

## **Métodos ópticos en el análisis fisicoquímico del tepache**

Jiménez Rosales José Luis, Vergara López Jesús Francisco, Ruiz Chincoya Luis Fernando, Hernández Calva Adriana\*

Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Facultad de Ciencias Químicas, Departamento de Química Analítica, Av. San Manuel, Senda Química, Ciudad Universitaria, 72570 Puebla, Pue.

adriana.hernandez.calva@gmail.com

### **Recibido:**

13/mayo/2018

### **Aceptado:**

15/septiembre/2018

### **Palabras clave:**

Refractometría,  
Fermentación,  
Concentración

### **Keywords:**

Refractrometry,  
Fermentation,  
Concentration

### **RESUMEN**

En este trabajo se presentan los resultados preliminares en el seguimiento de la fermentación del tepache, proyecto que se llevó a cabo con la finalidad de entender los fundamentos del análisis espectrofotométrico y elegir la técnica adecuada para cuantificar e identificar el analito de interés, desarrollando la capacidad para la interpretación y correlación de la información obtenida según la técnica empleada. En este caso en particular nos enfocamos en las técnicas de refractometría y polarimetría, debido a su aplicación en el campo de alimentos, especialmente para determinar la calidad en bebidas fermentadas. El análisis nos permitió corroborar que la concentración alcohólica en la bebida fermentada depende directamente de la cantidad de azúcar que se adiciona en la mezcla al inicio y del tiempo de maduración, y como consecuencia como se ven afectadas las propiedades físicas como la densidad, sabor, color, y aroma.

### **ABSTRACT**

This paper presents the preliminary results in the monitoring of fermentation of the tepache, project that took place in order to understand the fundamentals of the Spectrophotometric analysis, and choose the proper technique to quantify and identify the analyte of interest, developing the capacity for interpretation and correlation of information obtained according to the technique employed. We focus on the refractometry and polarimetry, due to its application in the field of food. We assure that the alcohol concentration in fermented drink depends directly on the amount of sugar that is added in the mix at the beginning, and the time of maturation, as a result as the physical density, flavor, color, and aroma properties are affected.

## Introducción

El análisis espectrofotométrico es ampliamente utilizado en diversos campos desde alimentos, ciencias de la salud, hasta materiales para la determinación cualitativa y cuantitativa de las propiedades físicas, químicas y biológicas que se puedan medir en el analito de interés. (Skoog *et al.*, 2014; Gary, 2009; Harris 2001) Además de ser la herramienta clave para dilucidar estructuras moleculares, intermediarios de reacción etc., por lo que se considera indispensable el conocimiento y manejo de las técnicas analíticas instrumentales como: refractometría, polarimetría, colorimetría, espectroscopía, entre otras, también conocidas como métodos ópticos debido a que se basan en la forma de interacción entre la luz y la materia dando lugar a ciertos fenómenos como: reflexión, refracción, difracción, adsorción, etc. (Kolthoff, 1956; Maier, 1981). En este trabajo se presentan los resultados obtenidos en el análisis fisicoquímico de una de las bebidas fermentadas más populares en México desde la época prehispánica (bebida de maíz martajado), el Tepache, con apariencia semejante a la cerveza, pero con sabor dulce consecuencia de su forma de elaboración la cual, se lleva a cabo comúnmente con: piloncillo o azúcar, agua, pulpa y cáscara de piña, a temperatura ambiente. El contenido de alcohol y el sabor depende de la cantidad de azúcares en la mezcla y del tiempo de fermentación en el que suceden tres fermentaciones: láctica, alcohólica y acética (Voet *et al.*, 2007), que se detallan en las (Figura 1 y 2)

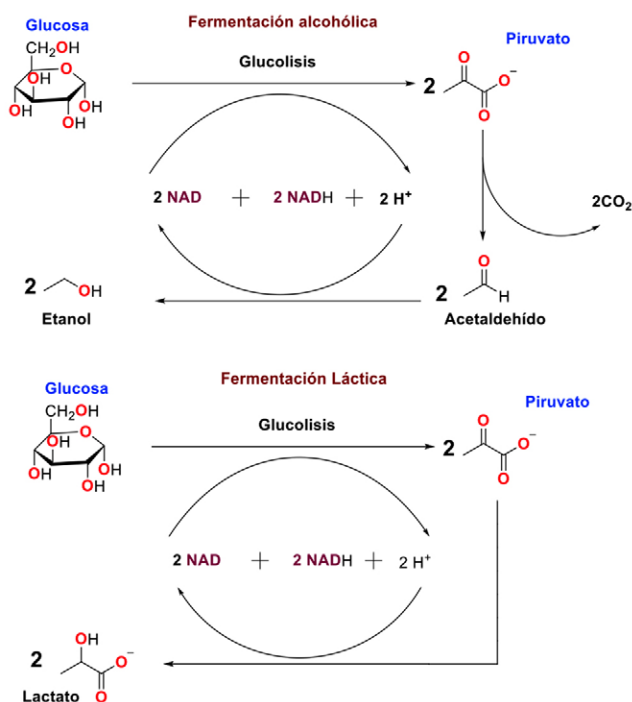


Figura 1. Fermentación alcohólica y láctica.

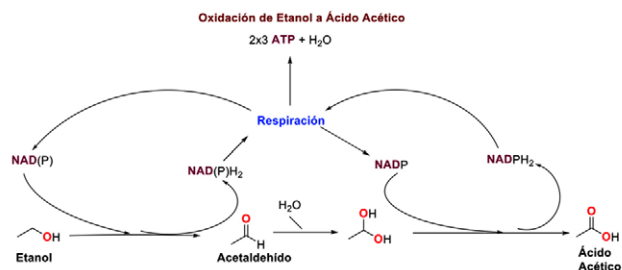


Figura 2. Oxidación alcohólica.

El análisis del Tepache se realizó utilizando las técnicas de:

Refractometría, la cual se basa en el cambio de velocidad que experimenta la radiación electromagnética REM al pasar de un medio a otro, ambos de densidad diferente (composición química diferente), provocando cambio en la dirección de propagación de la REM. La técnica se fundamenta en un rayo de luz que pasa oblicuamente desde un medio hacia otro de diferente densidad, cambiando su dirección cuando traspasa la superficie. Además, cuando el segundo medio es más denso que el primero, el rayo se aproxima a la perpendicular trazada sobre la superficie divisoria en el punto de incidencia. El ángulo formado entre el rayo en el primer medio (rayo incidente) y la perpendicular (línea normal) se llama ángulo de incidencia  $\theta_i$ , mientras que el correspondiente ángulo en el segundo medio se denomina ángulo de refracción  $\theta_r$ . El índice de refracción,  $n$ , es la razón entre las velocidades de la REM en ambos medios (Figura 3). La ley de Snell representa a este índice como la razón de los senos del ángulo de incidencia y de refracción (Ec. 1).

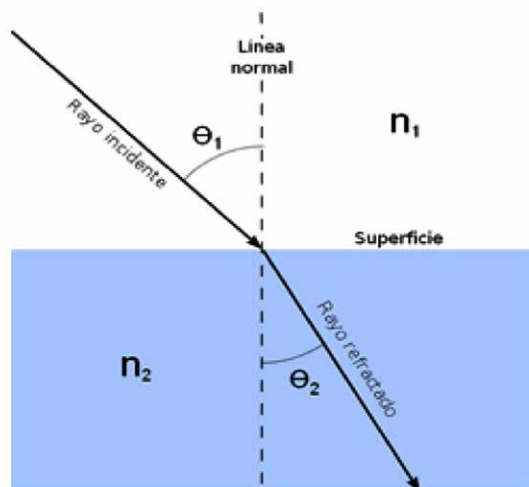


Figura 3. Ley de Snell.

$$n_1 \cdot \text{sen} \theta_1 = n_2 \cdot \text{sen} \theta_2 \quad (1)$$

Al mismo tiempo la refractometría es un método indirecto para la determinación de la concentración de azúcar (°Brix) de un mosto mediante el índice de refracción  $n$  (Figura 4).

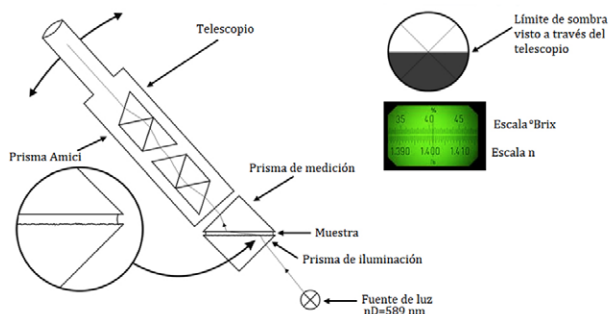


Figura 4. Constitución del Refractómetro ABBE.

Cuanto mayor sea la concentración de los azúcares °Brix de un mosto, más denso será éste y menor la velocidad de la luz que lo atraviesa, provocando un cambio en el  $n$ . Estableciendo la relación entre la concentración de azúcar °Brix y el  $n$  en el intervalo de 15-25 °Brix, para lo cual existen ya valores estandarizados para realizar los cálculos necesarios (Ec. 2-4).

$$n = (0,00166 \times \text{°Brix}) + 1,33063 \quad (2)$$

$$\text{°Brix} = (600,90502 \times n) - 799,58215 \quad (3)$$

$$\% \text{ vol Alcohol} = (0,6757 \times \text{°Brix}) - 2,0839 \quad (4)$$

Además al realizar las determinaciones de la densidad del analito por el método del picnómetro es posible calcular la refracción específica de Lorentz - Lorenz (Ec. 5).

$$r = (1/\rho)((n^2-1)/(n^2+2)) \quad (5)$$

Polarimetría, de acuerdo con la teoría ondulatoria la luz natural tiene un componente un eléctrico y otro magnético que se propagan en el espacio en planos perpendiculares en la misma dirección, pasando infinitos planos por una línea de propagación. Sin embargo, cuando un haz de luz atraviesa un polarizador se selecciona un solo plano (una sola dirección) del haz de luz con un ancho de banda estrecha eliminando todos los componentes cuyas vibraciones no se producen en el plano de polarización (luz polarizada), además sí solo se polariza una determinada longitud de onda, se obtiene luz monocromática polarizada que al interactuar con una sustancia ópticamente activa cambiará el ángulo de polarización del haz de luz (Figura 5).

La capacidad de hacer girar el plano de polarización es una propiedad intrínseca de una molécula ópticamente activa, considerando la Ley de Biot, se puede calcular la

rotación específica o capacidad rotatoria específica del analito (Ec. 6).

$$[\alpha]_{\lambda}^T = \alpha/lc \quad (6)$$

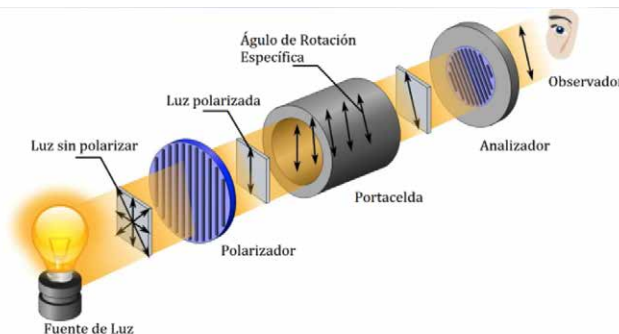


Figura 3. Componentes del Polarímetro.

El análisis se llevó a cabo en un refractómetro ABBE, Atago 1T-Líquidos,  $n_D=589 \text{ nm}$ , y un Polarímetro POLAX-2X, Atago, complementando el estudio con potenciometría (SevenMulti™ S47, Mettler Toledo).

La concentración de azúcar en el mosto de piña y en la mezcla, se determinaron por refractometría, según transcurrieron los días de fermentación. Permitiendo al mismo tiempo calcular la concentración alcohólica en la mezcla en dependencia del tiempo de fermentación y de la cantidad de azúcares utilizados. La cantidad de sacarosa y glucosa presentes en la bebida fermentada, se determinó mediante Polarimetría. Finalmente se relacionaron los cambios observados en la mezcla con la variación del pH.

### Desarrollo

Para la elaboración de Tepache con el mayor grado de alcohol se colocaron en un recipiente 1500 g de piña con cáscara en trozos pequeños, adicionando 3 litros de agua, 750 g de piloncillo y 0.01 g de canela, la mezcla se dejó reposar por 240 horas a temperatura ambiente tomando alícuotas del analito cada 24 horas para dar seguimiento al proceso de fermentación, durante el cual también se monitoreo el cambio en la densidad y en el pH, así como el cambio en la apariencia (color, olor, etc).

Para el análisis cuantitativo por refractometría se utilizó el método de patrón externo para la determinación del % v/v de Etanol en la bebida fermentada, a partir de una curva de calibración de Alcohol Etilico al 96% Merck, realizando al mismo tiempo las mediciones correspondientes a los °Brix para cada concentración, valores que permitieron calcular los valores teóricos a partir de las ecuaciones 2-3 a 25 °C (Tabla 1).

En el análisis del Tepache los datos experimentales obtenidos durante el tiempo de fermentación de la bebida contra los datos obtenidos de las soluciones estándar evidencian el incremento en la concentración del porcentaje de Etanol en la bebida (Gráfica 1) observándose que al transcurrir el tiempo de fermentación el índice de refracción es modificado debido a la variación en las concentraciones de glucosa, fructosa y etanol en la bebida, efecto que fue corroborado con el cambio en la densidad, además de las variaciones en los valores obtenidos de pH en cada alícuota medida.

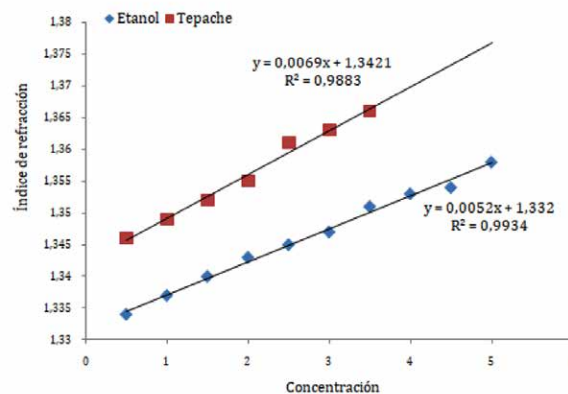
Los valores experimentales de los °Brix obtenidos en la bebida fermentada se presentan en la Gráfica 2 acompañados de los valores de los °Brix en las soluciones de Alcohol Etilico como estándar externo, observándose que al incrementar el grado de alcohol en la bebida también incrementan los °Brix. En el caso de la relación entre los °Brix y el índice de refracción se considera que son directamente proporcionales, ya que conforme disminuye la cantidad de azúcar disminuyen los grados Brix, disminuye el índice de refracción y viceversa, en el caso de la disminución del índice de refracción al mismo tiempo disminuye la densidad, ya que también son directamente proporcionales (Gráfica 3).

Además sí consideramos que la velocidad con la que un rayo de luz atraviesa un medio depende de la densidad del medio, cuando menos denso sea el medio la velocidad del rayo de luz incrementará.

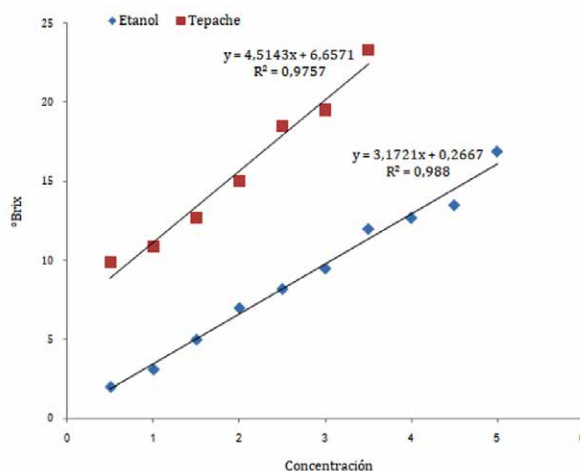
La disminución del pH hacia valores más ácidos evidencia al mismo tiempo las transformaciones químicas que están sucediendo durante la madurez de la bebida (Tabla 2).

**Tabla 1.** Datos de experimentales obtenidos para el patrón externo.

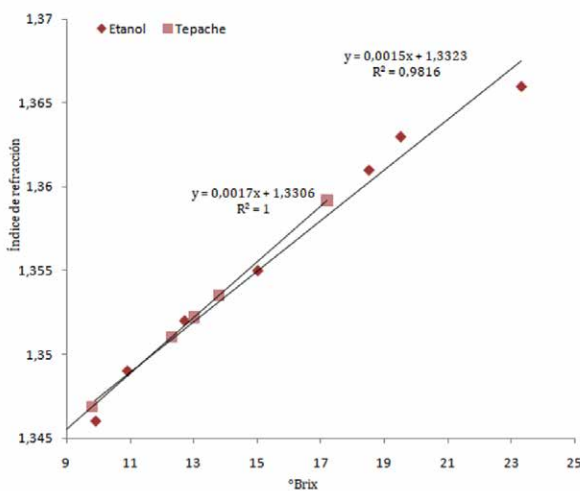
Etanol mL	°Brix experimental	°Brix Teórico	n Experimental	n Teórico
0,5	0,12	2,025	1,334	1,33
1	3,1	3,827	1,337	1,335
1,5	5,0	5,63	1,340	1,338
2	7,0	7,433	1,343	1,342
2,5	8,2	8,635	1,345	1,344
3	9,5	9,83	1,347	1,346
3,5	12	12,27	1,351	1,35
4	12,7	12,84	1,352	1,351
4,5	13,5	14,04	1,354	1,353
5	15,9	16,44	1,358	1,358



**Gráfica 1.** Datos de índice de refracción de Etanol (estándar) contra datos del Tepache durante el tiempo de fermentación.



**Gráfica 2.** Valores °Brix del Alcohol Etilico contra °Brix del Tepache durante el tiempo de fermentación.



**Gráfica 3.** Correlaciones entre el índice de refracción y grados brix.

**Tabla 2.** Variación del pH durante el tiempo de maduración

Tiempo	pH
48	4,5
72	3,69
96	3,5
168	3,4
192	3,2
216	2,9
240	2.5

Los datos anteriores fueron utilizados para conocer la cantidad aproximada de etanol presente en el Tepache durante el tiempo de fermentación (Tabla 3).

**Tabla 3.** Cantidad aproximada de etanol presente en el Tepache.

Horas de fermentación	n	°Brix	% v/v EtOH	EtOH mL
48	1,346	9,9	2,6923	0,2692
72	1,349	10,9	3,2692	0,3269
96	1,352	12,7	3,8461	0,3846
168	1,355	15	4,4230	0,4423
192	1,361	18,5	5,5769	0,5576
216	1,363	19,5	5,9615	0,5961
240	1,366	23,3	6,5384	0,6538

Para el análisis por polarimetría se realizó una curva de calibración con Sacarosa al 99% Merck, los valores obtenidos (Tabla 4, Gráfica 4) fueron comparados con los valores observados en el Tepache, corroborándose en el caso del Tepache la disminución en la concentración de azúcar conforme incrementaron las horas de fermentación, observándose valores muy bajos de grados Brix cuando transcurrieron 192 horas de fermentación (Tabla 5).

**Tabla 4.** °Brix y Ángulos de rotación obtenidos por polarimetría para las soluciones estándar de Sacarosa.

Concentración Sacarosa	Ángulo de rotación	°Brix
15	0,6	1,7
14	0,45	1,3
13	0,3	0,9
12	0,25	0,7
11	0,1	0,3
10	0,005	0,1

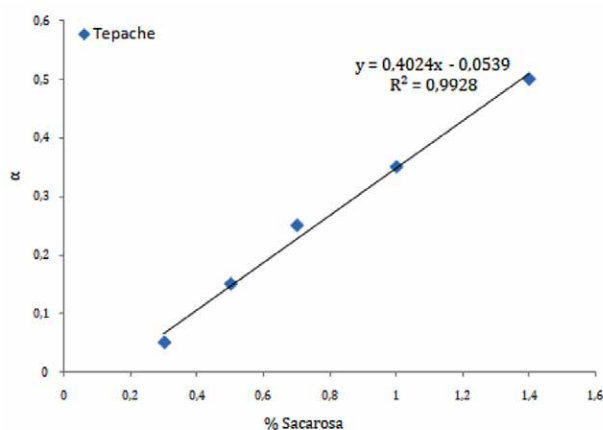
Para realizar el análisis del Tepache por Polarimetría

debido a la turbidez de la bebida se hicieron disoluciones al 11.6 % en todos los casos, determinándose también la densidad de esas disoluciones.

**Tabla 5.** °Brix y Ángulos de rotación obtenidos por polarimetría para el Tepache.

Horas de fermentación	°Brix	Ángulo rotación
48	1,4	0,5
72	1	0,35
96	0,7	0,25
168	0,5	0,15
192	0,3	0,05

Los valores obtenidos de ángulo de rotación respecto a la concentración de sacarosa presente en la muestra indican que a mayor ángulo de rotación mayor concentración (Gráfica 4).



**Gráfica 4.** Relación del porcentaje de sacarosa respecto al ángulo de rotación.

### Conclusiones

Se corroboró que la concentración alcohólica en la bebida fermentada depende directamente de la cantidad de azúcar que se adiciona en la mezcla al inicio y del tiempo de maduración, con lo cual, se ven directamente modificadas las propiedades físicas de la bebida, como: el color el cual cambia de café a ámbar, el aroma de dulce y suave a agrio y fuerte, el sabor de dulce a amargo. En esta investigación se observaron concentraciones alcohólicas altas a causa de que la bebida era rica en azúcares debido a la gran cantidad de piloncillo utilizado en la preparación, lo cual fue corroborado cuando se preparó nuevamente la bebida variando las cantidades de piloncillo, efecto que se reflejó en las densidades observadas y en el pH medido

durante el seguimiento de la fermentación. En el caso particular de la polarimetría se utilizó para determinar la concentración de sacarosa en la bebida. Con base a lo anterior las técnicas empleadas nos permitieron entender sus fundamentos y al mismo tiempo desarrollar la habilidad en su manejo e interpretación de los resultados, los cuales fueron dependientes de la densidad y turbidez que presentó el analito, así como de la temperatura en la que se llevó a cabo el análisis, adicionalmente desarrollamos actitudes positivas hacia el trabajo en equipo.

## Referencias

Gary D. Christian. (2009). *Química Analítica* 6ª Ed. McGraw-Hill Education, p. 457.

Harris, C.D.: (2001). *Quantitative Chemical Analysis* 2<sup>da</sup> Ed. Reverté, p. 499.

Maier, Hans G. (1981). *Métodos modernos de análisis de alimentos* Tomo I. Ed. Acribia. Zaragoza.

Skoog, D., West, D., Holler, F., Crouch, S. (2014). *Skoog and West's: Fundamentals of Analytical Chemistry*. 9ª Ed. Cengage Learning, p. 658.

Kolthoff, I.M. (1956). Instrumental Methods in Analytical Curricula. *J. Chem. Ed.* 423-424.

Voet, D., Voet, J.G., Pratt, C.W. (2007). *Fundamentos de Bioquímica Metabólica*. 2<sup>da</sup> Ed. Tebar, S.L. Madrid.