	1527634	586307	106952	131311	744721	205140	1774431

Parámetros de la regresión Lineal

Parámetro	IAA	THIAA
a	26267,3	-7803,07
b	101231,2	118729,5
R <sup>2</sup>	0,9972	0,9998
r	0,9986	0,9999
S <sub>a</sub>	14933,18	4868,727
S <sub>b</sub>	1500,841	489,326

Prueba t de student para verificar la regresión lineal en base al coeficiente de correlación

	IAA	THIAA
Niveles	15	15
Grados de Libertad	13	13
Intervalo de Confianza (%)	95	95
$\alpha$	0,05	0,05
t tabla	2,16	2,16
t calculado	68,043	254,925
Evaluación : ¿t calc > t tabla?	Si, existe correlación proporcional entre X e Y	Si, existe correlación proporcional entre X e Y

Prueba t de student de la pendiente

	IAA	THIAA
Niveles	15	15
Grados de Libertad	13	13
Intervalo de Confianza (%)	95	95
$\alpha$	0,05	0,05
t tabla	2,16	2,16
t calculado	67,45	242,639
Evaluación: ¿t calc > t tabla?	La pendiente 'b' es diferente de cero	La pendiente 'b' es diferente de cero

Prueba t de student del intercepto

	IAA	THIAA
Niveles	15	15
Grados de Libertad	13	13
Intervalo de Confianza (%)	95	95
$\alpha$	0,05	0,05
t tabla	2,16	2,16
t calculado	1,759	1,603
Evaluación: ¿t calc < t tabla?	El intercepto 'a' es igual a cero	El intercepto 'a' es igual a cero



## Precisión

Áreas correspondientes a los niveles de concentración de Iso- $\alpha$ -ácidos

c (mg/L)	IAA 1	IAA 2	IAA TOT	Media	Varianza	Desviación Estándar
3	123398	220665	344063	342807,667	1300921,33	1140,579
	121294	220541	341835			
	120977	221548	342525			
9	341695	616326	958021	953173,333	21626904,3	4650,474
	335994	616756	952750			
	334459	614290	948749			
15	541858	990576	1532434	1527519	24735675	4973,497
	538125	984364	1522489			
	537090	990544	1527634			

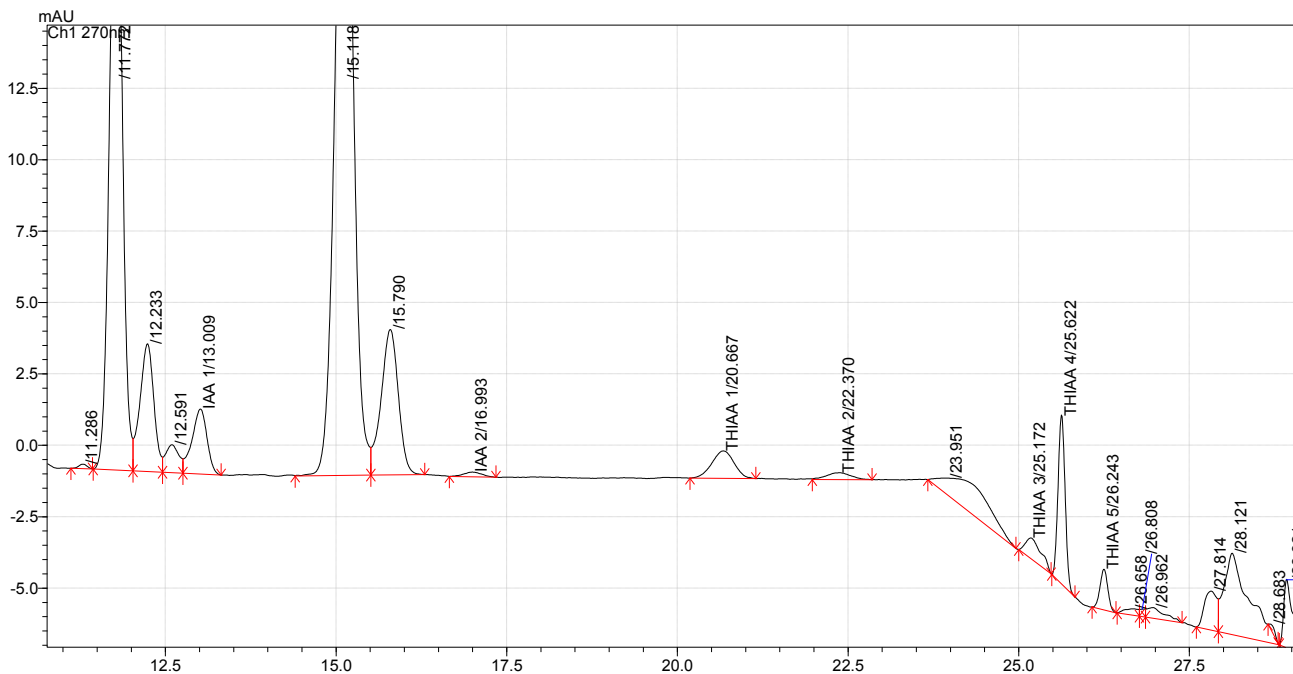
Áreas correspondientes a los niveles de concentración de Tetrahydro-iso- $\alpha$ -ácidos

c (mg/L)	THIAA 1	THIAA 2	THIAA 3	THIAA 4	THIAA 5	THIAA TOT	Media	Varianza	Desviación Estándar
3	119562	21410	23606	144051	40626	349255	353123,3	20786558,33	4559,228
	121960	20788	24263	150518	40621	358150			
	121318	21718	22967	145219	40743	351965			
9	349044	64185	79461	436080	119797	1048567	1051589	26312206,33	5129,543
	350402	65446	79702	442052	119910	1057512			
	351030	63148	74619	438692	121200	1048689			
15	596360	105859	129232	746398	209144	1786993	1780181	40296844	6347,98
	589432	111173	130199	743500	204815	1779119			
	586307	106952	131311	744721	205140	1774431			

# ANEXO E. Cromatogramas de las cervezas analizadas

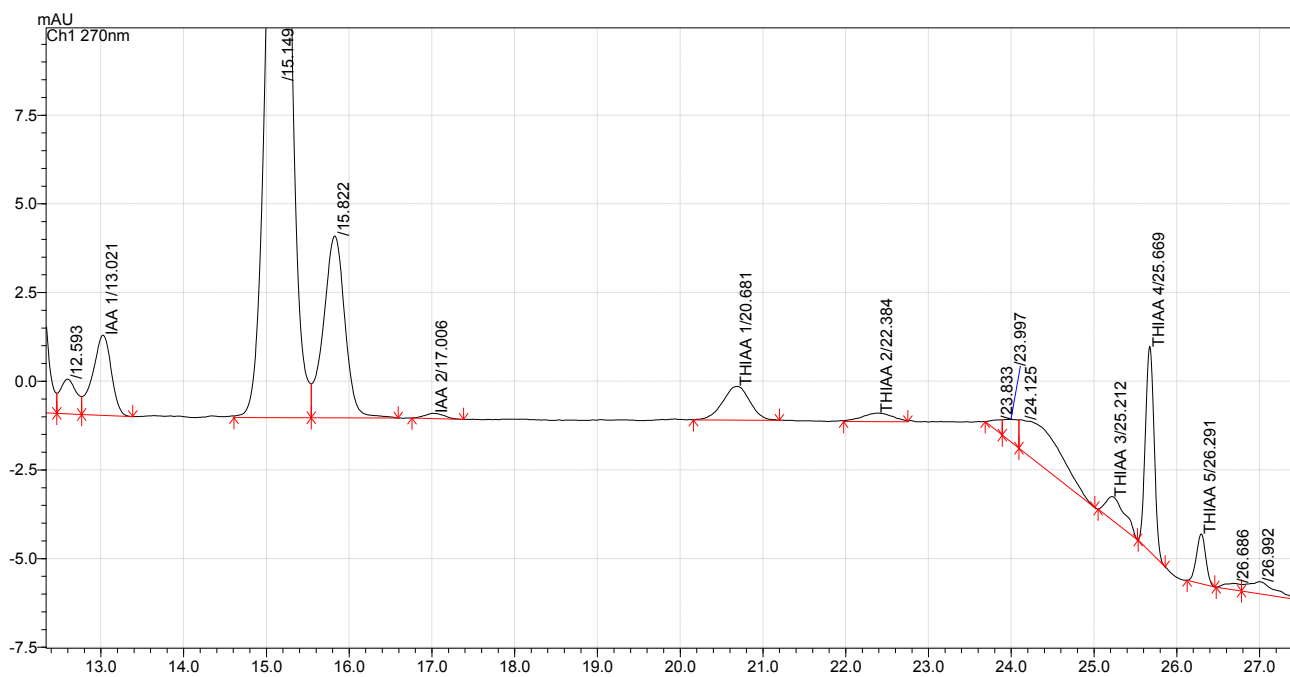
## Paceña 162S

### Prueba 1



Nombre	t <sub>R</sub> (min)	Área	R <sub>s</sub>	k'	N	α
IAA 1	13,009	34689	0,942	6,119	16317,703	1,039
IAA 2	16,993	3068	2,445	8,299	17367,264	1,086
THIAA 1	20,667	21788	6,547	10,31	18563,035	1,242
THIAA 2	22,37	5909	2,681	11,242	18148,585	1,09
THIAA 3	25,172	11813	1,452	12,775	50794,75	1,055
THIAA 4	25,622	42504	1,386	13,021	253398,176	1,019
THIAA 5	26,243	11212	2,93	13,361	226850,222	1,026

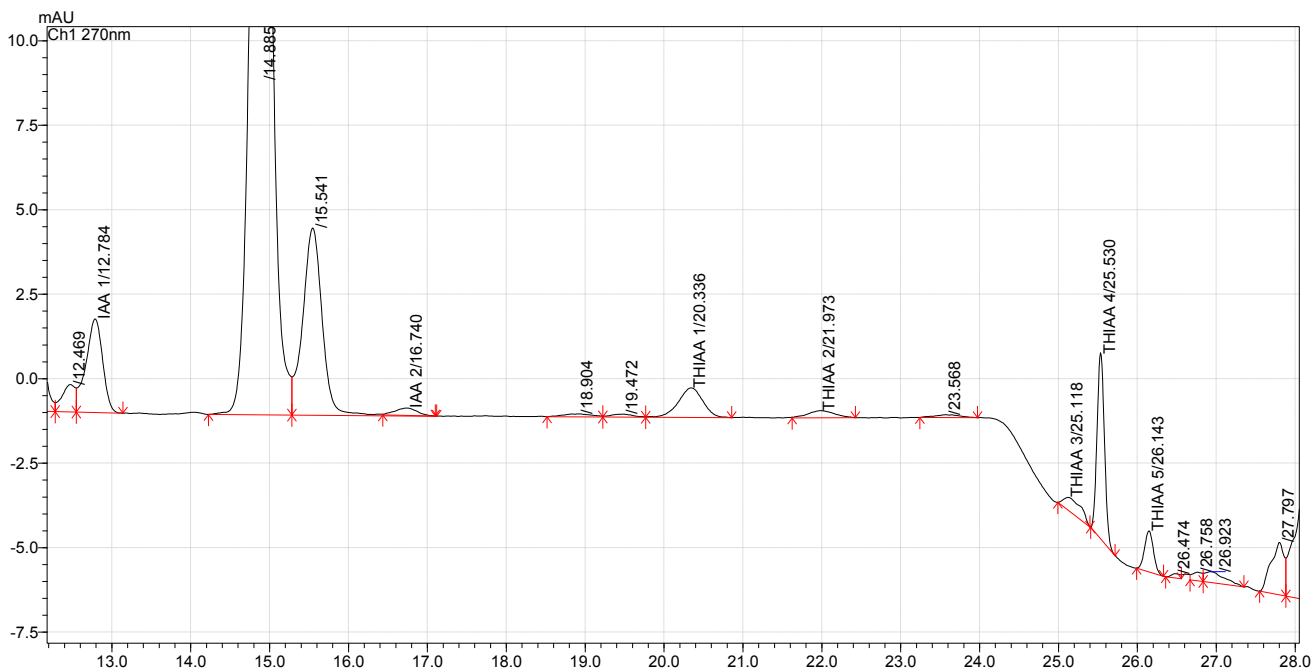
## Prueba 2



Nombre	$t_R$ (min)	Área	$R_s$	$k'$	N	$\alpha$
IAA 1	13,021	35187	0,944	6,131	15663,971	1,04
IAA 2	17,006	2400	2,603	8,313	23646,539	1,085
THIAA 1	20,681	21669	7,033	10,326	18827,293	1,242
THIAA 2	22,384	6324	2,675	11,258	17862,337	1,09
THIAA 3	25,212	11027	1,305	12,807	50963,513	1,049
THIAA 4	25,669	41867	1,402	13,057	250446,34	1,02
THIAA 5	26,291	10917	2,933	13,398	230656,987	1,026

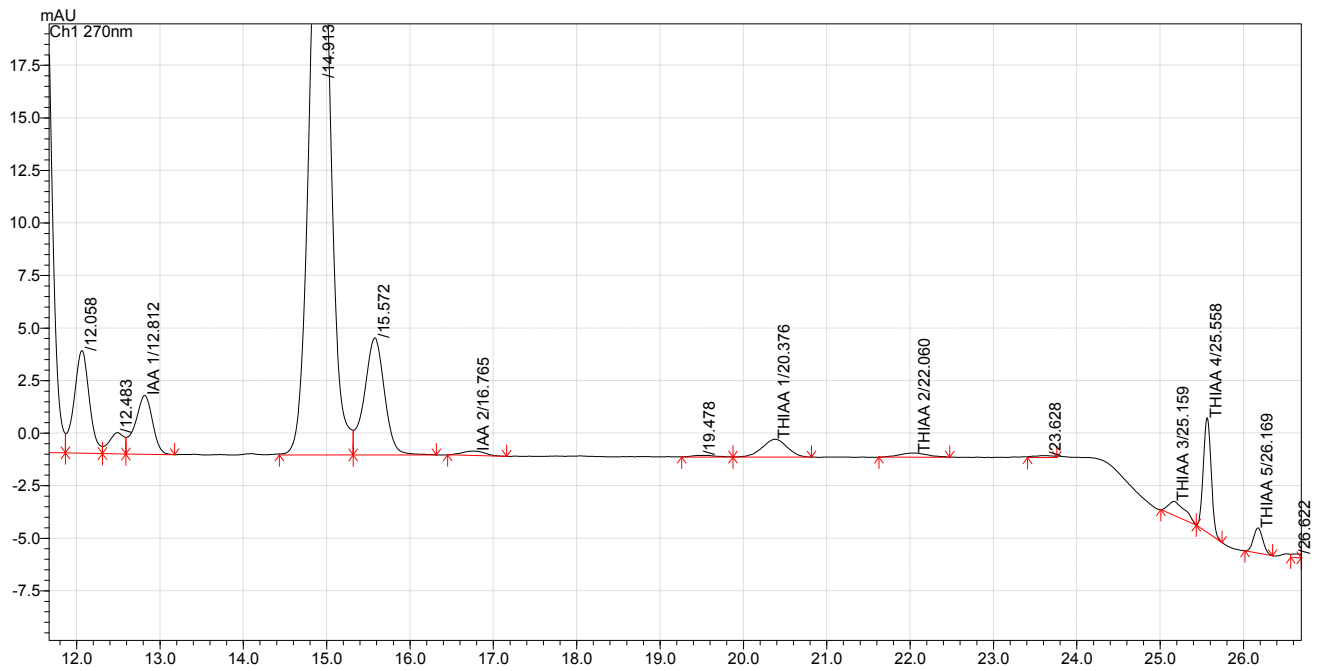
# Paceña 245Q

## Prueba 1



Nombre	$t_R$ (min)	Área	$R_s$	$k'$	N	$\alpha$
IAA 1	12,784	40780	0,557	5,989	16869,767	1,03
IAA 2	16,740	4212	2,547	8,152	17734,375	1,087
THIAA 1	20,336	18887	1,635	10,118	20079,506	1,049
THIAA 2	21,973	5028	2,773	11,014	20983,94	1,088
THIAA 3	25,118	6588	3,107	12,733	68046,075	1,071
THIAA 4	25,530	35595	1,445	12,958	305260,136	1,018
THIAA 5	26,143	9400	3,043	13,293	230938,55	1,026

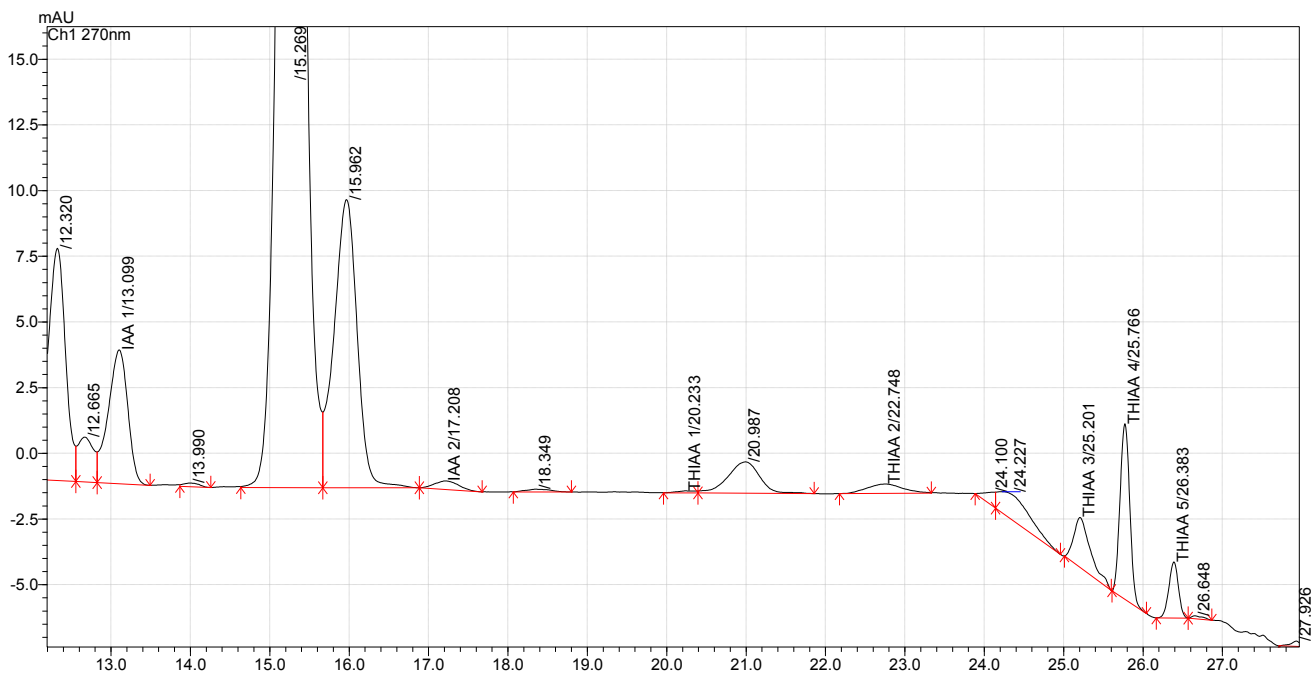
## Prueba 2



Nombre	$t_R$ (min)	Área	$R_s$	$k'$	N	$\alpha$
IAA 1	12,812	40348	0,696	6,845	17504,012	1,03
IAA 2	16,765	3913	2,565	9,266	18655,819	1,086
THIAA 1	20,376	17635	1,721	11,476	21084,854	1,05
THIAA 2	22,060	4974	2,844	12,507	20059,943	1,09
THIAA 3	25,159	9472	2,737	14,405	67674,13	1,07
THIAA 4	25,558	35380	1,395	14,65	303846,643	1,017
THIAA 5	26,169	9325	3,026	15,023	230591,761	1,026

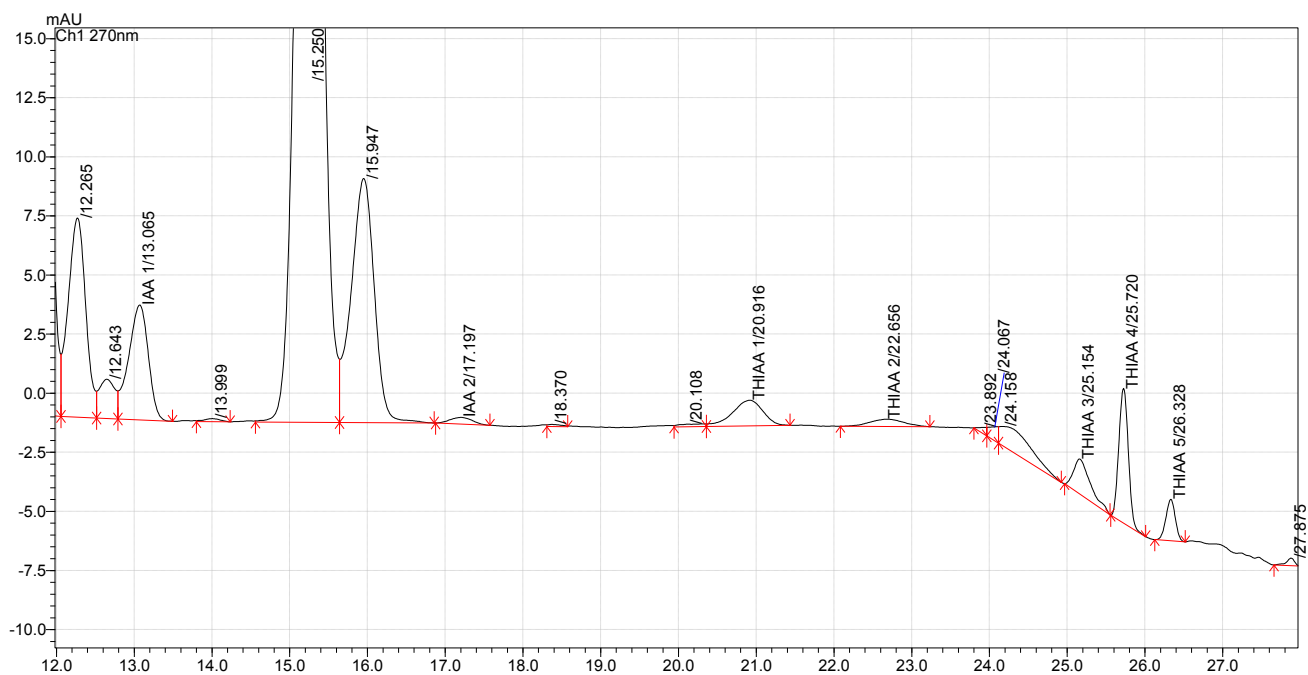
# Paceña 240P

## Prueba 1



Nombre	$t_R$ (min)	Área	$R_s$	$k'$	N	$\alpha$
IAA 1	13,099	107282	0,725	5,049	12692,335	1,041
IAA 2	17,208	7814	2,247	6,947	14688,279	1,09
THIAA 1	20,233	1317	2,178	8,344	4710,773	1,116
THIAA 2	22,748	11281	2,318	9,505	12682,928	1,094
THIAA 3	25,201	27573	1,473	10,638	70207,122	1,044
THIAA 4	25,766	56803	1,834	10,899	189784,554	1,025
THIAA 5	26,383	17802	2,634	11,184	207277,113	1,026

## Prueba 2



Nombre	$t_R$ (min)	Área	$R_s$	$k'$	N	$\alpha$
IAA 1	13,065	105658	0,723	5,053	11873,388	1,04
IAA 2	17,197	6501	2,312	6,967	16851,964	1,091
THIAA 1	20,916	29474	0,723	8,691	13900,874	1,045
THIAA 2	22,656	9542	2,291	9,497	12544,997	1,093
THIAA 3	25,154	21899	1,467	10,654	58837,512	1,045
THIAA 4	25,720	48233	1,739	10,916	189953,679	1,025
THIAA 5	26,328	14658	2,587	11,198	202687,931	1,026

## ANEXO F. Cuantificación de los analitos en muestras de cerveza

Determinación de las concentraciones de IAA y THIAA en muestras de cerveza  
 Recta de Calibración  $Y=a+bX$

Nº	c (mg/L)	IAA TOT		c (mg/L)	THIAA TOT	
	Xi	Yi	(Xi-Xp) <sup>2</sup>	Xi	Yi	(Xi-Xp) <sup>2</sup>
1	3	344063	36	3	349255	36
2	3	341835	36	3	358150	36
3	3	342525	36	3	351965	36
4	6	597952	9	6	708125	9
5	6	599656	9	6	696419	9
6	6	595983	9	6	712180	9
7	9	958021	0	9	1048567	0
8	9	952750	0	9	1057512	0
9	9	948749	0	9	1048689	0
10	12	1262485	9	12	1411947	9
11	12	1271094	9	12	1411027	9
12	12	1262553	9	12	1417062	9
13	15	1532434	36	15	1786993	36
14	15	1522489	36	15	1779119	36
15	15	1527634	36	15	1774431	36
Suma	135	14060223	270	135	15911441	270
Promedio	9	937348,2		9	1060762,7	

Los ítems codificados se muestran en las siguientes figuras



Paceña 162S

Paceña 245Q

Paceña 240P



Cálculo del error de la concentración y sus límites de confianza

n = 15

m = 2

Grados de Libertad = 13

Nivel de Confianza= 95 %

$\alpha = 0,05$

$t_{\text{tabla}} = 2,16$

#### Concentración de IAA

Código	Réplica	Área Total	Área Prom.	Factor de Dilución	C <sub>IAA</sub> Prom. (mg/L)	S <sub>x0</sub>	±tS <sub>x0</sub>	Límite Inferior	Límite Superior
Paceña 162S	1	37757	37672	10	1,127	0,203	0,438	0,689	1,565
	2	37587							
Paceña 245Q	1	44992	44626,5	10	1,814	0,202	0,436	1,378	2,25
	2	44261							
Paceña 240P	1	115096	113627,5	10	8,63	0,196	0,423	8,207	9,053
	2	112159							

#### Concentración de THIAA

Código	Réplica	Área	Área Prom.	Factor de Dilución	C <sub>THIAA</sub> Prom. (mg/L)	S <sub>x0</sub>	±tS <sub>x0</sub>	Límite Inferior	Límite Superior
Paceña 162S	1	93226	92515	10	8,449	0,061	0,132	8,317	8,581
	2	91804							
Paceña 245Q	1	75498	76142	10	7,07	0,061	0,132	6,938	7,202
	2	76786							
Paceña 240P	1	114776	119291	10	10,705	0,061	0,132	10,573	10,837
	2	123806							

## ANEXO G. Cotizaciones

Metanol grado HPLC



Maquinaria y Materia Prima para la Industria \* Reactivos \* Material de Laboratorio \* Instrumentos de Ingeniería

La Paz, 30 de abril de 2019  
Laboratorio/lcc

### FACTURA PROFORMA No. IL-2273

Señores:

**UMSA - IIDEPROQ**

Presente.-

Por medio de la presente nos es grato ofrecerle, sin compromiso, los siguientes productos, según su Solicitud de Cotización:

Item	Cant.	Unid.	Código	Descripción del producto	Fecha Venc.	P. Unitario Bs.	P. Total Bs.
1	3	fco.	3430008	ALCOHOL METÍLICO METANOL P.A. (PARA HPLC) X 4 L	31/1/2023	665.00	1,995.00 *
<b>PRECIO TOTAL</b>							<b>1,995.00</b>

*NOTA: los ítems con (\*) requieren Autorización de Defensa Social. Nuestro registro es No. 2000-01100-905, los mismos serán entregados al cliente, siempre y cuando entregue la autorización de compra emitida por la D.G.S.C (en conformidad al cumplimiento del cap. V art. 27 del Reglamento de Operaciones con Sustancias Controladas y Precursores de uso Industrial) la cual evidencia conformidad con el registro de la empresa proveedora y el registro del usuario (en cumplimiento a la R.M. No. 0223/92)*

**"Los reactivos ofertados cuentan con Licencia para Actividades con Sustancias Peligrosas: Manejo de Importación (Ley del Medio Ambiente No.1333, Reglamento para Actividades con Sustancias peligrosas)".**

Acetonitrilo grado HPLC



Maquinaria y Materia Prima para la Industria \* Reactivos \* Material de Laboratorio \* Instrumentos de Ingeniería

La Paz, 25 de marzo de 2019  
Laboratorio/lcc

### FACTURA PROFORMA No. IL-2253

Señor:

**Ing. Cristhian Carrasco Villanueva Ph.D.**

**Proyecto "APLICACIONES DE LA TECNOLOGÍA NUCLEAR: DISMINUCIÓN DEL CONTENIDO DE SAPONINAS MEDIANTE TÉCNICAS DE MUTACIÓN RADIO-INDUCIDA DE SEMILLAS DE GRANOS ANDINOS: AMARANTO (AMARANTUS CAUDATUS) Y QUINUA (CHENOPODIUM QUINOA WILD)"**

Presente.-

Por medio de la presente nos es grato ofrecerle, sin compromiso, los siguientes productos, según su Solicitud de

Item	Cant.	Unid.	Código	Descripción del producto	P. Unitario Bs.	P. Total Bs.
1	1	fco.	3429001	Acetonitrilo para HPLC (Metilo Cianuro) x 4 l	2,775.00	2,775.00
<b>PRECIO TOTAL</b>						<b>2,775.00</b>

Octanol



**OBERON S.R.L.**

IMPORTACIONES Y REPRESENTACIONES

Insumos, Reactivos, Equipos Hospitalarios y Laboratorio

## PROFORMA COTIZACION

Nombre o Institución :		PROYECTO BIOPOLIMEROS A PARTIR DE BACTERIAS NATIVAS				
Responsable del Area:		ING. CRISTHIAN CARRASCO				
E-Mail:					CITE:	268
Teléfono(s):					Fecha:	02/04/2018
Dirección:		Campus universitario				
Item	Marca	Codigo	Descripción	Cant.	P.Unit. Bs.	P. Total Bs.
1			Metanol HPLC >99.9%		SIN EXISTENCIA	
2	SIGMA	439134-1L	ACETONITRILE CHROMASOLV HPLC GRADIENT GRADE, ≥99.9% Frasco de 1 Litro	1	3760,00	3760,00
3	SIGMA	112615-1L	1-Octanol Reagent Plus®, 99% Frasco de 1 Litro	1	2986.20	2986.20

Hidróxido de Potasio y Ácido Orto Fosfórico 85 %

**CORIMEX** LTDA.

Maquinaria y Materia Prima para la Industria \* Reactivos \* Material de Laboratorio \* Instrumentos de Ingeniería

La Paz, 15 de febrero de 2019  
Laboratorio/lcc

### FACTURA PROFORMA No. IL-2097

Señores:

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES**

Presente.-

Por medio de la presente nos es grato ofrecerle, sin compromiso, los siguientes productos, según su Solicitud de Cotización:

Item	Cant.	Unid.	Código	Descripción del producto	Fecha Venc.	P. Unitario Bs.	P. Total Bs.
1	1	fco.	3421001	Potasio Hidróxido p.a. x 1 kg	31/1/2023	390.00	390.00 *
2	2	fco.	3418005	Acido O-Fosfórico min. 85% p.a.x 1 l	30/4/2020	1,290.00	2,580.00
<b>PRECIO TOTAL</b>							<b>2,970.00</b>

*NOTA: los ítems con (\*) requieren Autorización de Defensa Social. Nuestro registro es No. 2000-01100-905, los mismos serán entregados al cliente, siempre y cuando entregue la autorización de compra emitida por la D.G.S.C (en conformidad al cumplimiento del cap. V art. 27 del Reglamento de Operaciones con Sustancias Controladas y Precursores de uso Industrial) la cual evidencia conformidad con el registro de la empresa proveedora y el registro del usuario(en cumplimiento a la R.M. No. 0223/92)*

## Ácido Cítrico monohidratado



**OBERON S.R.L.**

IMPORTACIONES Y REPRESENTACIONES

Insumos, Reactivos, Equipos Hospitalarios y de Laboratorio

## PROFORMA COTIZACION

Nombre de la Institución:		Proy.Biorrefinación de residuos de quinua a biopolímeros,biocombustibles avanzados y biofungicidas			CITE:	<b>944</b>	
Responsable del Area:		Cristhian Carrasco Villanueva Ph.D					
Unidad de Compras:							
Telf.(s):							
E-Mail:					Fecha	18/10/2019	
Dirección:		Campus Universitario					
ITEM	MARCA / PROVEEDOR	CODIGO	DESCRIPCION	PRESENT, CANTID.	PRECIO UNITARIO BS	TOTAL BS	
1	SIGMA ALDRICH	C1909-1KG	Ácido cítrico monohidrato Reactivo ACS, ≥99.0%	Frasco de 1 Kg	1	1.484,00	<b>1.484,00</b>
<b>TOTAL Bs.</b>						<b>1.484,00</b>	

## Consumibles del Cromatógrafo Shimadzu

### KIT de Bomba LC-20AD

- 1 SET DE PISTONES (2 UNIDADES)
- 1 SET DE DIAFRAGMAS (2 UNIDADES)
- 1 SET DE SEALS (2 UNIDADES)
- 1 FILTRO EN LINEA
- 1 VÁLVULA DE DRENAJE

-----  
TOTAL DEL KIT: \$US 2.506,35  
-----

### KIT DE AUTOSAMPLER SIL-20A

- 1 ROTOR LVP
- 1 PISTON
- 1 SEAL DE PISTON
- 1 SEAL DE AGUJA
- 1 ROTOR HPV
- 1 COBERTOR DE RINSE

-----  
TOTAL DEL KIT: \$US 1.555,23  
-----

TOTAL PUESTO EN TU LABORATORIO (INCLUYE FACTURA E IMPUESTOS DE LEY): \$US. 4.061,58

## Estándar IAA y THIAA



### PROFORMA

No.	Fecha
P-003387	10/6/2019

Señores  
DR. MARCELO MEDRANO

Presente.-

**Forma de Pago** : - Al contado, Vía Sigma, Vía Sigep  
- Cheque a nombre de IMPELAB S.R.L.  
- Depósito No de cuenta: 10000019109566 Banco Unión S.A.

**Valido Hasta** : 10/07/2019

**Tiempo de Entrega** : 60 días, previa Orden de Compra.

Item	Codigo	Producto	Descripcion	Cantidad	P.U.	Total
1	DCHA-Iso, ICS-I4	ICS-I4/ unit 250mg	[DCHA-Iso, ICS-I4] ICS-I4/ unit 250mg Una preparación purificada, semicristalina de ácidos trans-Iso- $\alpha$ en forma de sal dicitclohexilamina («DCHA»). Derivados del CO2 extraído y los ácidos $\alpha$ isomerizados del lúpulo. Presentación: unit 250mg Labor Veritas AG Zürich, Switzerland	1	2,610.00	2,610.00 Bs.
2	Tetra, ICS-T3	ICS-T3/ unit 250mg	[Tetra, ICS-T3] ICS-T3/ unit 250mg Tetra, ICS-T3 ICS-T3 es una preparación purificada de tetrahidroiso- $\alpha$ -ácidos que contienen isómeros cis y trans. presentación: unit 250mg Labor Veritas AG Zürich, Switzerland	1	2,610.00	2,610.00 Bs.
<b>Total Bs.:</b>						<b>5,220.00 Bs.</b>

## Columna Ascentis C18



### PROFORMA COTIZACION

Nombre de la Institución: UMSA - IIIDPROQ							
Responsable del Area: Dr. Carrasco							
Unidad de Compras:						CITE:778	
Nit:						Fecha: 31/07/2019	
Telf.(s): 62375439			E-Mail:			Fax:	
Dirección: campus UMSA							
Item	Marca	Codigo	Descripción - Codigo	Unid.	Cant.	P.Unit. Bs.	P. Total Bs.
1	Supelco	581325-U	<b>Ascentis® C18 HPLC Column 5 µm particle size, L × I.D. 25 cm × 4.6 mm</b> Características : grado de etiquetado 25% de carga de carbono parámetro ≤70 ° C temp. distancia Presión de 400 bar (5801 psi) aplicación (es) HPLC: adecuado cobertura de superficie 3,7 µmol / m 2 impurezas <5 ppm de metales matriz gel de sílice de alta pureza, esférico grupo activo de matriz Fase C18 (octadecilo) tamaño de partícula 5 µm tamaño de poro 100 Å área de superficie 450 m 2 / g rango de pH operativo 2 - 8 idoneidad adecuado para (Similar a Phenomenex Luna C18) adecuado para L1 por USP técnica de separación fase invertida	Pieza	1	9930,20	9930,20

## Precolumna

581372-U Supelco

### Ascentis® C18 Supelguard™ Guard Cartridge

5 µm particle size, L × I.D. 2 cm × 4 mm, pkg of 2 ea

eCI@ss 32110501 | MACRES SB.52



◆ SDS

Similar Products

SKU-Pack Size	Availability	Pack Size	Price (USD/EUR)
581372-U	✓ Estimated to ship on 11.01.21	2 ea	296.61 ★

To order products, please contact your local dealer. [Click here](#)

## ANEXO H. Estructura de costos

### Costos fijos

1. Mano de Obra : 800 Bs/mes
2. Fondo de acreditación: 500 Bs/mes
3. Mantenimiento del cromatógrafo líquido previo al análisis

#### 3.1. Consumo de Solventes previo al análisis

Solvente	Cantidad (mL)	Precio (Bs)
Eluyente A	314	47,10
Metanol	314	53,38
Acetonitrilo	295	203,55
	<b>Total</b>	<b>304,00</b>

#### 3.2. Consumo de energía eléctrica

Actividad	Tiempo (Horas)	Precio (Bs)
Uso Cromatógrafo líquido	2,5	2,16
Uso Pc	2,5	0,40
Uso Monitor	2,5	0,036
Uso Estabilizador	2,5	10,00
Uso UPS	2,5	1,68
Iluminación Laboratorio	2,5	1,08
Uso Equipo Evoqua	0,25	0,069
	<b>Total</b>	<b>15,40</b>

#### 3.3. Consumibles del cromatógrafo líquido

Detalle	Precio (Bs)
Uso Lámpara de deuterio para detector UV-VIS	4,30
Uso KIT de Bomba LC-20AD	30,80
Uso Kit de Autosampler SIL-20A	0,30
Uso Columna C18	66,20
Uso Precolumna	14,00
<b>Total</b>	<b>115,60</b>

#### 4. Mantenimiento del cromatógrafo líquido posterior al análisis

##### 4.1. Consumo de Solventes para limpieza

Solvente	Cantidad (mL)	Precio (Bs)
Solvente anti buffer	500	60,00
Metanol	49	8,33
Acetonitrilo	385	265,65
<b>Total</b>		<b>334,00</b>

##### 4.2. Consumo de energía eléctrica

Actividad	Tiempo (Horas)	Precio (Bs)
Uso Cromatógrafo líquido	38,60	33,35
Uso Pc	0,5	0,08
Uso Monitor	0,5	0,01
Uso Estabilizador	38,60	154,40
Uso UPS	38,60	25,94
Iluminación Laboratorio	0,5	0,22
<b>Total</b>		<b>214,00</b>

##### 4.3. Consumibles

Detalle	Precio (Bs)
Uso Lámpara de deuterio para detector UV-VIS	4,30
Uso Kit de Bomba LC-20AD	30,80
Uso Kit de Autosampler SIL-20A	0,30
Uso Columna C18	66,20
Uso Precolumna	14,00
<b>Total</b>	<b>115,60</b>

5. Uso de Guantes de Nitrilo: 3,60 Bs.

6. Consumo de agua potable: 0,60 Bs.

##### 7. Depreciación:

Equipo	Días de uso del equipo	Precio (Bs/Día)	Precio (Bs)
Cromatógrafo Líquido	5	127,60	638,00



## Costos variables para una muestra con dos réplicas

### 1. Preparación del eluyente "A"

#### 1.1. Consumo de energía eléctrica

Actividad	Tiempo (Horas)	Precio (Bs)
Uso Destilador	2	4,16
Uso Equipo Evoqua	0,25	0,07
Uso Bomba de vacío	2	0,30
	<b>Total</b>	<b>4,50</b>

#### 1.2. Reactivos

Reactivo	Cantidad	Precio (Bs)
Consumo de KOH (g)	28	10,92
Consumo ácido cítrico monohidratado (g)	11	16,28
Consumo Acetonitrilo (mL)	180	124,20
	<b>Total</b>	<b>151,40</b>

#### 1.3. Materiales

Material	Cantidad	Precio (Bs)
Uso de Filtros de membrana	2	26,80

### 2. Preparación de la muestra

#### 2.1. Consumo de energía eléctrica

Actividad	Tiempo (Horas)	Precio (Bs)
Uso del baño de Ultrasonidos (15 min/muestra)	3	0,24

#### 2.2. Reactivos

Actividad	Cantidad (mL)	Precio (Bs)
Consumo de Octanol (0,1 mL/muestra)	1,20	3,59

### 2.3. Materiales

Detalle	Cantidad	Precio (Bs)
Uso de Jeringas de 5 mL (1 Unidad/muestra)	12	28,80
Uso de Filtros de membrana (1 Unidad/ 4 muestras)	3	40,26
	<b>Total</b>	<b>69,06</b>

### 3. Análisis de la muestra en el Cromatógrafo

#### 3.1. Reactivos

Solvente	Consumo de Solventes por muestra (mL)	Volumen total (mL)	Precio (Bs)
Eluyente A	26	624	93,60
Metanol	27	648	110,16
Acetonitrilo	9	216	149,04
		<b>Total</b>	<b>352,80</b>

#### 3.2. Consumo de energía eléctrica

Actividad	Tiempo (Horas)	Precio (Bs)
Uso Cromatógrafo líquido	24	20,74
Uso Pc	24	3,84
Uso Monitor	24	0,35
Uso Estabilizador	24	96,00
Uso UPS	24	16,13
Iluminación Laboratorio	24	10,37
	<b>Total</b>	<b>147,40</b>

#### 3.3. Consumibles

Detalle	Precio (Bs)
Uso Lámpara de deuterio para detector UV-VIS	103,20
Uso Kit de Bomba LC-20AD	739,20
Uso Kit de Autosampler SIL-20A	7,20
Uso Columna C18	1588,80
Uso Precolumna C18	336
<b>Total</b>	<b>2774,40</b>

#### 4. Re-Calibración del método (para IAA y THIAA simultáneamente)

Niveles de Concentración:	5
Réplicas:	3
Cantidad Total de análisis:	15
Tiempo de análisis (Hora/muestra):	1

##### 4.1. Preparación eluyente A

###### Consumo de energía eléctrica

Actividad	Tiempo (Horas)	Precio (Bs)
Uso Destilador	2	4,16
Uso Equipo Evoqua	0,25	0,069
Uso Bomba de vacío	2,5	0,38
	<b>Total</b>	<b>4,60</b>

###### Uso de reactivos

Reactivos	Cantidad	Precio (Bs)
Consumo de KOH (g)	28	10,92
Consumo ácido cítrico monohidratado (g)	22	32,56
Consumo Acetonitrilo (mL)	360	248,40
	<b>Total</b>	<b>291,90</b>

###### Uso de materiales

Materiales	Cantidad	Precio (Bs)
Uso de Filtros de membrana	4	53,70

##### 4.2. Preparación de los estándares

###### Consumo de solventes

Solventes	Cantidad	Precio (Bs)
Metanol (mL)	200	34,00
Ácido Orto Fosfórico 85 % (mL)	0,10	0,129
Estándar IAA (mg)	5	52,20
Estándar THIAA (mg)	5	52,20
	<b>Total</b>	<b>138,50</b>

#### Uso de materiales

<b>Materiales</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Precio (Bs)</b>
Uso de Jeringas de 5 mL (1 Unidad/Nivel)	5	12,00
Uso de Filtros de membrana (1 Unidad/ 4 Niveles )	1,25	16,80
	<b>Total</b>	<b>28,80</b>

#### 4.3. Calibración del Cromatógrafo

##### Consumo de solventes

<b>Solvente</b>	<b>Consumo de Solventes por muestra (mL)</b>	<b>Volumen total (mL)</b>	<b>Precio (Bs)</b>
Eluyente A	26	390	58,50
Metanol	27	405	68,85
Acetonitrilo	9	135	93,15
		<b>Total</b>	<b>220,50</b>

##### Consumo de energía eléctrica

<b>Actividad</b>	<b>Tiempo (Horas)</b>	<b>Precio (Bs)</b>
Uso Cromatógrafo líquido	15	12,96
Uso Pc	15	2,40
Uso Monitor	10	0,14
Uso Estabilizador	15	60,00
Uso UPS	15	10,08
Iluminación Laboratorio	10	4,32
	<b>Total</b>	<b>89,90</b>

Se evaluó la influencia del fondo de acreditación en el precio unitario mediante la estructura de costos elaborada, la misma fue aplicada a distintas cantidades de muestras, los resultados se muestran en la siguiente tabla.

<b>Cantidad de muestras</b>	<b>Nº de Réplicas</b>	<b>Nº de inyecciones</b>	<b>Precio unitario con acreditación</b>	<b>Precio unitario sin acreditación</b>	<b>Diferencia (Bs)</b>
2	2	4	1777,30	1543,70	233,60
4	2	8	1024,20	907,30	116,90
6	2	12	773,10	695,20	77,90
8	2	16	647,60	589,20	58,40
9	2	18	605,70	553,80	51,90
10	2	20	572,30	525,50	46,80
11	2	22	544,90	502,40	42,50
12	2	24	522,10	483,10	39,00

## ANEXO I. Rango de IAA para diferentes estilos de cervezas

En la siguiente tabla se expone la concentración aproximada de Iso- $\alpha$ -ácidos para las distintas variedades de cerveza según Chris Smart, *The craft brewing handbook* (2019).

Tipo de Cerveza	Iso – $\alpha$ - ácidos aproximado (mg / L)	C Promedio (mg / L)	Concentración esperada posterior a dilución (mg / L)
Pilsener alemana	25 - 50	38	7,6
Pilsener americana	25 - 40	33	6,6
Pilsener Bohemia	30 - 45	38	7,6
Altbier	25 - 50	38	7,6
Barley wine	80	80	16
Bitter pale ale	20 - 35	28	5,6
Bock	20 - 30	25	5
Brown ale	15 - 35	25	5
Dunkel	15 - 30	23	4,6
Hefeweissen	10 - 20	15	3
Imperial stout	40 - 90	65	13
India pale ale	40 - 70	55	11
Irish stout	30 - 50	40	8
Kölsch	20 - 30	25	5
Lager americana	8 - 18	13	2,6
Mild	15 - 25	20	4
Oatmeal stout	25 - 40	33	6,6
Old ale	15 - 75	45	9
Pale ale americana	25 - 45	35	7
Pilsener Checa	30 - 45	38	7,6
Porter	20 - 45	33	6,6
Red ale	25 - 35	30	6
Schwarzbier	20 - 35	28	5,6
Scotch ale	10 - 35	23	4,6
Sweet milk stout	15 - 25	20	4

A partir de esta información se calculó la concentración promedio y un factor de dilución adecuado para que los valores de concentración resultantes se ajusten al rango de trabajo definido en el estudio de validación, es por ello que se aplicó un factor de dilución de 5, con la excepción de la cerveza Barley wine al que debe aplicarse otro factor.