

***UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO***

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Título:

**Implementación de un método por espectroscopia Raman para la
detección de compuestos organolépticos del tequila.**

Proyecto de tesis para obtener el título de:

Ingeniero Químico

PRESENTAN

**ALEJANDRO SANTILLAN CARMONA
MARCO ANTONIO PEREZ GARCIA.**

Directores de tesis

**Dra. Josefina Barrera Cortés
Dr. Miguel Ángel Meléndez Lira.**

Fecha: 30 de Noviembre del 2006.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo de investigación fue realizado en los departamentos de Biotecnología, Bioingeniería y Física del Centro de Investigaciones y estudios Avanzados del I.P.N (CINVESTAV). Bajo la dirección de los Doctores Josefina Barrera Cortés Y Miguel Ángel Meléndez Lira.

Investigación financiada parcialmente mediante el proyecto 432035-Z en el convenio SEP-CONACYT.

Jurado:

Presidente Q. F. I. Ma. del Carmen Niño de Rivera Oyarzabal

Vocal Dra. Josefina Barrera Cortés

Secretario Dr. Miguel Ángel Meléndez Lira

Suplente I. Q. Juan Carlos Prieto López

Suplente Biol. Guillermo González Martínez

AGRADECIMIENTOS

- A los responsables del CINVESTAV el jefe del departamento y la directora del centro que nos han facilitado el acceso a parte del material y recursos empleados para realizar el trabajo de investigación.
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) que financió parcialmente la investigación ya que con su aportación ha hecho esto posible.
- A el M en C. Melchor Arellano Plaza por su aportación con los reactivos químicos, conocimientos y por destinar su tiempo a la realización de este proyecto.
- A Maria Teresa Rodríguez Casasola por sus consejos y apoyo técnico además de inyectar continuamente ese espíritu de trabajo y superación personal.
- A nuestros padres como un testimonio de gratitud, por el apoyo que siempre se nos ha brindado y con el cual hemos logrado terminar. El Sr. Alfonso Santillán Ávila, la Sra. Ma. Guadalupe Carmona Becerril. El Sr. Antonio Pérez López, La Sra. Cecilia García Gómez.
- A nuestros Maestros, por su ferviente colaboración en hacer de nosotros mejores profesionistas
- A nuestra familia por servir como el soporte de los momentos difíciles.
- A nuestros amigos por su apoyo incondicional en cada momento desde que empezamos este sueño.

1. INTRODUCCION.....	1
1.1 Objetivo.....	1
2. GENERALIDADES.....	2
2.1 Supervisión y control de procesos bioquímicos.....	2
2.1.1 Monitoreo fuera de línea (off- line).....	3
2.1.2 Monitoreo sobre línea (on- line).....	3
2.1.3 Monitoreo en línea (in- line).....	3
2.2 Métodos analíticos por espectroscopia.....	3
2.2.1 Luz visible y ultravioleta.....	3
2.2.2 Absorción infrarroja.....	3
2.2.3 Absorción de microondas.....	4
2.2.4 Absorción atómica.....	4
2.2.5 Absorción de rayos X.....	4
2.2.6 Llama.....	4
2.2.7 Difracción de rayos X.....	4
2.2.8 Dispersión óptica rotatoria.....	4
2.2.9 Dicroísmo circular.....	4
2.2.10 Raman.....	4
2.3 Fundamentos de la espectroscopia Raman.....	5
2.3.1 Sistema de medición por espectroscopia Raman.....	5
2.3.1.1 Fuentes de energía radiante.....	5
2.3.2 Láser.....	6
2.3.2.1 Generador de radiación.....	6
2.3.2.2 Ancho de banda.....	7
2.3.3 Filtros.....	8
2.3.4 Monocromadores.....	9
2.3.4.1 Interferencias en espectroscopia Raman.....	10
2.3.4.1.1 Shot.....	10
2.3.4.1.2 Muestral.....	10
2.3.4.1.3 Instrumental.....	10
2.3.4.1.4 Computacional.....	10
2.3.4.1.5 Fuentes externas.....	10
2.3.5 Recipientes para muestras.....	10
2.3.6 Convertidor de energía radiante a eléctrica.....	11
2.4 TEQUILA.....	11
2.4.1 Fermentación alcohólica.....	13
2.4.2 Proceso reproducción del Tequila.....	13
3. MATERIALES Y METODOS.....	15
3.1 Equipo Raman y accesorios.....	15
3. Reactivos.....	15
3.3 Método de obtención de espectros Raman.....	16
3.3.1. Alineación de dispositivo de captación de luz Raman.....	16
4. RESULTADOS.....	18

4.1 Alineación del dispositivo de captación de luz Raman.....	17
4.2 Espectro Raman de alcohol etílico grado analítico.....	19
4.3 Espectro Raman de alcohol etílico a diferentes concentraciones.....	19
4.4 Espectros Raman de soluciones de etanol en agua del 5 al 1%.....	24
4.5 espectros Raman de los compuestos organolépticos puros.....	26
4.6 Espectros Raman de los compuestos organolépticos a bajas concentraciones.....	31
5. ANALISIS DE RESULTADOS.....	36
5.1 Análisis de los espectros Raman de etanol.....	33
5.2 Análisis de los espectros Raman para los compuestos organolépticos.....	40
6. CONCLUSIONES.....	42
TABLA DE ABREVIATURAS.....	43
BIBLIOGRAFIA.....	44

INDICE DE FIGURAS

2.1 Sistema de control de un intercambiador de calor.....	3
2.2 Componentes de una fuente láser	6
2.3 Proceso de bombeo (excitación mediante energía eléctrica).....	7
2.4 Proceso para el funcionamiento de un láser (emisión espontánea).....	7
2.5 Señal de salida de un selector de longitud de onda típico.....	8
2.6 Esquema de la selección transversal de un filtro de interferencia.....	8
2.7 Anchuras de banda efectiva para dos tipos de filtros.....	9
2.8 Esquemas de la trayectoria de luz a través de una fibra óptica.....	11
3.1 Diagrama del dispositivo de incidencia del rayo láser y recolección de la dispersión Raman de una muestra líquida.....	17
3.2 espectro del rayo láser (dispersión Rayleigh), obtenido con una fuente láser de argón de 5 Watts a 488 nm.....	17
4.1 Espectro Raman del tetracloruro de carbono.....	18
4.2 Espectro Raman del tetracloruro de carbono excitado con un láser de 488 nm.....	18
4.3 Espectro raman del etanol grado analítico.....	19
4.4 Espectro del etanol al 90%.....	20
4.5 Espectro del etanol al 80%.....	20
4.6 Espectro del etanol al 70%.....	20
4.7 Espectro del etanol al 60%.....	21
4.8 Espectro del etanol al 50%.....	21
4.9 Espectro del etanol al 40%.....	22
4.10 Diagrama del dispositivo equipado con un objetivo de microscopio y un contenedor para los recipientes de vidrio.....	21
4.11 Espectro del etanol al 30%.....	23
4.12 Espectro del etanol al 20%.....	23
4.13 Espectro del etanol al 10%.....	24
4.14 Espectro del etanol al 1%.....	25
4.15 Espectro del etanol al 3%.....	25
4.16 Espectro del etanol al 5%.....	26
4.17 Espectro del acetato isoamílico.....	26
4.18 Espectro del acetato metílico.....	27
4.19 Espectro del acetato de etilo.....	27
4.20 Espectro del 2-feniletanol.....	28
4.21 Espectro del lactato de etilo.....	28
4.22 Espectro del 2-etil-1-butanol.....	29
4.23 Espectro del 3-metil-1-butanol.....	29
4.24 Espectro del 1-propanol.....	30
4.25 Espectro del isobutanol.....	30
4.26 Espectro del 2-propanol.....	31
4.27 Espectro del metanol.....	31
4.28 Espectro del 2-furaldehido 1%.....	32

4.29 Espectro del acetato metílico 1%.....	33
4.30 Espectro del 2-propanol 1%.....	33
4.31 Espectro del metanol 1%.....	34
4.32 Espectro del Isobutanol 3%.....	34
4.33 Espectro del 2-propanol 3%.....	35
4.34 Espectro del metanol 3%.....	35
5.1 Espectro del etanol a diferentes concentraciones.....	36
5.2 Relación de altura de los picos a 526 nm y concentraciones (% v/v).....	38
5.3 Curva de calibración del etanol utilizando las alturas de los picos.....	38
5.4 Obtención de las diferencias de las alturas.....	39
5.5 Curva de calibración del etanol utilizando diferencias de alturas.....	39
5.6 Comparación de los espectros al 3% p/p.....	41
5.7 Comparación de los espectros al 1% p/p.....	41

INDICE DE TABLAS

4.1 Volúmenes del etanol y agua utilizados para preparar soluciones de alcohol étílico en el rango 10-90%.....	19
4.2 Soluciones de 4 ml en contenedores de fondo plano.....	24
4.3 Pruebas de miscibilidad para soluciones de 2000 mg.....	32
5.1 Posición de los picos Raman del etanol para las figuras 4.3 y 4.4.....	36
5.2 Alturas contra concentración.....	38
5.3 Deltas contra concentraciones.....	39
5.4 Posiciones de los dos picos más representativos (mayor altura) para los componentes organolépticos del tequila.....	40

1. INTRODUCCIÓN

El crecimiento del mercado a nivel mundial, ha demandado el desarrollo de tecnologías competitivas enfocadas a la automatización de procesos, con el objetivo de incrementar tanto producción como calidad del producto. En este trayecto, el trabajo ha sido fuertemente apoyado por el acelerado desarrollo tecnológico en el campo de la electrónica. No obstante, ésta solo ha sido aplicada exitosamente en las industrias metalmeccánica, electrónica, comunicación y automotriz. En las industrias dedicadas a la manipulación de seres vivos (microorganismos, células vegetales, células animales, etc), el desarrollo tecnológico está supeditado al previo conocimiento de las reacciones metabólicas que determinan su ciclo de vida (microorganismos, células vegetales, células animales, etc), así como a la disponibilidad de sensores que permitan el monitoreo en línea de todos los compuestos involucrados en los procesos metabólicos.

La automatización de procesos involucra el desarrollo de modelos de proceso, modelos de control, así como de tecnologías para monitorear las variables estrechamente relacionadas con la dinámica del proceso. En el caso de los procesos biológicos, las tareas de automatización solo han sido dirigidas a controlar el medio ambiente de los seres vivos involucrados. Esta estrategia parte de la suposición de que si un ser vivo está en un medio ambiente adecuado a su crecimiento, se asegura tanto el crecimiento de la población, así como la producción de los productos intermedios y finales de interés comercial.

1.1 Objetivo

En el presente proyecto de investigación se ha propuesto implementar un método que permita monitorear los principales compuestos que determinan las características organolépticas del Tequila 100% Agave Azul, es decir, los compuestos organolépticos. Se ha reportado que la expresión de compuestos organolépticos está determinada por la composición del medio de cultivo, con relación a la glucosa y ácidos grasos, principalmente. Para estudiar el efecto de la variación de estos compuestos se sugiere utilizar la tecnología RAMAN, considerando que es una técnica confiable y reproducible que permite identificar sustancias a través de la captación de los modos vibracionales y rotaciones de sus moléculas. Comúnmente el análisis de compuestos organolépticos ha sido realizado mediante métodos cromatográficos. Sin embargo, el largo procedimiento experimental que éstos demandan (purificación de compuestos) restringe su aplicación para un monitoreo en tiempo real.

2. GENERALIDADES

2.1 Supervisión y control de procesos bioquímicos

Un proceso bioquímico es aquel dedicado al cultivo de microorganismos con el objetivo de producir células o algún metabolito de interés comercial tal como el alcohol, fármacos, polímeros, etc (biomasa = células y/o metabolitos). El interés de controlar los procesos bioquímicos es debido a la fuerte interrelación entre variables de operación (temperatura, pH, nivel de oxígeno disuelto y velocidad de agitación) y su sensible efecto en la producción de biomasa. La tarea de control consiste en comparar el valor real de la variable de control respecto de un valor de punto de ajuste y realizar una acción orientada a disminuir la diferencia entre los valores observado y deseado. Un sistema de control está conformado por el proceso a controlar, elementos de medición, un controlador y los elementos de control (figura 1).

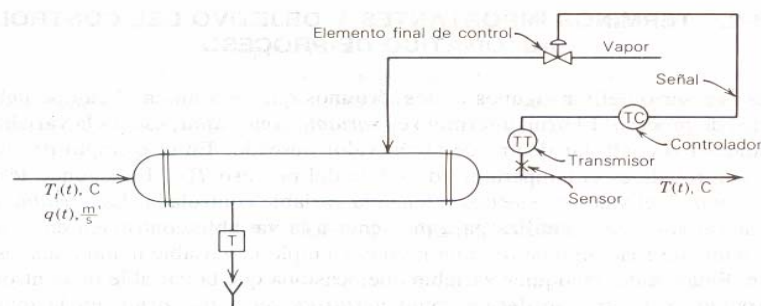


Fig.2.1 Sistema de control de un intercambiador de calor

En los procesos bioquímicos, los elementos de medición convencionales disponibles solo permiten monitorear las variables de operación del proceso (medio ambiente del microorganismo): temperatura, pH, oxígeno disuelto y presión. En el caso de la biomasa, su monitoreo se realiza mediante métodos analíticos, previo tratamiento fisicoquímico de muestras de mosto¹ (electroforesis², aplicada a la determinación de proteínas). Dado las largas horas de trabajo experimental involucrado en estos análisis, es de interés el desarrollo de tecnologías para el monitoreo en línea de biomasa.

Para propósitos de control de procesos, el monitoreo puede realizarse fuera de línea (off-line) o en línea (on-line).

2.1.1 Monitoreo fuera de línea (off-line)³

Se dice que el monitoreo es fuera de línea cuando los sensores no están en contacto directo con el proceso. Usualmente una muestra del material procesado es llevado al laboratorio para su análisis. Las acciones de control son realizadas en base a los resultados de éste.

¹ Mosto: medio de cultivo fermentado

² Electroforesis: Método de separación que se basa en la diferente velocidad de las especies cargadas por medio de un potencial de corriente eléctrica

³ CIATEJ “Ciencia y tecnología del Tequila Avances y Perspectivas”, Guadalajara México, 14-115, 2004.

2.1.2 Monitoreo sobre línea (on-line)

Los sensores de las variables de operación están en contacto directo con el proceso, como por ejemplo un sensor de temperatura con un termopar y una pantalla donde se despliegue el valor de la temperatura para que se pueda visualizar de manera continua, pero sin embargo la información generada solo sirve para que el operador del proceso tome alguna decisión de corrección si es necesario.

2.1.3 Monitoreo en línea (in-line)

Los sensores en línea también están en contacto con el proceso pero la variable de salida esta disponible para que se realice además el control de la variable.

2.2 Métodos analíticos por espectroscopia⁴

La espectroscopía es una tecnología no destructiva que consiste en hacer incidir un haz de luz en una molécula con el fin de alterar su nivel energético y captarlo en línea y a distancia mediante fibra óptica. El interés de esta tecnología radica en la posibilidad de reducir tiempo de análisis y costos (no requiere pretratamiento de muestras), además de generar información más completa relacionada con la naturaleza molecular de las sustancias manipuladas.

El principio de la espectroscopía consiste en provocar la absorción de energía y captar la energía emitida que incluye trayectoria y planos de vibración. La espectrometría involucra la tecnología de infrarrojo cercano (NIR), infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR), ultravioleta visible (UV-Vis), Raman, y fluorescencias. Estas tecnologías, con sus ventajas y desventajas, tienen un amplio rango de aplicación.

2.2.1 Absorción visible y ultravioleta

Esta técnica es la más empleada por su sencillez y bajo costo de equipos de medición (colorímetros). Se fundamento radica en la variación de intensidad de luz monocromática (registrada antes y después) incidida en un compuesto disuelto en un solvente. Aplicaciones: determinar concentración de compuestos orgánicos e inorgánicos, detectar el punto final de procesos de titulación, etc.

2.2.2 Absorción infrarroja

La radiación infrarroja interacciona con los estados de energía vibracional de enlaces moleculares. Dado que éstos son característicos de los átomos que los forman, en química orgánica permite identificar los grupos funcionales de una molécula.

2.2.3 Absorción de microondas

Estudia los niveles rotacionales de una molécula o conjunto de moléculas. A pesar de ser una técnica reciente, se ha demostrado que es útil para estudiar estructuras, ya que

⁴Eugene D. Olsen, “Métodos Ópticos de Análisis”, Ed. Reverté, España, 333-379, 1990.

permite determinar con precisión ángulos de enlace, distancias ínter nucleares y conformacionales.

2.2.4 Absorción atómica

Se emplea en la determinación cuantitativa de metales en disolución. Se basa en la absorción de radiación generada en una lámpara, que contiene el propio metal sometido a estudio, cuando atraviesa una llama en la que se halla pulverizada la disolución problema que contiene dicho metal. Es una técnica muy empleada por su sencillez de manejo y por la cantidad de elementos que puede detectar.

2.2.5 Absorción de rayos X

Permite realizar análisis a nivel átomo. Consiste en provocar la excitación de un electrón para hacerlo pasar de un nivel de baja energía a un nivel de mayor energía. Se emplea para realizar detecciones cualitativas y cuantitativas de elementos pesados, especialmente cuando éstos se hallan presentes en moléculas conformadas por átomos ligeros.

2.2.6 Llama

Método cuantitativo basado en la excitación de electrones mediante la energía de una llama. Por ser una técnica de bajo costo y apta para metales ligeros, se utiliza profusamente en analítica clínica.

2.2.7 Difracción de rayos X

Es una herramienta para realizar análisis cualitativo de la estructura cristalina de sólidos. Su principio se fundamenta en las figuras de la interferencia en forma de zonas circulares típicas de la difracción.

2.2.8 Dispersión óptica rotatoria

Estudia la dependencia de la actividad óptica de un compuesto al variar la longitud de onda de la luz incidente.

2.2.9 Dicroísmo circular

Es una medición complementaria a las dos anteriores. Establece las diferencias de absorción de la radiación que incide en una muestra con distintos ángulos de polarización.

2.2.10 Raman

La espectroscopia Raman se basa en un fenómeno específico de dispersión de luz, similar a la fluorescencia. El haz excitante debe ser de elevada energía y altamente monocromático, razón por la cual se utiliza el láser como fuente de energía en esta técnica analítica.

2.3 Fundamentos de la espectroscopía de Raman⁵

La espectroscopia Raman es una técnica fotónica de alta resolución que proporciona en pocos segundos información química y estructural de casi cualquier material (orgánico o inorgánico), permitiendo así su identificación. El análisis mediante espectroscopia Raman se basa en el examen de la luz dispersada por un material al incidir sobre él un haz de luz monocromática. Una pequeña porción de la luz es dispersada inelásticamente experimentando ligeros cambios de frecuencia que son característicos del material analizado e independiente de la frecuencia de la luz incidente. Se trata de una técnica de análisis que se realiza directamente sobre el material a analizar sin necesitar este ningún tipo de preparación especial y que no conlleva ninguna alteración de la superficie sobre la que se realiza el análisis, es decir, es no-destructiva.

La dispersión Raman puede excitar una molécula a un nivel vibracional o rotacional de mayor energía y la radiación emitida (dispersada) por la molécula (llamada línea Stokes) será de frecuencia correspondiente a una energía menor. Puesto que alguna de las moléculas con las que choca la radiación incidente puede encontrarse ya en un estado rotacional o vibracional excitado, la molécula puede aportar esta energía extra al fotón dispersado de forma que la radiación emitida (línea anti-Stokes) tendrá una energía superior a la radiación incidente en una cantidad correspondiente a la transición energética vibracional o rotacional de la molécula. Puesto que la dispersión Raman implica una variación de energía, el choque entre la molécula y el fotón incidente es inelástico.

2.3.1 Sistema de medición por espectroscopia Raman

Un sistema básico de espectroscopía constan de: (1) una fuente estable de energía radiante; (2) un contenedor (transparente) de muestras; (3) un dispositivo que permita aislar una región del espectro a analizar; (4) un convertidor de energía radiante a eléctrica; y (5) un sistema de procesamiento y lectura de señales.

2.3.1.1 Fuentes de energía radiante.

La fuente induce a la muestra a emitir una radiación fluorescente característica, fosforescente o dispersada, que se mide generalmente a un ángulo de 90° respecto de la fuente. La potencia del haz debe ser estable a fin de poder detectarlo fácilmente en estudios de espectroscopía. La radiación que generan las fuentes de potencia tienen un comportamiento exponencial que es función de la tensión de la fuente de alimentación; por tanto, las fuentes de potencia regulada son recomendadas.

Las fuentes de radiación son de dos tipos:

- (a) **Continuas**. Emiten una radiación cuya intensidad varía solo de forma gradual en función de la longitud de onda. Se usan ampliamente en espectroscopia de absorción y de fluorescencia. Ejemplos: lámpara de deuterio (región ultravioleta), lámparas de arco llenas de un gas presurizado como es el argón, xenón o mercurio (radiación de alta intensidad), y la lámpara de filamento de wolframio (región visible del espectro), la universal.

⁵ Skoog, Holler, Nieman, "Principios de Análisis Instrumental", quinta edición, Ed. Mc Graw Hill, Aravaca Madrid (España), 463-479, 2000.

- (b) **De líneas**, Emiten un número limitado de líneas o bandas de radiación, cada línea abarca un intervalo limitado de longitudes de onda. Las fuentes que emiten pocas líneas discretas son muy utilizadas en espectroscopia de absorción atómica, de fluorescencia atómica y molecular, así como en espectroscopia Raman; la refractometría y la polarimetría también emplean fuentes de líneas. Ejemplos: rayo láser.

2.3.2 Láser

Son fuentes de elevada intensidad, de ancho de banda estrecha (0.01 nm o menos, muy monocromático) y señal de salida de naturaleza coherente. Se utilizan en espectroscopia de Raman, absorción molecular y emisión, así como en espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier. Se aplican en trabajos de alta resolución para estudiar la cinética de procesos de tiempos de vida corta ($10^{-9} - 10^{-12}$ s), en la detección de muy bajas concentraciones compuestos contenidos en la atmósfera, así como en la inducción de reacciones isotópicamente selectivas.

Una fuente láser requiere un generador de radiación y un seleccionador de banda, principalmente.

2.3.2.1 Generador de radiación

Un generador es un tipo de oscilador, en donde la radiación es obligada a pasar repetidas veces (en ambos sentidos) a través de un elemento (o medio activo), mediante la ayuda de un par de espejos; en cada recorrido se generan nuevos fotones que amplifican la intensidad de la radiación. El haz de luz captado es el que tiende a ser muy paralelo; la radiación no paralela escapa por los lados del medio. El elemento activo del generador puede ser un cristal sólido como el rubí, un semiconductor como es el arseniuro de galio, una disolución de un colorante orgánico, o un gas de argón o criptón (Figura 2.1).

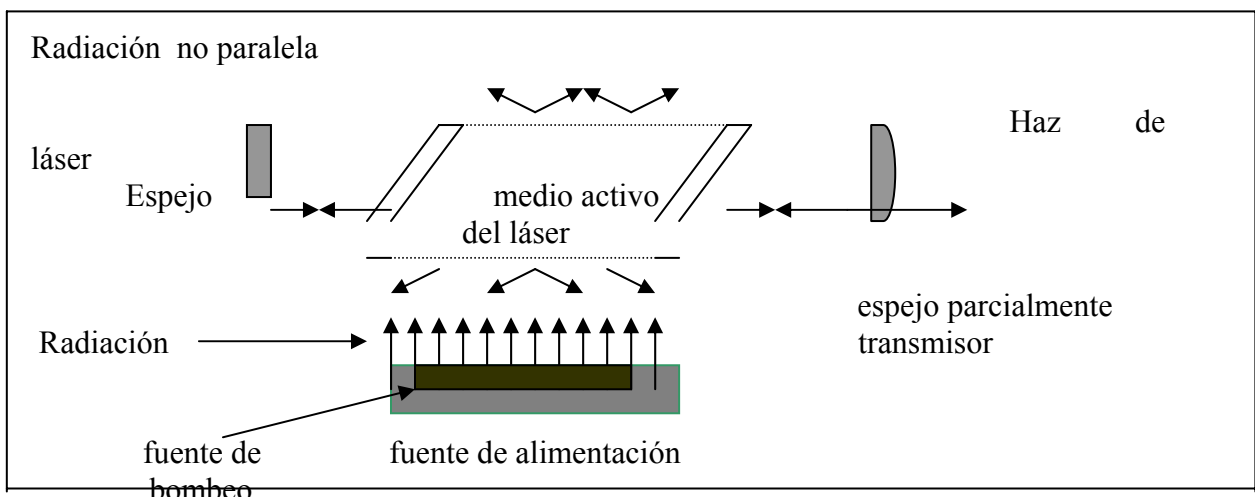


Fig. 2.2 componentes de una fuente láser

El proceso de activación del generador láser se conoce como bombeo. Este consiste en aplicar una descarga eléctrica al elemento activo, mediante una corriente eléctrica o un haz de luz. Durante el bombeo, una molécula puede saltar a un estado de energía E_y'' ;

mientras que otra se excita al nivel vibracional $E_{y''}$, ligeramente superior. El tiempo de vida de los estados vibracionales excitados es corto (10^{-13} y 10^{-15} s), posteriormente se produce una relajación a un nivel vibracional excitado mas bajo, generando una cantidad de calor indetectable (Figura 2.2).

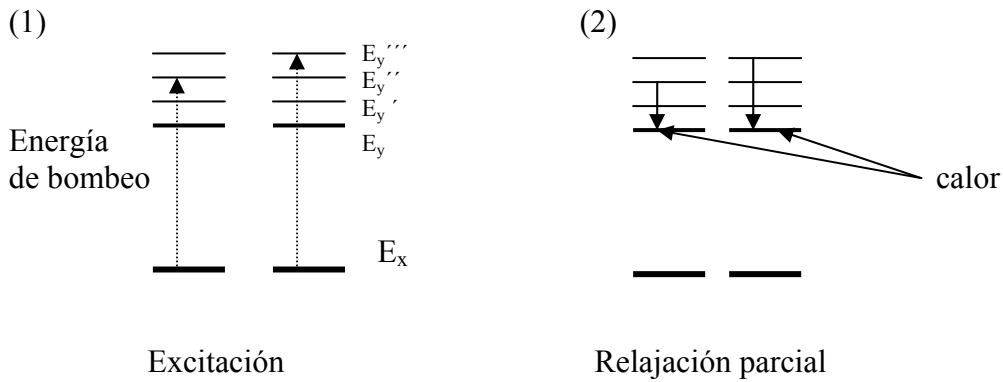


Fig. 2.3 Proceso de bombeo (excitación mediante energía eléctrica)

Los elementos activos solo pueden ser excitados por fotones que poseen exactamente la misma energía ($E_y - E_x$) que los fotones producidos por emisión espontánea. Las colisiones de este tipo producen la inmediata relajación de la especie excitada al estado energético inferior y, al mismo tiempo, la emisión de un fotón de exactamente la misma energía que el fotón que estimulo el proceso.

Es importante mencionar que una especie de estado electrónico excitado puede perder total o parcialmente su exceso de energía por emisión espontánea de radiación. Dado que la emisión espontánea es un proceso aleatorio, la emisión espontánea puede originar una radiación monocromática *incoherente* (Figura 2.3).

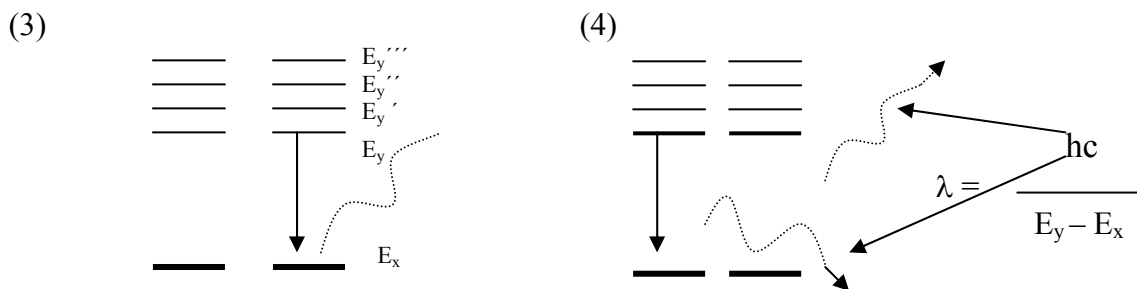


Fig. 2.4 Procesos para el funcionamiento de un láser (3) y (4) emisión espontánea

2.3.2.2 Ancho de banda

Banda es un grupo limitado, estrecho y continuo de longitudes de onda. Un ancho estrecho de banda aumenta la sensibilidad en las mediciones de absorbancia y transmitancia. Con frecuencia, una banda estrecha es requisito para obtener una relación lineal entre la señal óptica y la concentración de algún compuesto específico. Mientras más estrecha es una banda mejor resolución tendrá un dispositivo de medición (Figura 2.4).

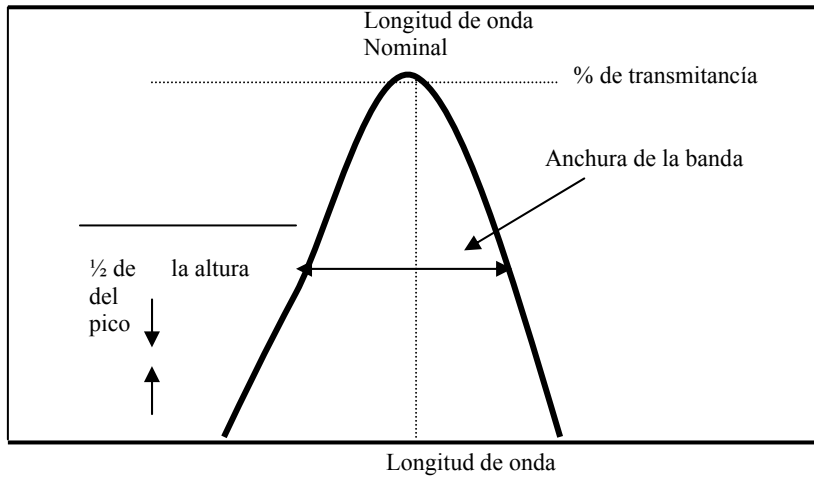


Fig. 2.5 Señal de salida de un selector de longitud de onda típico

Existen dos clases de selectores de longitud de onda: (a) filtros y (b) monocromadores.

2.3.3 Filtros.

Se emplean dos tipos de filtros: de *interferencia* (región ultravioleta, visible y buena parte del infrarrojo; banda estrecha) y de *absorción* (región visible del espectro; banda ancha).

Un filtro de interferencia consta de un dieléctrico transparente que ocupa el espacio entre dos películas metálicas semitransparentes colocadas entre dos placas de vidrio. La longitud de onda de la radiación se fija variando el espesor entre placas metálicas.

Cuando un haz perpendicular de radiación colimada incide sobre la placa metálica superior (Figura 2.5), solo una fracción de radiación atraviesa esta placa; el resto es reflejada. La radiación que continúa e incide sobre la segunda placa de metal sufre la misma partición. Si la fracción de radiación reflejada de esta segunda interacción es de una longitud de onda deseada, ésta se refleja parcialmente desde la cara interna de la primera capa metálica en fase con la luz incidente de la misma longitud de onda. Durante este proceso se refuerza la longitud de onda deseada, mientras que la radiación desviada sufre una interferencia destructiva.

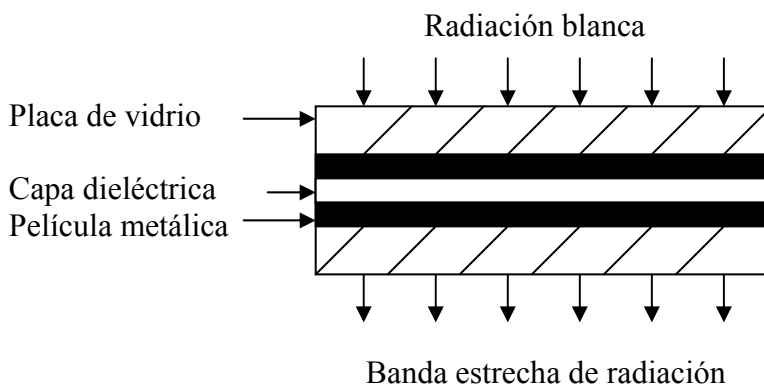


Fig. 2.6 Esquema de la selección transversal de un filtro de interferencia.

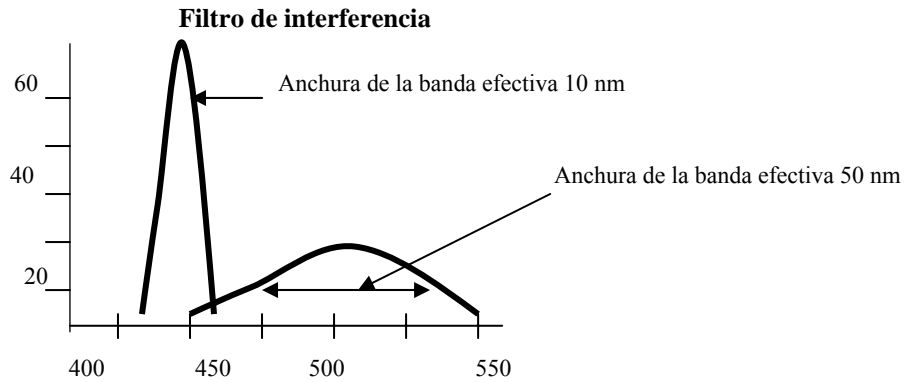


Fig. 2.7 Anchuras de banda efectiva para dos tipos de filtros

Los filtros de absorción tienen por objetivo absorber ciertas zonas del espectro. Un filtro de absorción puede ser un vidrio coloreado o una suspensión de un colorante en gelatina que se coloca entre dos placas de vidrio. El primero tiene la ventaja de dar mayor estabilidad térmica. Los filtros de absorción generan anchuras de banda que oscilan entre 30 y 250 nm. Estos filtros son significativamente menos sensibles que los filtros de interferencia. No solo es mayor la anchura de banda, sino la fracción de luz filtrada.

2.3.4 Monocromadores

Son dispositivos que permiten variar, de forma continua y en un amplio intervalo, la longitud de onda de la radiación. Este proceso es conocido como **barrido** de un espectro. El poder de resolución (R) de un monocromador está relacionado con su capacidad para separar imágenes adyacentes de longitudes de onda ligeramente diferentes. Por definición:

$$R = \lambda / \Delta \lambda$$

donde λ es la longitud de onda promedio de las dos imágenes y $\Delta \lambda$ su diferencia. El poder de resolución de los monocromadores de los equipos ultravioleta visible de mesa típicos está comprendidos entre 10^3 y 10^4 .

En un monocromador es importante considerar: **1.** Una rendija de entrada que proporcione una imagen óptica rectangular; **2.** Una lente colimador o un espejo que produzca un haz paralelo de radiación; **3.** Un prisma o una red que dispersa la radiación en sus longitudes de onda individuales; **4.** Un elemento focalizador que reconstruya la imagen de la rendija de entrada y la enfoca en una superficie plana denominada plano focal donde se aísla la banda espectral deseada.

Las rendijas del monocromador determinan las características de funcionamiento y calidad de la longitud de onda. Es importante que los bordes de la rendija sean exactamente paralelos y que estén en el mismo plano. Generalmente la abertura de las rendijas es variable (ajuste micrométrico), no obstante existen rendijas fijas.

La rendija de entrada de un monocromador sirve como fuente de radiación. Su imagen se enfoca en el plano de la rendija de salida. Si la fuente de radiación genera longitudes de onda separadas, éstas se reflejan en la superficie como líneas rectangulares brillantes,

cada línea representa una longitud de onda diferente. Un giro del elemento dispersante, permite enfocar una longitud de onda en una línea de salida. Si las rendijas de entrada y salida son del mismo tamaño, la imagen de la rendija de entrada, en teoría, ocupará exactamente la abertura de la rendija de salida, cuando el ajuste del monocromador corresponda a la longitud de onda de la radiación.

La razón $f/\text{número-entero}$ (f/NE), o velocidad, se utiliza para determinar la capacidad de un monocromador para recoger la radiación que sale de la rendija de entrada. f se define: $f=F/d$, donde “F” es la distancia focal del espejo colimador (o lente) y “d” el diámetro del espejo. El poder de captación de luz aumenta con el inverso del cuadrado de f/NE . Por tanto, una lente $f/2$ recoge cuatro veces más luz que una lente $f/4$. Para muchos monocromadores f/NE oscila entre 1 y 10.

Un monocromador sensible es aquél donde la relación señal/ruido es lo más alta posible. Los ruidos más habituales pueden ser clasificados en cinco grupos diferentes.

2.3.4.1 Interferencias en espectroscopia Raman

2.3.4.1.1 Shot.

Resulta de la naturaleza aleatoria de la luz. Su intensidad es igual a la raíz cuadrada del número de fotones detectados. Este ruido es inevitable en espectroscopia de Raman.

2.3.4.1.2 Muestral

Incluye emisiones ópticas no deseadas y la fluorescencia, fenómeno donde un fotón produce cambios electrónicos de nivel energético no deseados sobre una molécula. La fluorescencia se manifiesta como una suave curvatura de la línea de base de un espectro y puede alcanzar una intensidad que llega a enmascarar la intensidad de las bandas Raman. El ruido generado por la muestra incluye los cambios de intensidad Raman producidos por cambios de temperatura y lo heterogéneo de la muestra.

2.3.4.1.3 Instrumental

Depende del diseño de la instrumentación utilizada. Incluye el ruido que introduce el detector (ajuste de la longitud de onda) y variaciones de temperatura, principalmente.

2.3.4.1.4 Computacional.

Considera el efecto del proceso de digitalización de señales a la salida del detector.

2.3.4.1.5 Fuentes externas.

Es causado por alguna fuente de luz externa (fluorescencia, luz solar, altos niveles energéticos de partículas (rayos cósmicos), que contamina la señal de radiación por malos diseños del equipo y/o contenedor de muestras. El ruido se presenta como un pico muy estrecho y de gran intensidad. Estos picos ocurren infrecuentemente, en tiempo aleatorio y posiciones también aleatorias de espectro Raman. Es usual la presencia de ruido cósmico en detección de luz y en particular cuando se utilizan detectores como las matrices CCD (dispositivos de carga acoplada).

2.3.5 Recipientes para muestras

La espectroscopia, excepto la de emisión, requiere recipientes para el análisis de muestras. Al igual que los elementos ópticos de los monocromadores, los recipientes,

también llamados celdas o cubetas, deben fabricarse de un material transparente a la radiación, de la región espectral de interés.

2.3.6 Convertidor de energía radiante a eléctrica

Se realiza mediante sensores como son las fibras ópticas. La fibra óptica son hebras finas ($0.05 \mu\text{m} - 0.6 \text{ cm}$) de vidrio o plástico capaces de transmitir la radiación a distancia de varios centenares de metros. La transmisión de luz a través de una fibra óptica se produce por reflexión interna total.

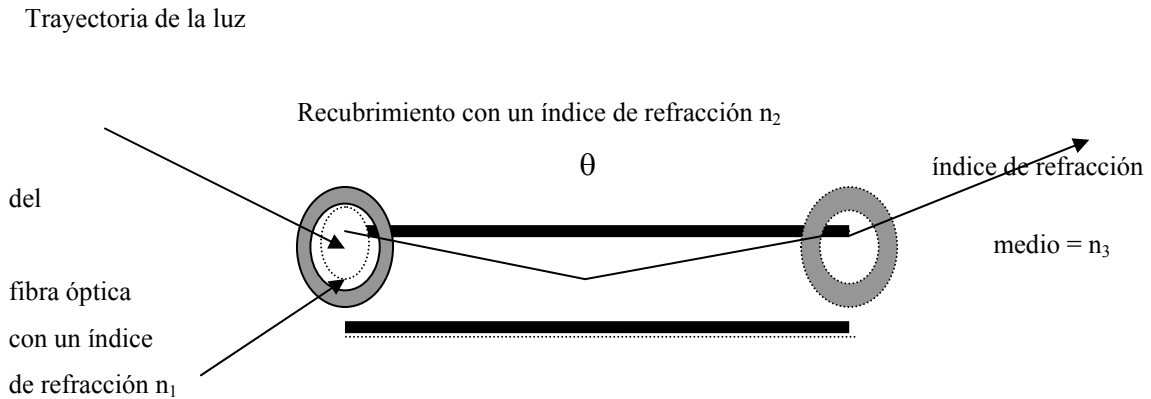


Fig. 2.8 Esquema de la trayectoria de la luz a través de una fibra óptica.

Para que se produzca la reflexión interna total es necesario recubrir la fibra óptica con un material cuyo índice de refracción sea menor al del material con el que se construye la fibra (Figura 2.7). Por ejemplo, el índice de refracción de una fibra de vidrio característica es de alrededor de 1.6. El índice de refracción de la cubierta de vidrio es de aproximadamente 1.5 y el del recubrimiento polimérico es de 1.4.

Los sensores de fibra óptica son denominados optrodos. Constan de una fase reactiva inmovilizada en el extremo de una fibra óptica. La interacción analito-reactivo produce una variación en la absorbancia, la cual es transmitida al detector a través de la fibra óptica. Los sensores de fibra óptica son, en general, dispositivos sencillos y baratos que se miniaturizan fácilmente. Para diferenciar señales en función del tiempo, se utilizan hebras de diferente longitud. La detección de resolución temporal permite determinar simultáneamente el analito en varias muestras mediante un único sistema de colección. La parte más importante del sistema de detección es un acoplador en estrella, un dispositivo bidireccional para acoplar múltiples haces de fibras ópticas.

2.4 TEQUILA³

El tequila es una bebida alcohólica elaborada a base de una flora microbiana nativa asociada al Agave Azul. La flora microbiana de interés en este proceso es conocida como levadura, y es clasificada dentro del reino Fungi (hongos) en el cual predomina la forma unicelular. Kurtzman y Fell⁶ definen una levadura como un hongo basidiomiceto

⁶ The yeasts: a taxonomic study (Kurtzman y Fell, 1998b)

o ascomiceto que se multiplica de manera vegetativa, principalmente por gemación o fisión y que no presenta, durante su fase sexual, cuerpos fructíferos internos o externos. Los dos principales géneros de levadura de interés comercial son *Candida* y *Saccharomyces* –especialmente *Saccharomyces cerevisiae* y especies cercanas relacionadas con la panadería y la producción de alcohol-, y tienen la especial virtud de que poseen una eficiente capacidad catabólica, aeróbica y anaeróbica.

Según Pretorius y col., (1999), en la etapa fermentativa del proceso de elaboración del vino se ha demostrado que intervienen solo 15 géneros de levaduras. En el caso específico del tequila existe un solo estudio (Lachance, 1995) donde se identificaron 10 géneros (*Brettanomyces*, *Candida*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Zygosaccharomyces*, *Torulaspota* e *Iwawortia*), de los cuales 8 se han encontrado en el proceso de elaboración de vinos. El gran número de especies de levadura que intervienen en la fermentación del tequila refleja la complejidad de su proceso. Es importante mencionar que cada levadura tiene un metabolismo específico característico que permite producir compuestos diferentes e importantes en el aroma de esta bebida.

En un inicio las fermentaciones se desarrollaban de manera espontánea, es decir, con cepas de levaduras nativas y sin control alguno. El pionero en utilizar cultivos puros fue el danés Hansen en el proceso de elaboración de la cerveza para la celebre empresa Carlsberg. En 1980 Müller-Thurgau introdujo el concepto de inocular las fermentaciones de jugo de uva con un cultivo puro de levaduras. En 1965, dos cepas de levaduras activas fueron producidas por primera vez para una importante fábrica de vinos en California. No obstante estas innovaciones, hasta 1980, los productores seguían aplicando los métodos tradicionales por la creencia de que las levaduras asociadas a cierto viñedo le confieren características específicas distintivas a las bebidas alcohólicas. Actualmente, el mundo de los productores de vino se divide en dos grupos: productores tradicionales, que utilizan fermentación espontánea, y los que aplican cepas puras de levaduras. En la actualidad diferentes empresas poseen una gran gama de levaduras, particularmente *Saccharomyces cerevisiae*, con características específicas para cada tipo de proceso.

Las cepas de levaduras que hoy se comercializan presentan una serie de características que permiten obtener propiedades específicas deseables, tanto del proceso como del producto elaborado. Estas características de las levaduras vínicas son las siguientes:

- Propiedades fermentativas: inicio rápido de la fermentación, alta eficiencia de la fermentación, elevada tolerancia al etanol, alta osmotolerancia, temperatura óptima baja, formación moderada de biomasa.
- Propiedades aromáticas: formación limitada de compuestos azufrados y de alcoholes superiores, así como de ácidos orgánicos; liberación de precursores glicosilados de aromas, alta producción de glicerol, actividad hidrolítica, autólisis favorecida, actividad modificada de las esterasas.
- Propiedades tecnológicas: alta estabilidad genética, alta tolerancia al sulfito, baja formación de espuma, propiedades de floculación, sedimentos compactos, resistencia a la desecación, propiedad killer, marcaje genético, actividad proteolítica, baja demanda en nitrógeno.
- Propiedades con repercusiones sobre la salud: baja formación de sulfito, baja formación de aminas, bajo potencial de formación de carbamato de etilo.

Varias de estas propiedades, tanto del proceso como del producto, son deseables en el caso del tequila.

2.4.1 Fermentación alcohólica

Es el proceso de transformación de azúcares en alcohol etílico y otros compuestos de interés en las características del producto final. Se identifican tres etapas principales: transporte de los azúcares al interior de la célula, transformación de los azúcares en piruvato por medio de la glucólisis y finalmente la conversión de piruvato a etanol. Es importante mencionar que la producción de alcohol se presenta durante la fase estacionaria del ciclo de vida de las levaduras, es decir cuando ya no se reproducen. En una fermentación modelo, en condiciones óptimas, cerca del 95 % de los azúcares se convierten en alcohol y dióxido de carbono, 1% en biomasa y el 4% en otros productos como el glicerol.

En las bebidas alcohólicas la mayoría de los compuestos responsables del olor y el sabor son volátiles (compuestos organolépticos), y las principales etapas responsables de sus producción son las siguientes: procesamiento de la materia prima (cocimiento y molienda en el caso del tequila), fermentación, destilación y maduración. Sin embargo algunos aromas pueden provenir directamente de la materia prima.

Las grandes familias de compuestos presentes en las bebidas alcohólicas son las siguientes:

- Alcoholes superiores
- Carbonilos (aldehídos y ésteres)
- Ácidos orgánicos y grasos
- Compuestos con azufre

Las levaduras están involucradas de alguna manera en la generación de compuestos organolépticos por lo que es importante mencionar que todos los géneros de levaduras involucrados en la fermentación de mostos para la obtención de bebidas alcohólicas tienen metabolismos muy semejantes y son capaces de producir casi todos los compuestos. Sin embargo, la capacidad de producción está más desarrollada en algunas especies que en otras.

2.4.2 Proceso de producción del tequila

En este proceso se pueden identificar las etapas de cocimiento y molienda, fermentación y destilación las cuales influyen en el rendimiento y propiedades organolépticas y fisicoquímicas de la bebida.

En el *cocimiento* se generan los azúcares fermentables por hidrólisis de la Inulina presente en el agave en la que se llevan a cabo una serie de reacciones químicas, que generan muchos de los compuestos responsables de las características organolépticas del tequila, y posteriormente en la *molienda* se extrae el jugo de los agaves cocidos conteniendo los azúcares que serán transformados a etanol durante la fermentación, por lo que esta etapa es fundamental en el rendimiento del proceso. La extracción del jugo contenido en las piñas del agave se realiza exprimiéndolas proceso que puede llevarse a cabo con diferentes grados de tecnificación, desde el molino de piedra hasta equipos

automatizados, sistemas que repercuten en el rendimiento de extracción del jugo y sus propiedades organolépticas.

Una vez que el mosto está formulado con la cantidad deseada de azúcares y nutrientes se puede iniciar la *fermentación* que ofrece dos opciones al productor: realizar una fermentación espontánea o inocular la tina con una levadura previamente desarrollada. En la industria tequilera, la gran mayoría de las empresas sigue utilizando la fermentación espontánea, a veces por desconocimiento de las ventajas del desarrollo de un inóculo o también por políticas de la empresa por querer conservar una fermentación totalmente natural. La levadura más recomendada para el mosto de agave es la aislada de este mismo para obtener buenos rendimientos de fermentación y sobre todo para evitar variaciones en el aroma del producto final.

Además de la producción de alcohol, durante la fermentación se forman (por acción de bacterias y levaduras), numerosos compuestos que contribuyen al sabor y olor característicos del tequila. Dentro de estos compuestos se encuentran los alcoholes superiores, los acetales y los ésteres. Por lo general se acepta que la cantidad de compuestos organolépticos producidos es mayor en las fermentaciones que tienen una duración más prolongada que en las fermentaciones cortas debido a que la fermentación es realizada en condiciones no asépticas, por lo que otros organismos diferentes a *Sacromices cerevisiae* pueden contribuir a la generación de compuestos organolépticos, lo cual genera una gran riqueza de tequilas con características muy particulares dependiendo de la flora microbiana propia de la región o de cada fábrica.

La última etapa del proceso es la *destilación* que tiene la finalidad de aumentar la concentración alcohólica y obtener un destilado con un grado alcohólico que oscila del 35 hasta el 38 % etanol volúmen, y con la mayor parte de los compuestos congéneres que interesan.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Equipo Raman y accesorios:

- Láser de Argón 5 Watts, marca CHERNT
- Cámara SANTABARBARA INSTRUMENT GROUP, modelo ST-6UV OPTO HEAD.
- Detector de fotones multicanal de acoplamiento de carga (CCD), SBIG ASTRONOMICAL INSTRUMENTS, modelo ST-6V CPU.
- Monocromador ½ M DGIKRON, modelo DK-48.
- Ordenador comercial.
- Contenedor de muestras con rendija.
- Soporte con espejo con un ángulo de 45°
- Fibra óptica
- Caja negra de recolección de luz, con movimiento vertical-horizontal:
 - Filtro NOTCH para una longitud de onda de 488 nm.
 - Objetivo de microscopio de 40X.
- Balanza analítica.
- Pipetas 5ml, 1ml y 20 µl
- 10 tubos de ensayo de 10 ml
- 40 contenedores de vidrio de 5ml con fondo plano para las soluciones.
- 40 Espejos de forma circular con un diámetro de 1 cm como tapas para los contenedores de vidrio.

3.2 Reactivos (Compuestos Organolépticos)

- Etanol grado cromatográfico
- Acetato isoamílico
- 3-metil-1-butanol
- Lactato de etilo
- Isobutanol
- Acetato de etilo
- 1-Propanol
- Acetato metílico
- 2-furaldehido
- Metanol
- 2-propanol
- 2-metil-1-butanol
- 2-feniletanol

3.3 Método de obtención de espectros Raman

Se analizaron soluciones de compuestos organolépticos en el rango del 100 al 1%.

El procedimiento de medición comprende:

1. Alinear el dispositivo de captación de luz Raman.
2. Determinar el número de barridos para identificar picos característicos de los compuestos.
3. Determinar la abertura de la rendija y el tiempo de exposición de la luz Raman al detector de radiación que permita obtener la mejor medición.
4. Seleccionar condiciones de medición para amortiguación de ruido.

Debido al interés de monitorear los compuestos organolépticos en soluciones alcohólicas inicialmente se propuso identificar el espectro del etanol para trazar una curva de calibración en el rango 100-1% para posteriormente analizar los compuestos organolépticos.

Es importante mencionar que los compuestos organolépticos son poco solubles en alcoholes e incluso en agua. Considerando que esta característica falsea los resultados, solamente se analizaron las concentraciones de soluciones para las cuales los compuestos organolépticos se solubilizaron completamente.

3.3.1 Alineación del dispositivo de captación de luz Raman.

La alineación del dispositivo se realizó mediante el análisis de una muestra de tetracloruro de carbono contenida en tubos de ensaye de 10 ml. La alineación consistió en hacer incidir el rayo láser en el seno de la muestra y desviar 90° la dispersión Raman para ser captada al centro de la fibra óptica. El filtro Notch se ajustó de manera a eliminar la mayor cantidad de la dispersión Rayleigh. Los tubos de ensaye fueron acondicionados con tapa de espejo orientado hacia el interior del tubo con la intención de reflejar el rayo láser y obtener una segunda dispersión Raman (Fig. 3.1).

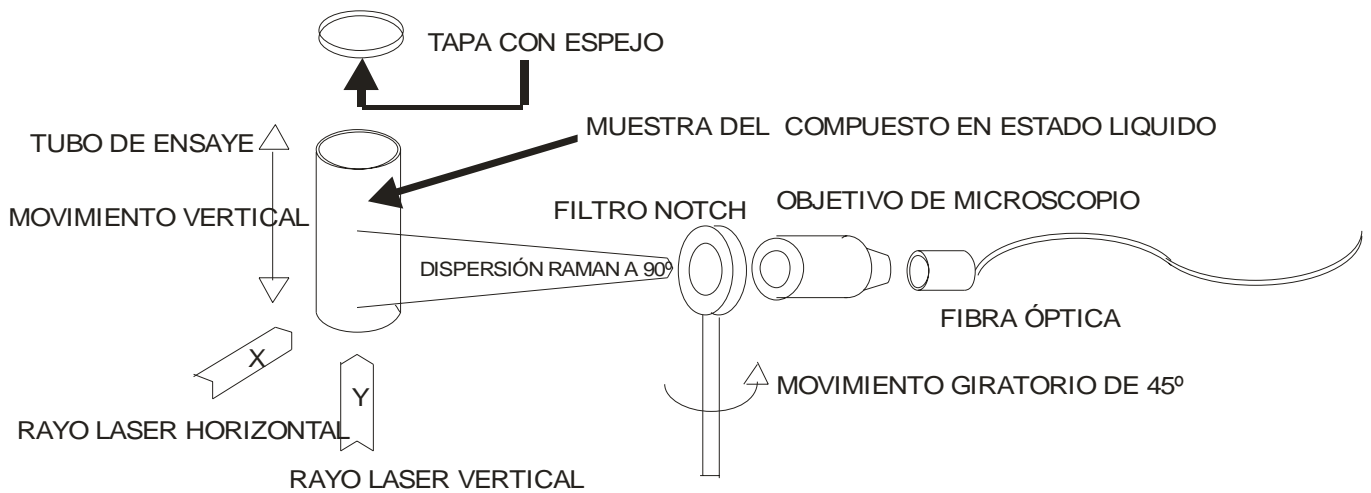


Fig. 3.1 Diagrama del dispositivo de incidencia del rayo láser y recolección de la dispersión Raman de una muestra líquida.

El espectro del tetracloruro de carbono fue validado por medio de la comparación de un espectro reportado en la literatura¹. Para el cambio de longitud de onda (nm) a desplazamiento Raman en (cm⁻¹) se aplicó la siguiente función:

$$\Delta\nu = \frac{1}{\lambda_{laser}} - \frac{1}{\lambda_{Raman}}$$

Donde:

$\Delta\nu$ (cm⁻¹) = desplazamiento Raman

$$\lambda \text{ (cm)} = (\lambda \text{ nm}) * \left(\frac{1 \times 10^{-7} \text{ cm}}{1 \text{ nm}} \right)$$

El sistema de radiación láser se calibró periódicamente previo al análisis de cada una de las muestras estudiadas. La calibración consistió en fijar el pico característico de la dispersión Rayleigh (λ_{laser}) en 488 nm. (Fig. 3.2)

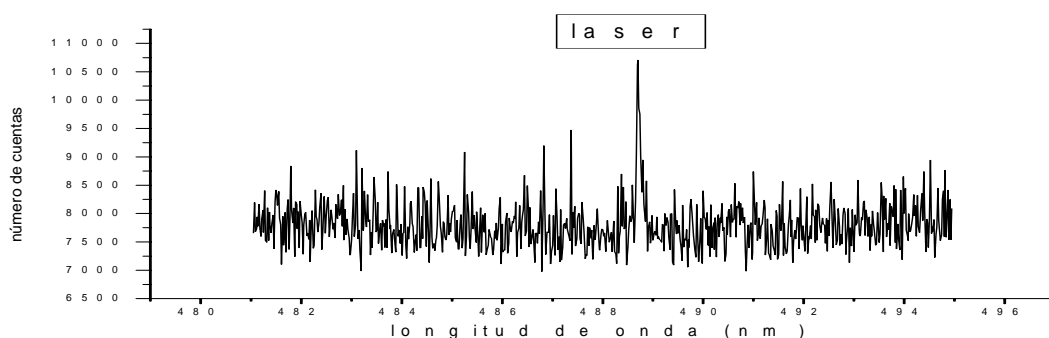


Fig. 3.2 Espectro del Rayo láser (dispersión Rayleigh), obtenido con una fuente láser de Argón de 5 watts a 488 nm.

¹ Principios de análisis instrumental, Skoog, Holler y Nieman, pp 464 fig 18.1

4. RESULTADOS

4.1 Alineación del dispositivo de captación de luz Raman.

Para una primera y correcta identificación de la señal Raman se tomó el tetracloruro de carbono como referencia por su fácil identificación y su espectro reportado en diferentes publicaciones. El análisis espectroscópico se llevó a cabo a una longitud de onda del rayo láser de 488 nanómetros con un tiempo de exposición de 60 segundos y un ancho de rendijas de 500 μm . La identificación de picos característicos se obtuvo realizando dos barridos. El primero se inició en 500 nm y se abarcaron 6 posiciones a la izquierda y 6 a la derecha (494 hasta 506 nm) para no detectar la dispersión Rayleigh que es muy intensa; se fijó un tamaño de paso de 12 nm hasta abarcar un total de 518 nm. Los picos registrados son mostrados en la figura 4.1 y en la figura 4.2 el espectro de Raman reportado en literatura para el CCl_4 .

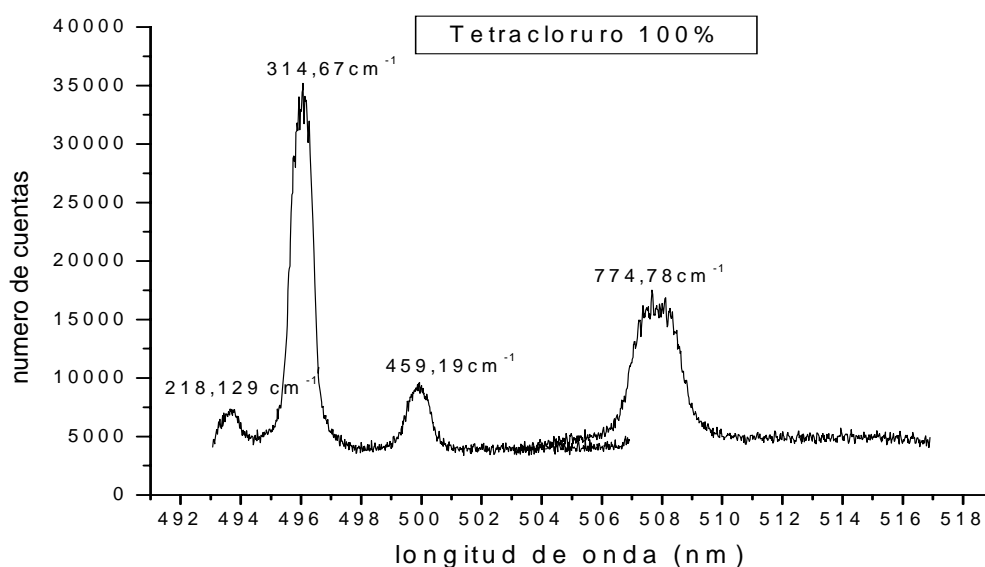


Fig.4.1 Espectro Raman del tetracloruro de carbono (CCl_4)

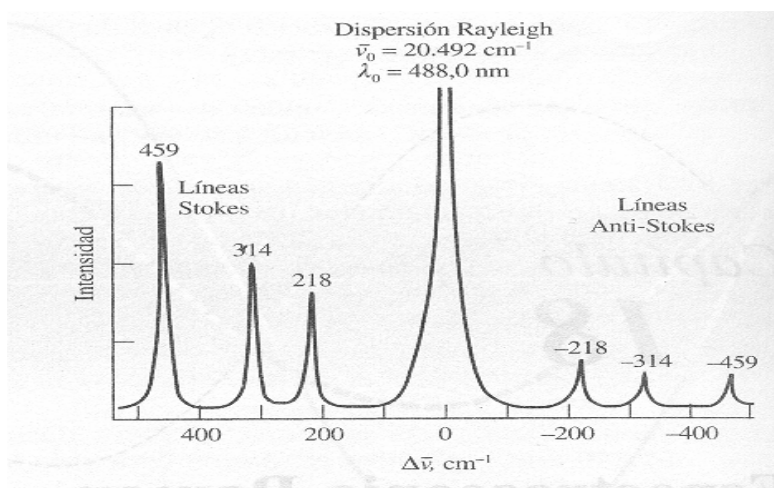


Fig. 4.2 Espectro Raman del tetracloruro de carbono excitado con un láser de 488 nm

4.2 Espectro Raman del alcohol etílico grado analítico

Se analizó una muestra de etanol grado analítico contenida en un tubo de ensaye de 10 ml. El análisis se realizó para una longitud de onda de 488 nm, un tiempo de incidencia de 60 segundos y una abertura de rendija de 500 μm . El espectro Raman se obtuvo realizando 3 barridos desde 500 hasta 530 nm con un paso de 12 nm. Las posiciones de los picos en nanómetros se presentan en la figura 4.3.

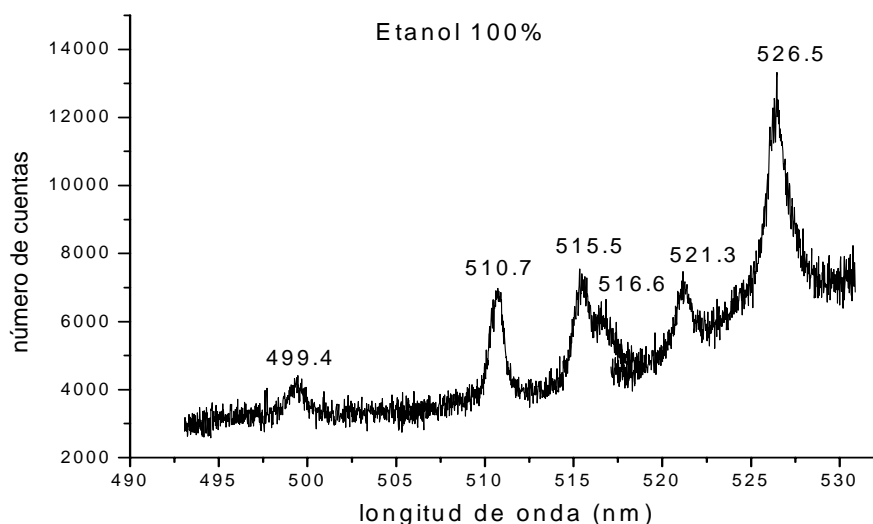


Fig.4.3 Espectro Raman del Etanol grado analítico

4.3 Espectros Raman de alcohol etílico a diferentes concentraciones.

Se determinó el espectro RAMAN de soluciones de alcohol etílico en las proporciones mostradas en la tabla 4.1. Inicialmente se analizaron las soluciones de mayor concentración a fin de identificar la concentración mínima detectada para las condiciones de operación inicialmente establecidas (ver sección 4.2). Estas corresponden a las concentraciones en el rango 90-40%. El análisis de las soluciones de menor concentración solo generó grandes dispersiones de luz. La identificación del espectro RAMAN de estas soluciones requirió concentrar el haz de luz así como cambiar las condiciones de operación del sistema RAMAN.

Tabla 4.1 Volúmenes de etanol y agua utilizados para preparar soluciones de alcohol etílico en el rango 10-90%

Concentración (% v/v)	Volumen de etanol (ml)	Volumen de Agua (ml)	Volumen de muestra (mL)
10*	0.4	3.6	4
20*	0.8	3.2	4
30*	1.2	2.8	4
40	3.2	4.8	8
50	4.0	4.0	8
60	4.8	3.2	8
70	5.6	2.4	8
80	6.4	1.6	8
90	7.2	0.8	8

* Tubo de fondo plano

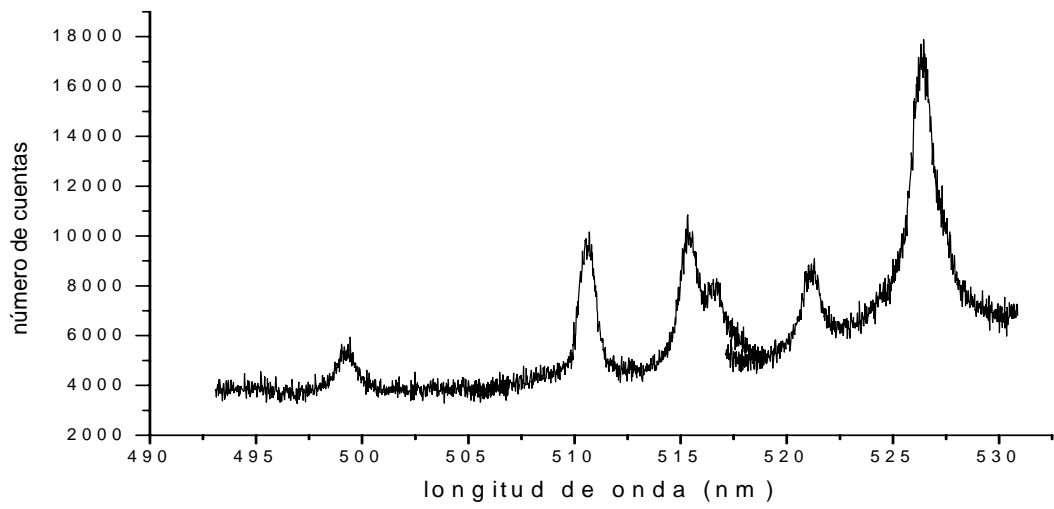


Fig. 4.4 espectro del etanol al 90%

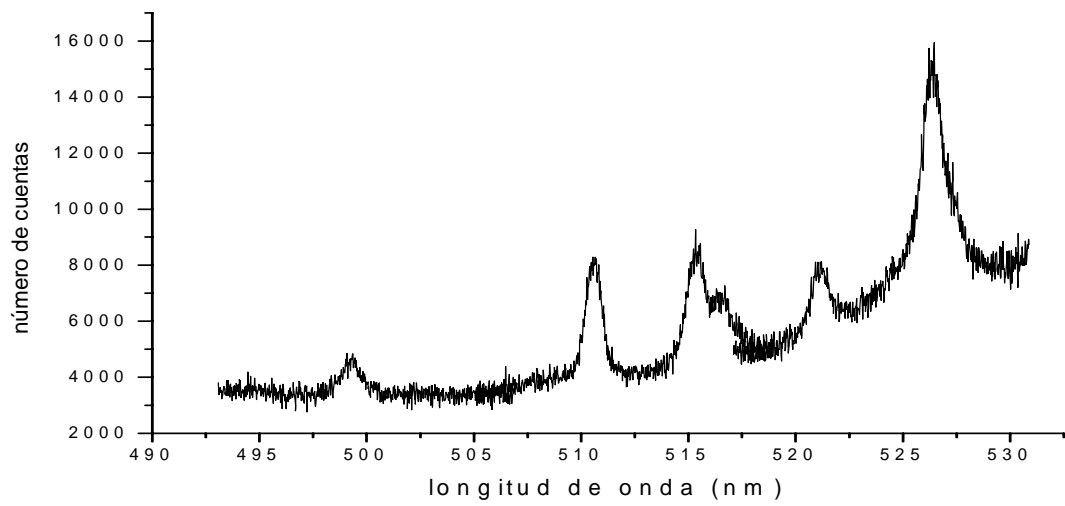


Fig. 4.5 espectro del etanol al 80%

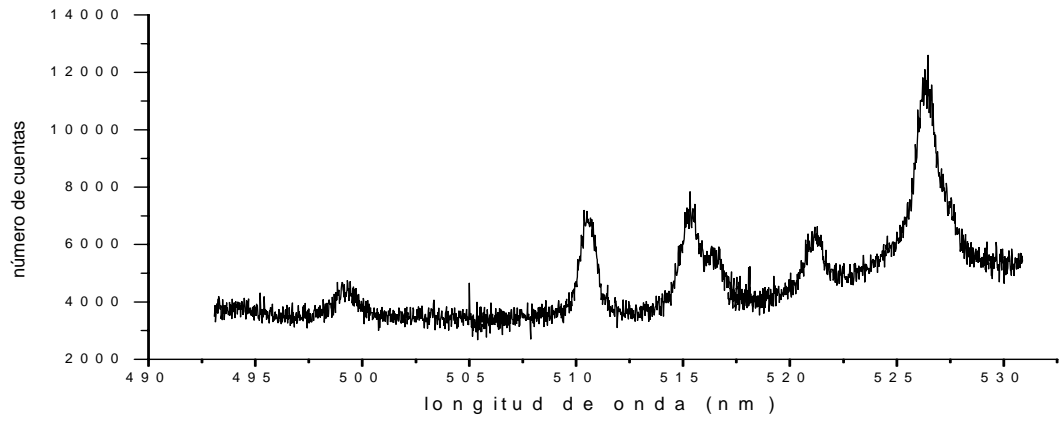


Fig.4.6 espectro del etanol al 70%

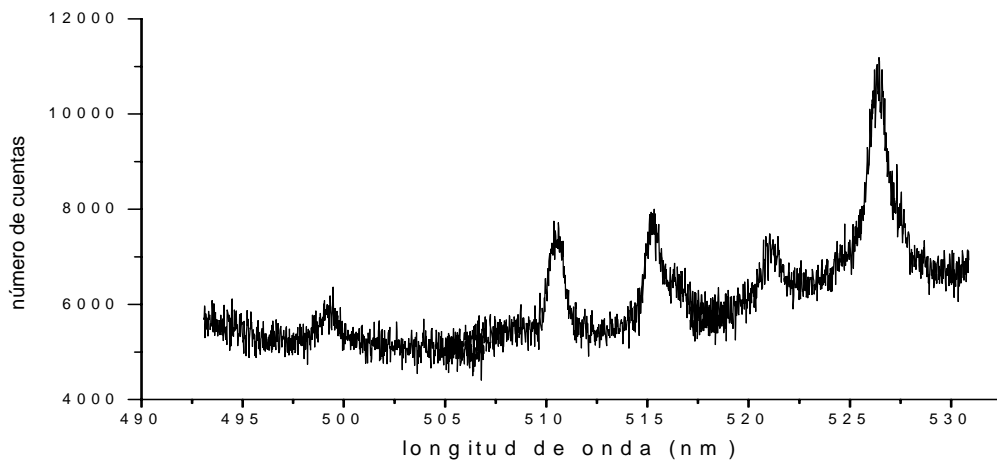


Fig.4.7 espectro del etanol al 60%

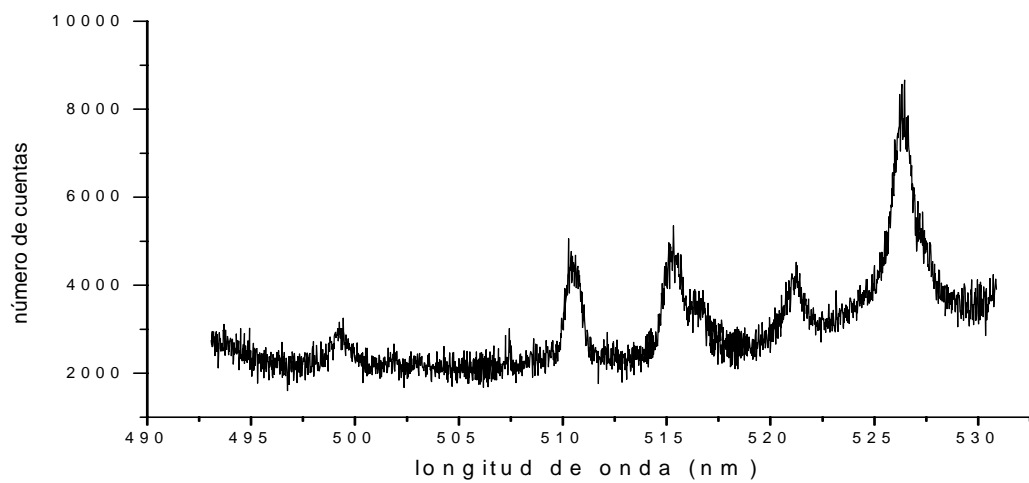


Fig.4.8 espectro del etanol al 50%

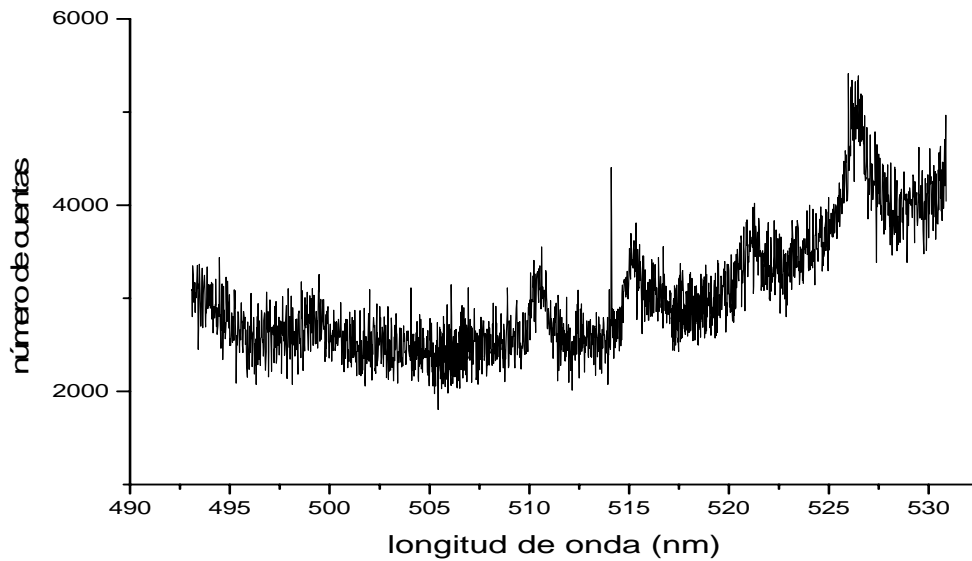


Fig. 4.9 espectro del etanol al 40%

Las figuras 4.11-4.13 muestran el espectro RAMAN de las soluciones de etanol del 30 al 10%. La identificación de estos espectros demandó cambiar las características del fondo del recipiente inicialmente utilizado en el análisis de muestras de alcohol de mayor concentración. En este caso se utilizaron tubos de vidrio de fondo plano montados sobre un contenedor con una rendija practicada en la base de éste. Además, un objetivo de microscopio 20X fue instalado a la salida de la fuente de luz, el cual ayudó a focalizar la luz (convergente) en la base plana del recipiente (Figura 4.10). Los espectros se obtuvieron a una longitud de onda del láser de 488 nm, un barrido en 524 nanómetros (518-530 nm), un tiempo de exposición RAMAN al detector de radiación de 80 segundos y una abertura de la rendija de 600 μm .

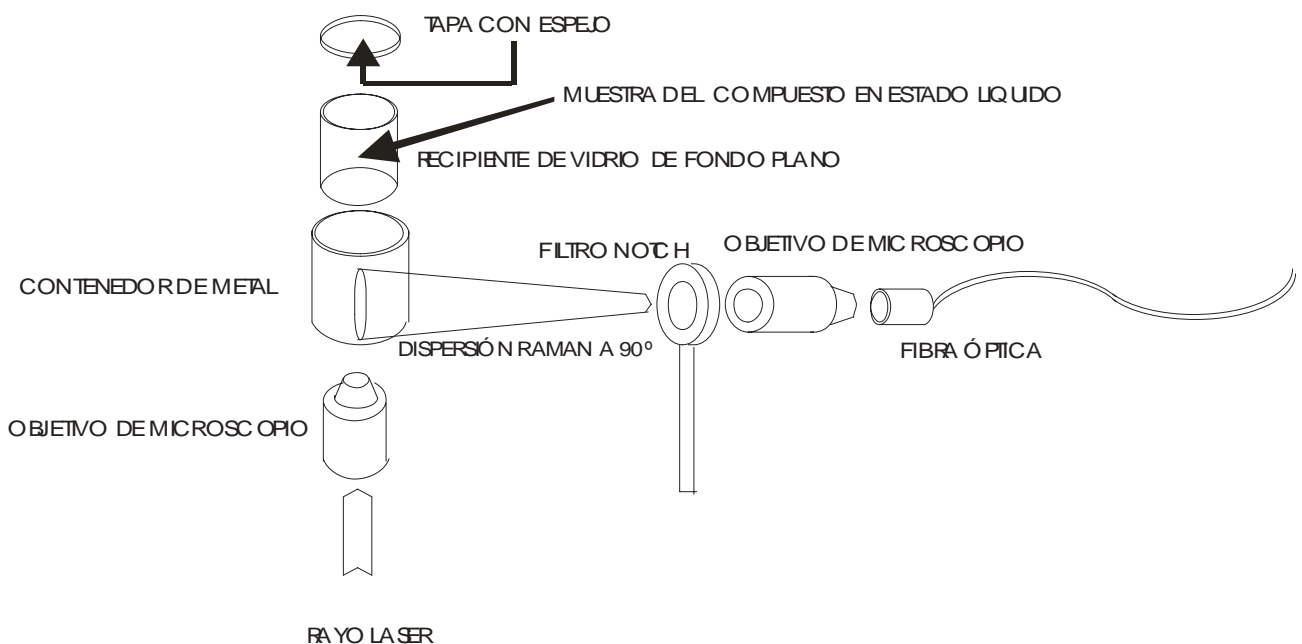


Fig.4.10 Diagrama del dispositivo equipado con un objetivo de microscopio y un contenedor para los recipientes de vidrio.

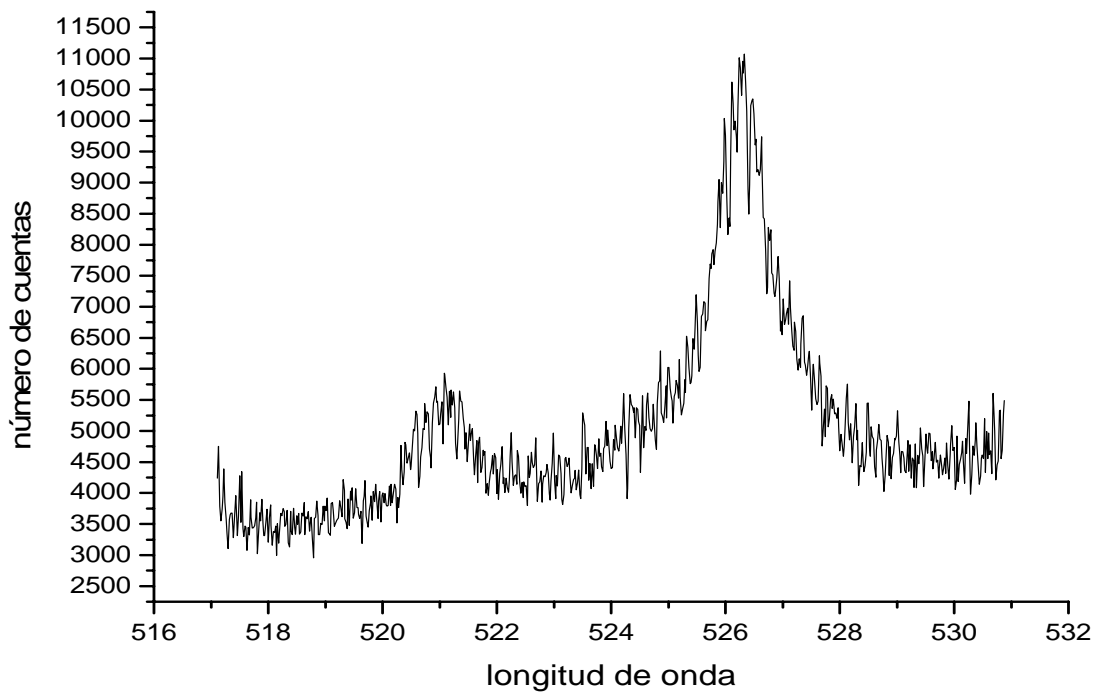


Fig. 4.11 espectro del etanol 30%

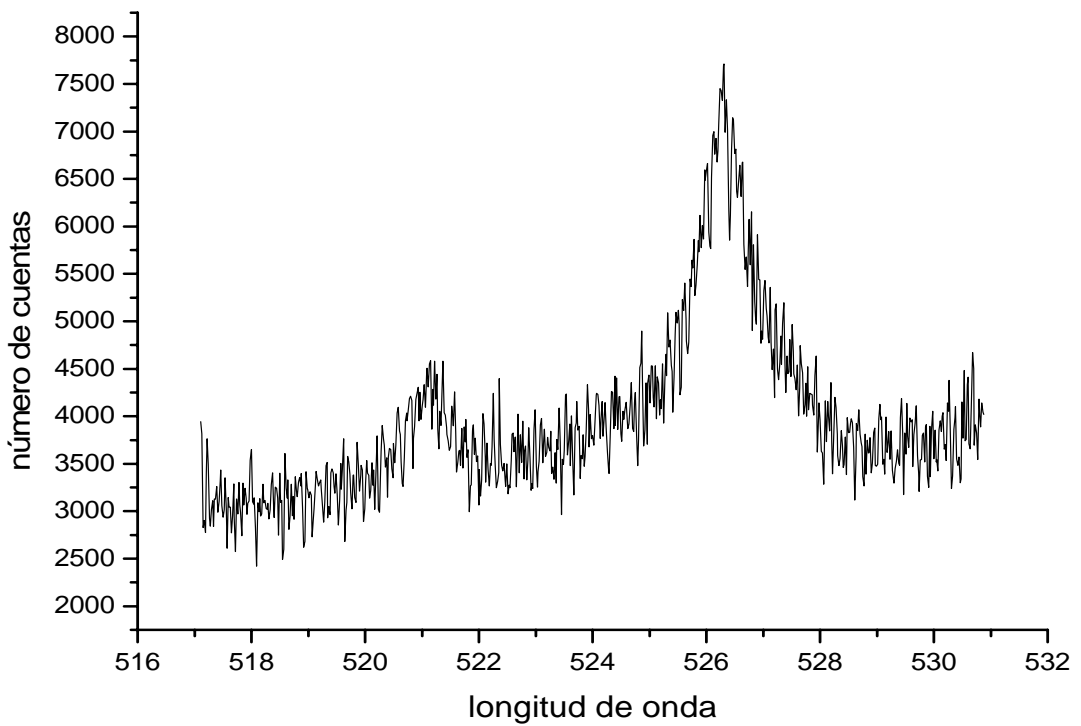


Fig. 4.12 espectro del etanol 20%

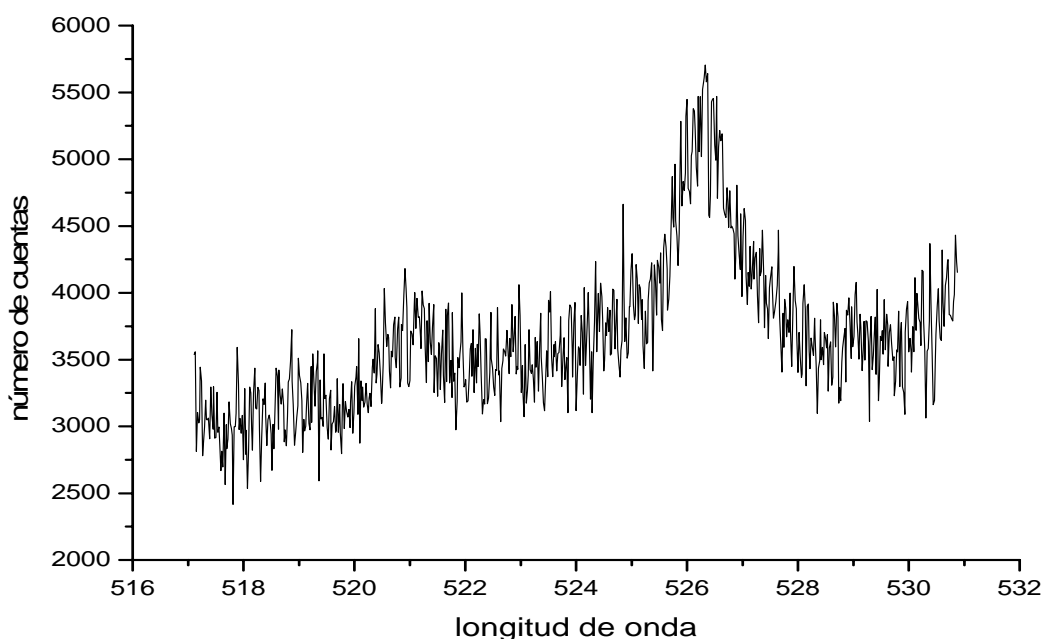


Fig. 4.13 espectro del etanol 10%

4.4 Espectros Raman de soluciones de etanol en agua del 5 al 1%.

Considerando la posibilidad de recomendar la espectroscopia de RAMAN al análisis de muestras alcohólicas producidas a nivel industrial, se analizaron muestras de alcohol de concentración mínima del 1%. Los volúmenes de etanol y agua utilizados en la preparación de estas soluciones se presentan en la tabla 4.2 y los espectros obtenidos para cada solución en las figuras 4.14-4.16. Para identificar el espectro de estas soluciones fue necesario incrementar el aumento del objetivo de microscopio a 40X. El análisis espectroscópico se llevó a cabo a una longitud de onda para el rayo láser de 488 nanómetros con un solo barrido en 524 nanómetros (518-530 nm) y realizando tres acumulaciones con un tiempo de exposición al detector de radiación de 120 segundos y una abertura de la rendija de 600 μm .

Tabla 4.2 Soluciones de 4 ml en contenedores de fondo plano.

Concentración (% v/v)	Cantidad de etanol (μl)	Cantidad de Agua (μl)
1	40	3960
3	120	3880
5	200	3800

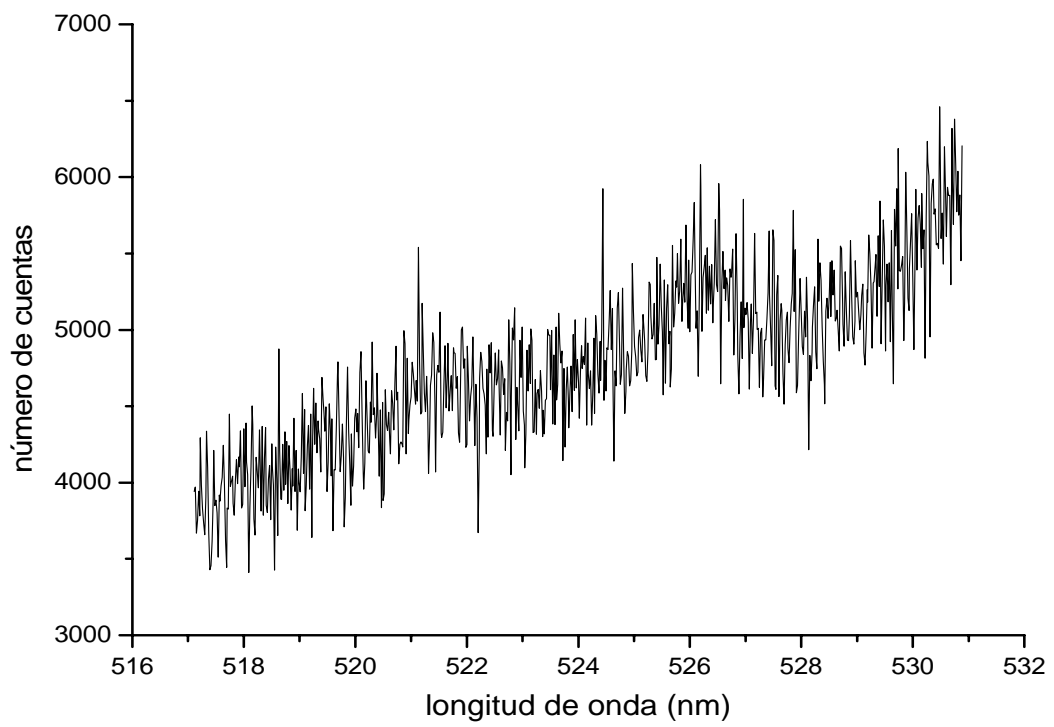


Fig. 4.14 Espectro del etanol al 1%

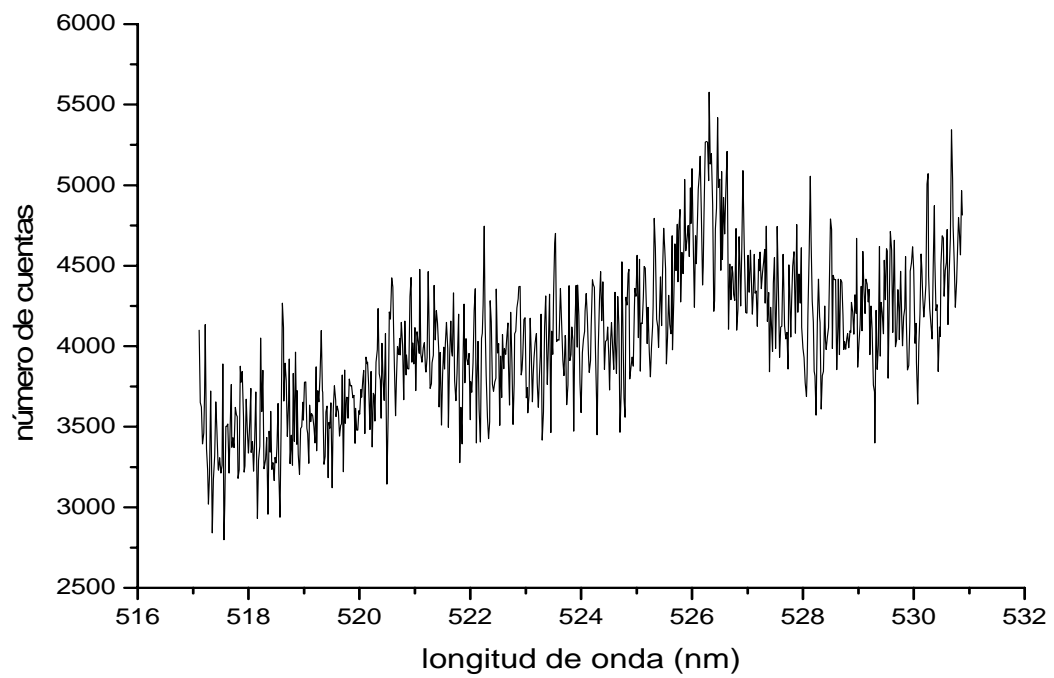


Fig. 4.15 Espectro del etanol al 3%

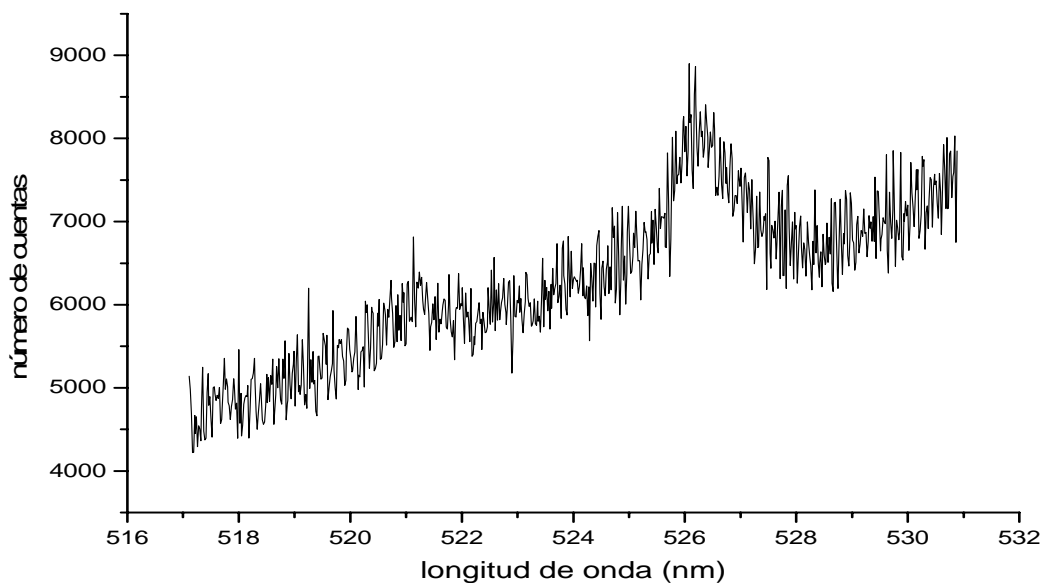


Fig. 4.16 Espectro del etanol al 5%

4.5 Espectros Raman de los compuestos organolépticos puros

Los compuestos organolépticos fueron analizados a 488 nm de longitud de onda del láser con un tiempo de incidencia de la dispersión Raman al detector de radiación de 60 segundos y una abertura de rendija de 500 μm . La obtención de los espectros se realizó haciendo barridos con pasos de 12 nm, para acetato isoamílico, acetato metílico, acetato de etilo, 2-feniletanol y lactato de etilo (figuras 4.17 hasta 4.21) se realizó un total de 4 barridos, desde 500 hasta 536 nanómetros (494-542 nm). En el caso del 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol, 1-propanol e isobutanol (figuras 4.22 hasta 4.25) fue necesario realizar 3 barridos desde 500 hasta 524 nm (494-530 nm). Finalmente para el 2-propanol y el metanol (figuras 4.26 y 4.27) se realizaron 2 barridos desde 512 hasta 524 nm (506-530nm).

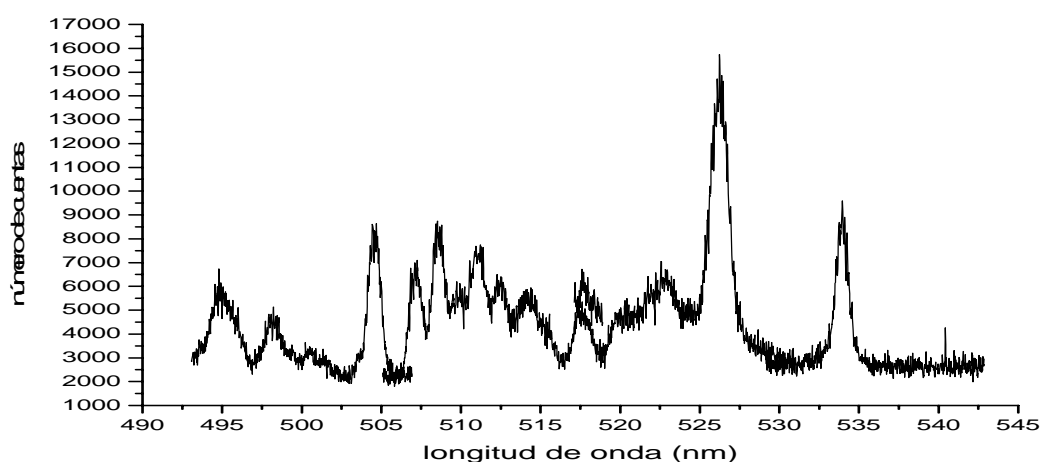


Fig. 4.17 Espectro del acetato isoamílico

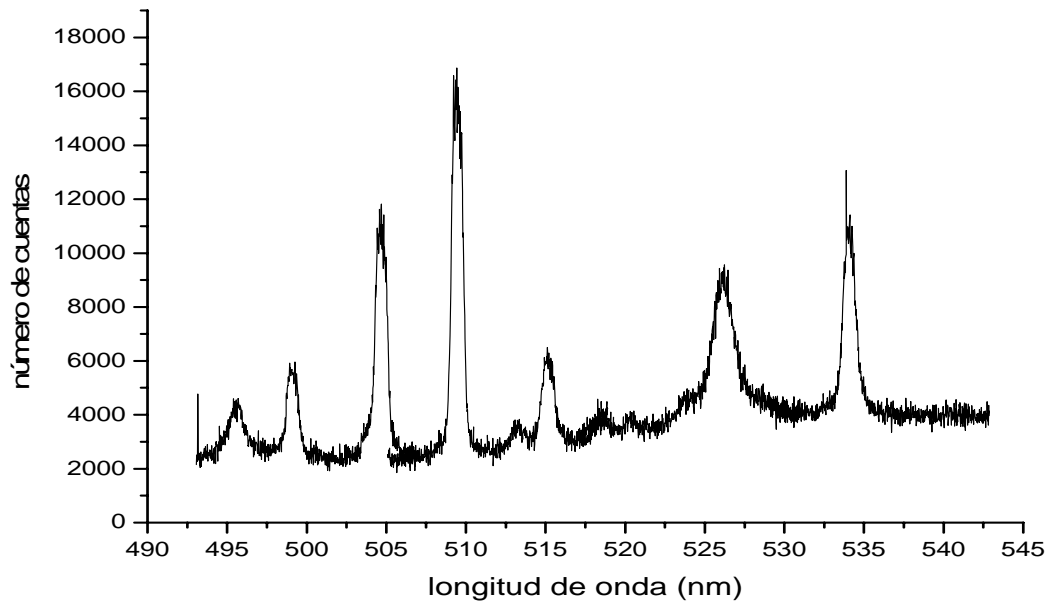


Fig. 4.18 Espectro del acetato metílico

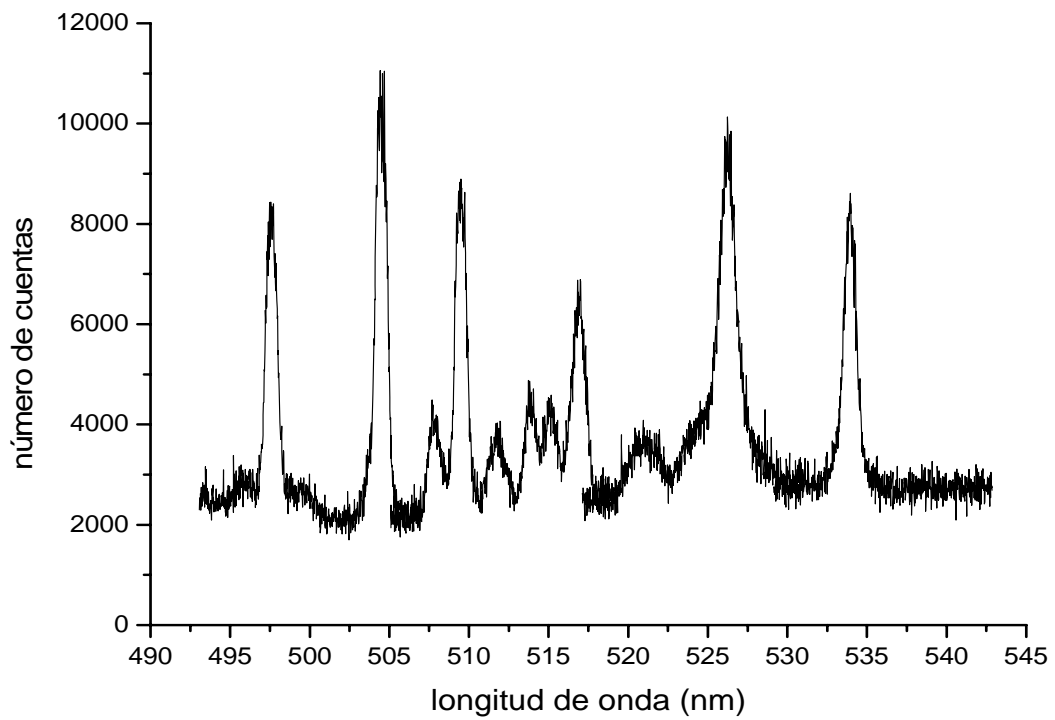


Fig. 4.19 Espectro del acetato de etilo

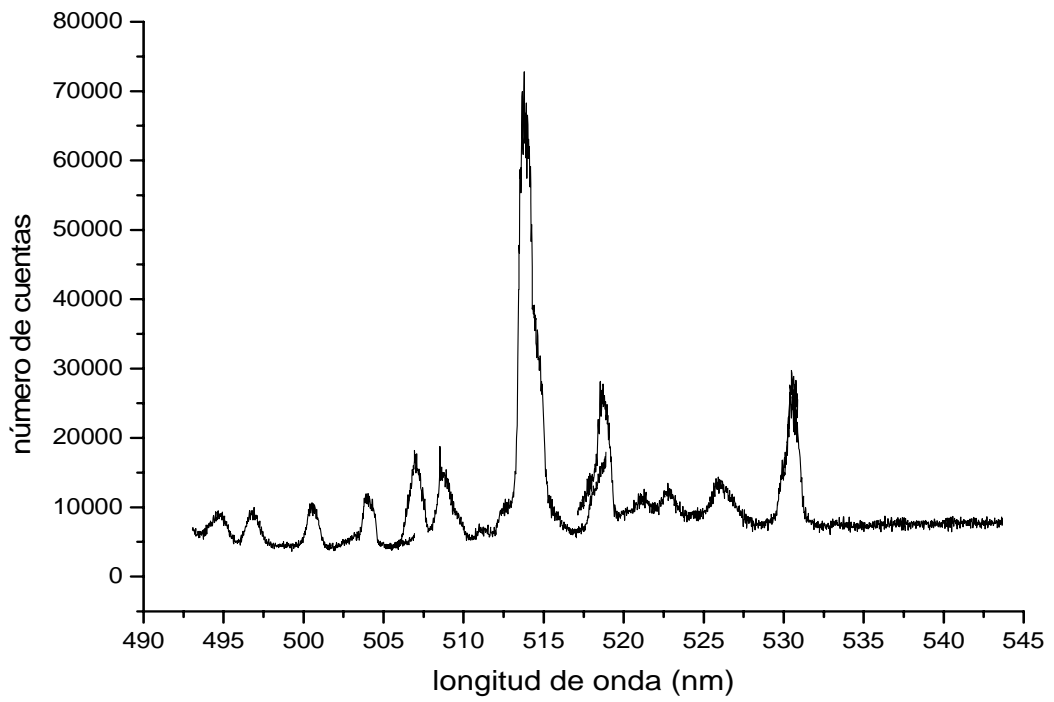


Fig. 4.20 Espectro del 2-feniletanol

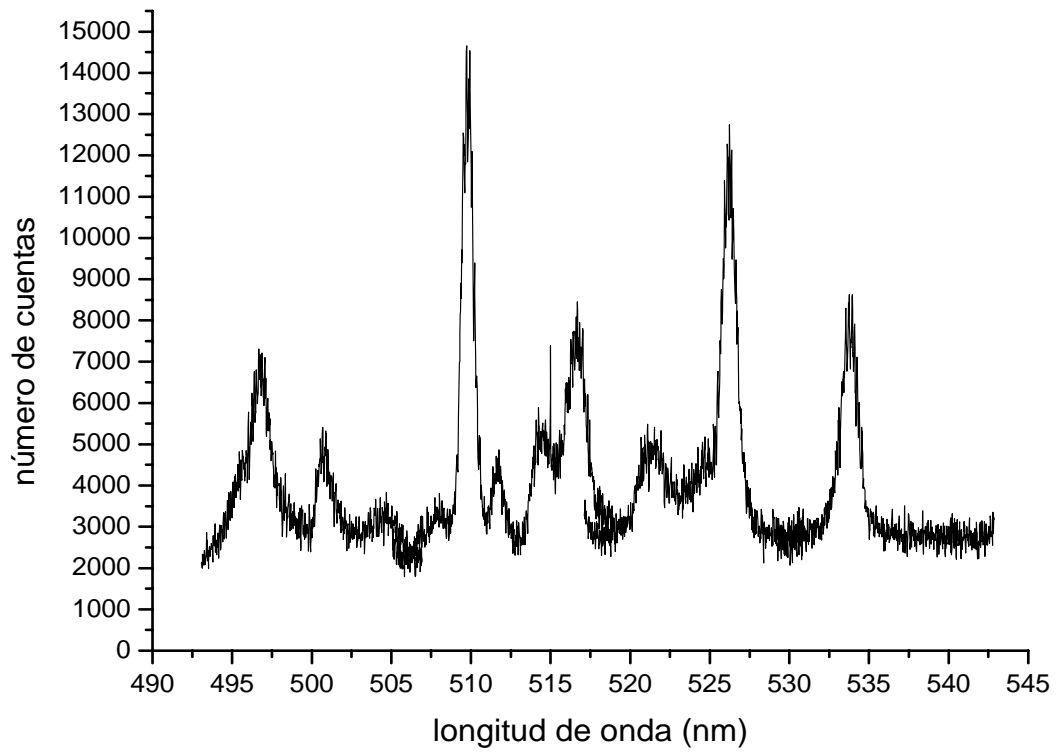


Fig. 4.21 Espectro del lactato de etilo

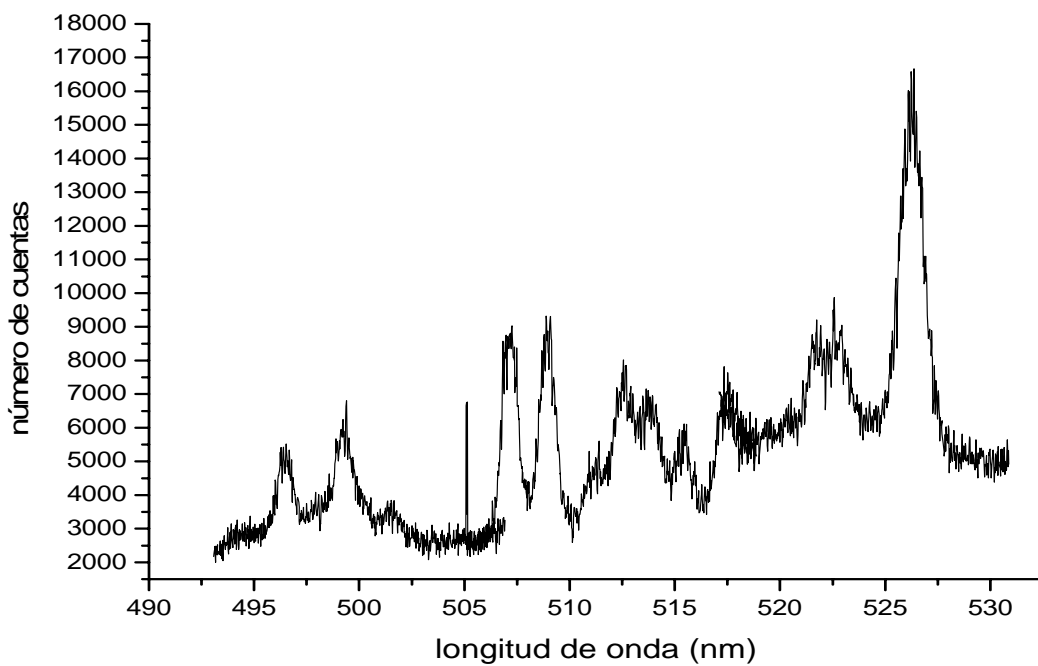


Fig. 4.22 Espectro del 2-metil-1-butanol

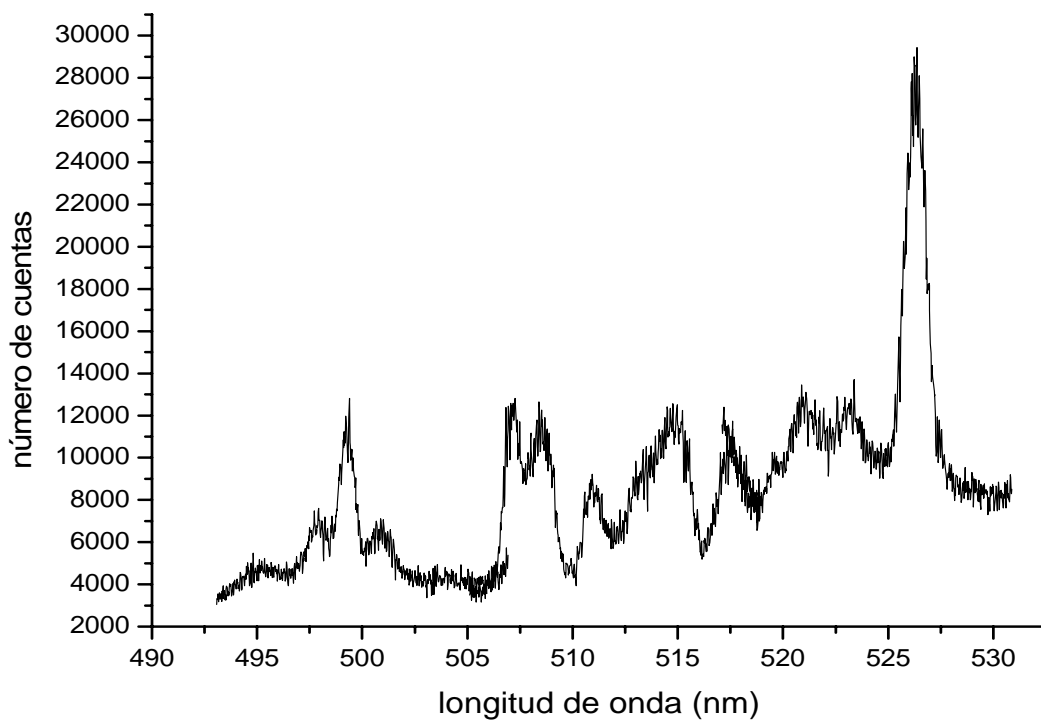


Fig. 4.23 Espectro del 3-metil-1-butanol

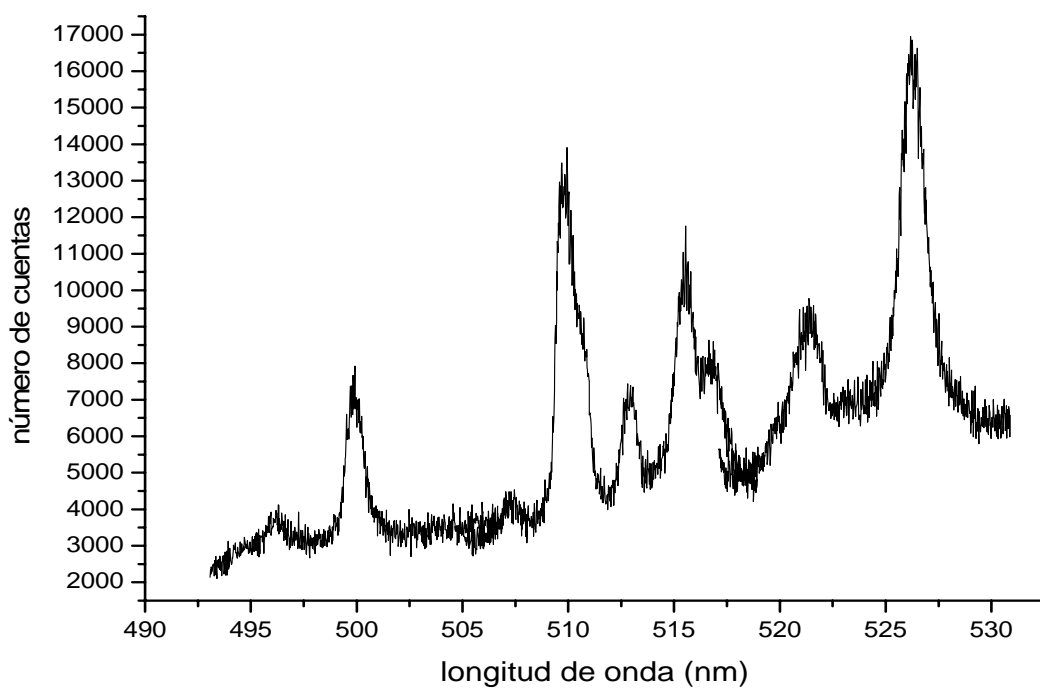


Fig. 4.24 Espectro del 1-propanol

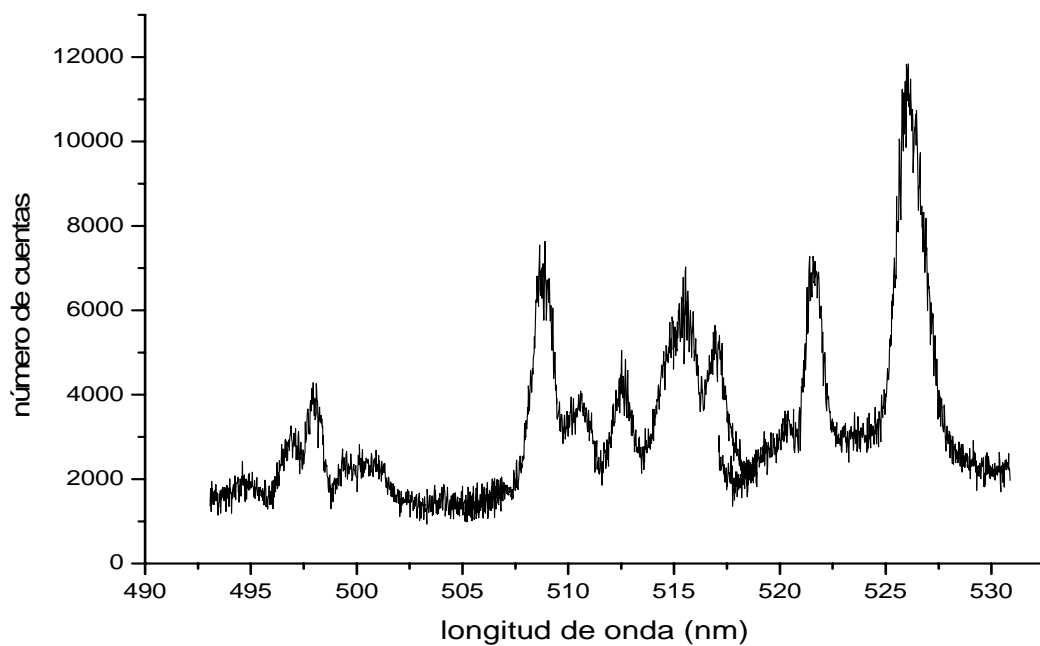


Fig. 4.25 Espectro del Isobutanol

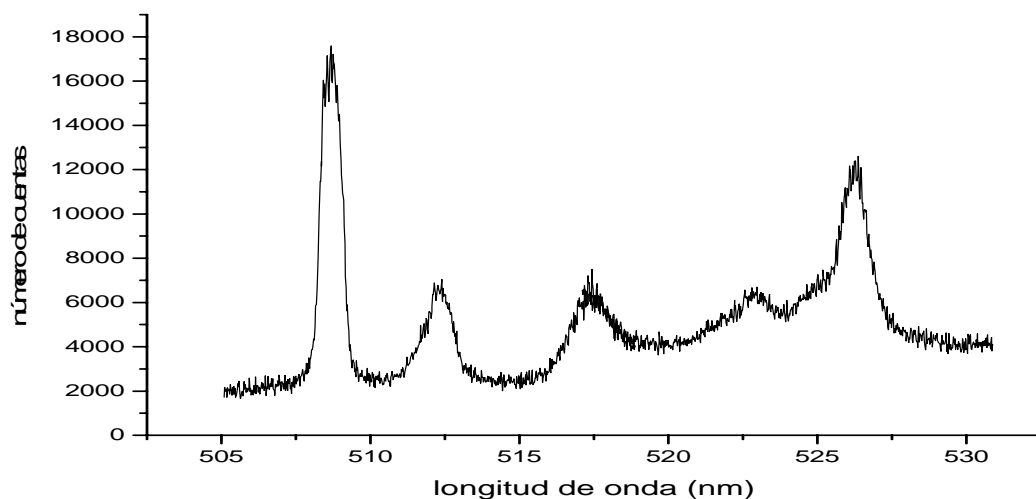


Fig. 4.26 Espectro del 2-propanol

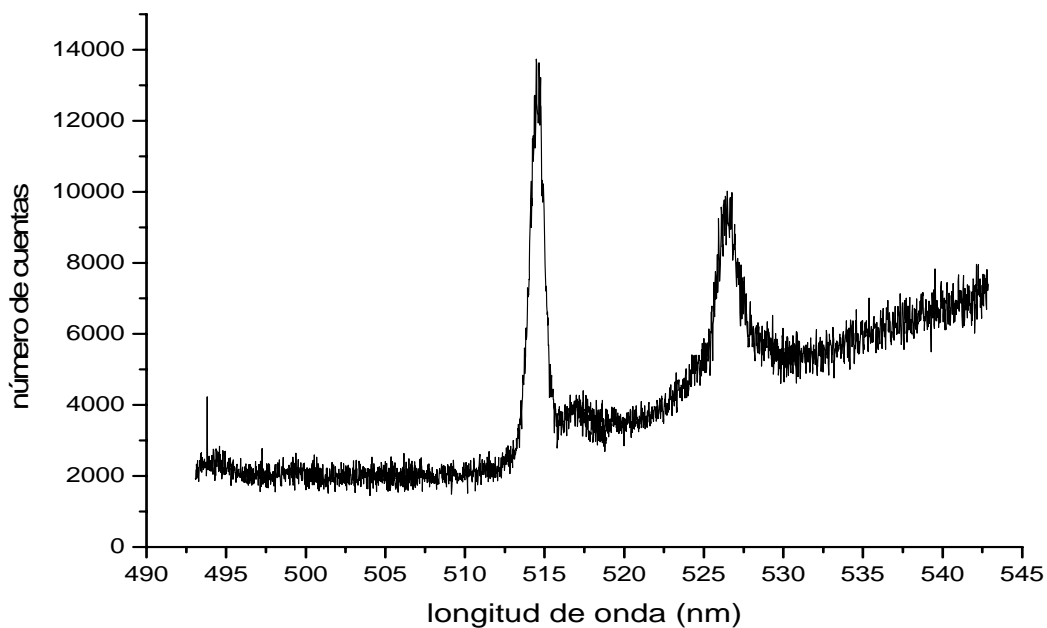


Fig. 4.27 Espectro del metanol

4.6 Espectros Raman de compuestos organolépticos a bajas concentraciones.

Los compuestos organolépticos son miscibles en agua en bajas concentraciones. Para detectar el espectro real de estos compuestos en solución, inicialmente se realizaron pruebas a fin de determinar la mayor concentración miscible para cada uno de los compuestos (tabla 4.3).

El análisis de las soluciones de compuestos organolépticos se realizó a 488 nm de longitud de onda del láser con un tiempo de incidencia de la dispersión Raman al detector de radiación de 120 segundos y una abertura de rendija de 600 μm . En este caso el número de barridos y la longitud de onda a la cual se inició cada barrido fue diferente para las diferentes soluciones de compuestos organolépticos estudiados. Los barridos se realizaron para un paso de 12 nm. En el caso de la solución de 2-furaldehído al 1%, se realizaron 4 barridos que iniciaron en 500 nm (500-542nm); el acetato metílico requirió un barrido que inició en 510 nm (504-516nm); para el 2-propanol el barrido se inició en 506 nm (500-512nm); en el caso del metanol, el barrido se inició en 514 nm (508-520nm) (figuras 4.28 hasta 4.31). El isobutanol al 3% requirió un barrido desde 524 nm (518-530nm); el 2-propanol y el metanol se obtuvieron con 2 barridos desde 512 nm (506-518nm) (Fig. 4.32 hasta 4.34).

Tabla 4.3 Pruebas de miscibilidad para soluciones de 2000 mg

Compuesto organoléptico	Miscible al 3% p/p en agua	Miscible al 1% p/p en agua
Acetato isoamílico	no	no
3-metil-1-butanol	no	si
Lactato de etilo	no	no
Isobutanol	si	si
Acetato de etilo	no	no
1-Propanol	si	si
Acetato metílico	si	si
2-furaldehído	si	si
Metanol	si	si
2-propanol	si	si
2-metil-1-butanol	no	si
2-feniletanol	no	no

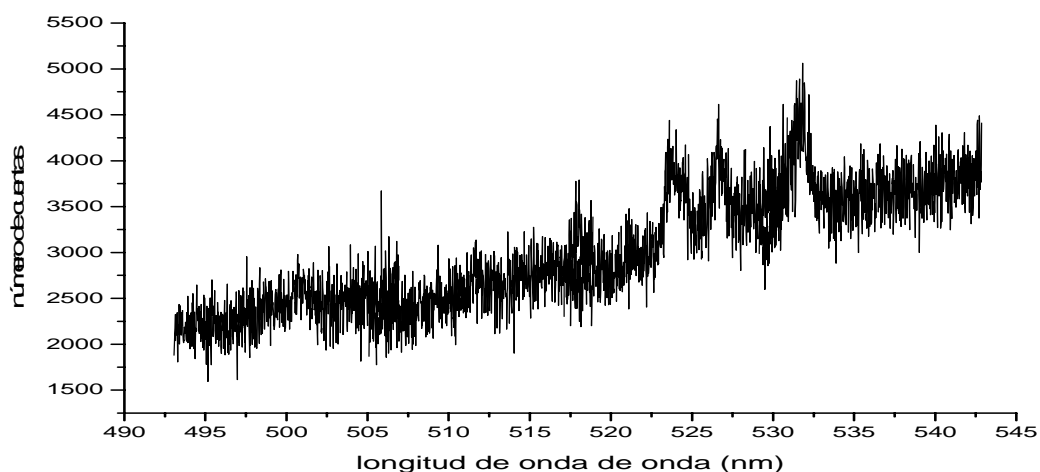


Fig. 4.28 Espectro del 2-furaldehído 1%

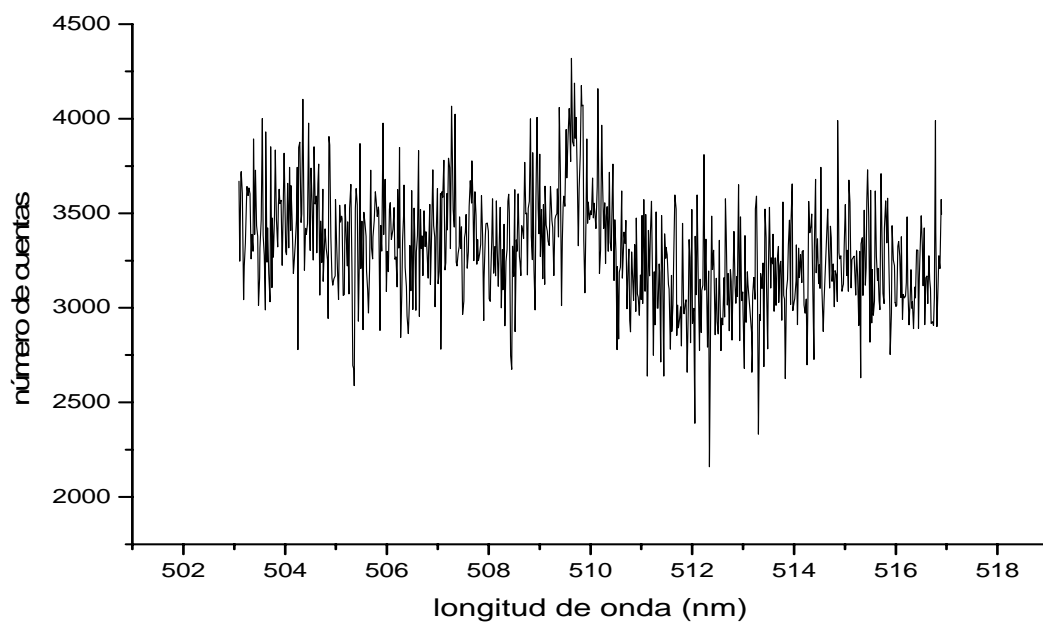


Fig. 4.29 Espectro del acetato metilico 1%

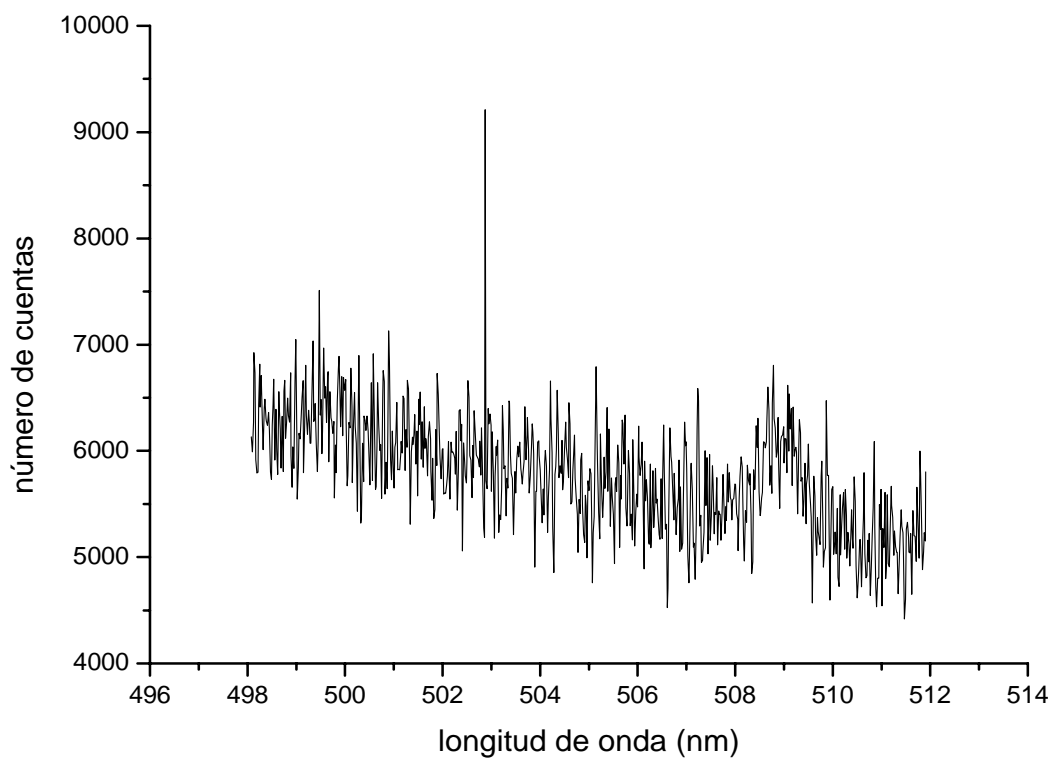


Fig. 4.30 Espectro del 2- propanol 1%

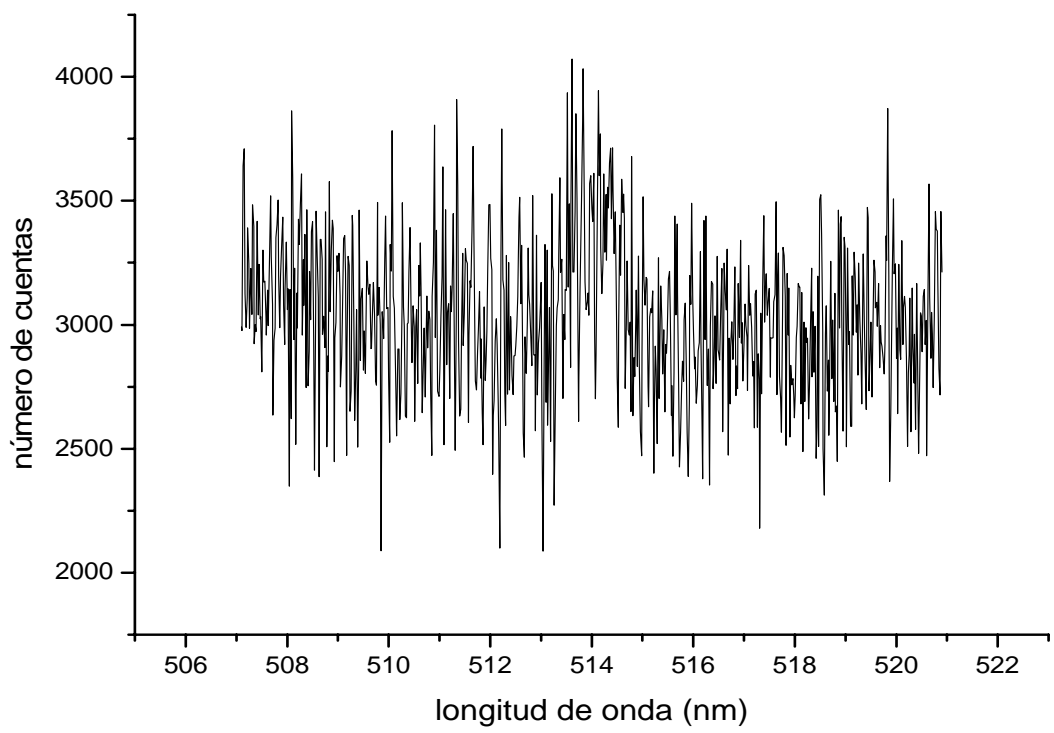


Fig. 4.31 Espectro del metanol 1%

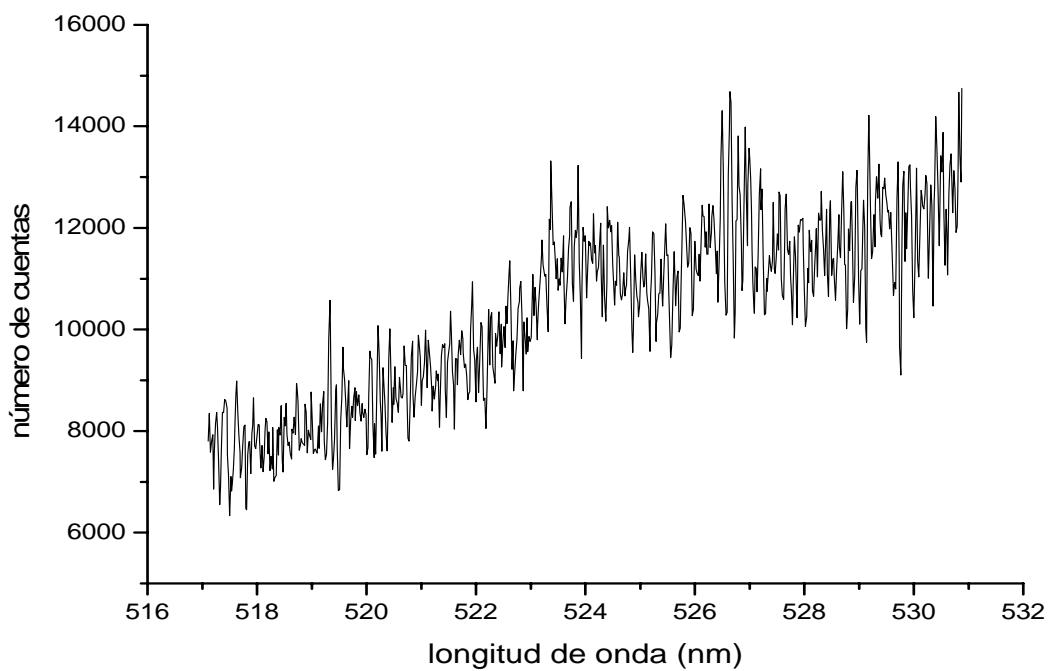


Fig. 4.32 Espectro del Isobutanol 3 %

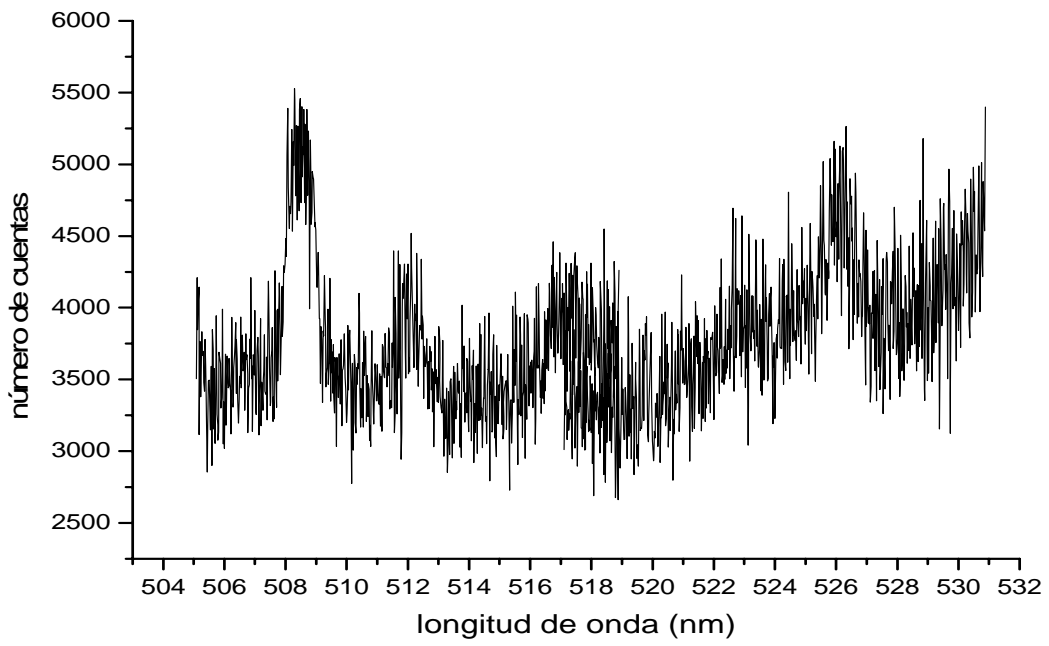


Fig. 4.33 Espectro del 2- propanol 3 %

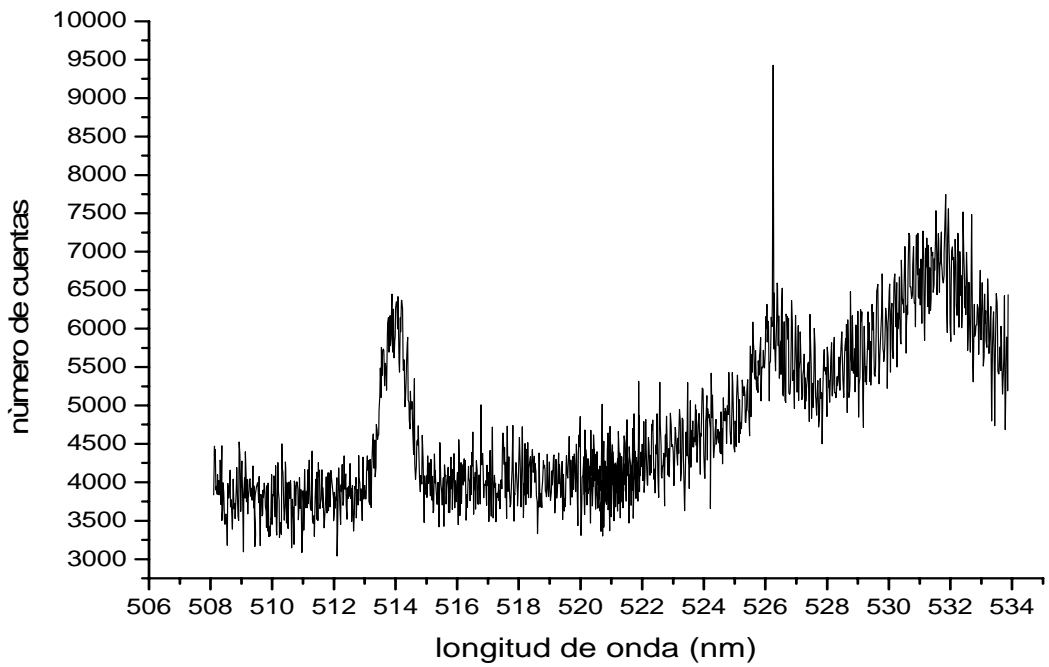


Fig. 4.34 Espectro del metanol 3 %

5. ANÁLISIS DE RESULTADOS

5.1 Análisis de los espectros del etanol.

Los picos característicos del espectro del etanol se pueden observar en la figura 4.3 y sus posiciones se especifican en la tabla 5.1. Como se puede observar la línea base en el espectro muestra una tendencia ascendente lo cual se puede explicar debido a la fluorescencia que presenta el contenedor de vidrio.

Tabla 5.1 Posición de picos Raman del etanol para las figuras 4.3 y 4.4

Número de picos	Nanómetros
1	499
2	510
3	515
4	516
5	521
6	526

Los espectros del etanol a diferentes concentraciones de la figura 5.1 muestran una tendencia descendente consecuencia de la relación directa que existe entre la concentración y la intensidad, ecuación ($I = kC$) por lo que el pico más alto en este caso el número 6 de la tabla 5.1 a 526 nm se refiere a la concentración mayor y en la misma posición el más bajo al de la concentración menor. Con esta información se puede obtener una curva de calibración en donde se relaciona la concentración con las alturas de los picos más característicos del etanol (figura 5.2).

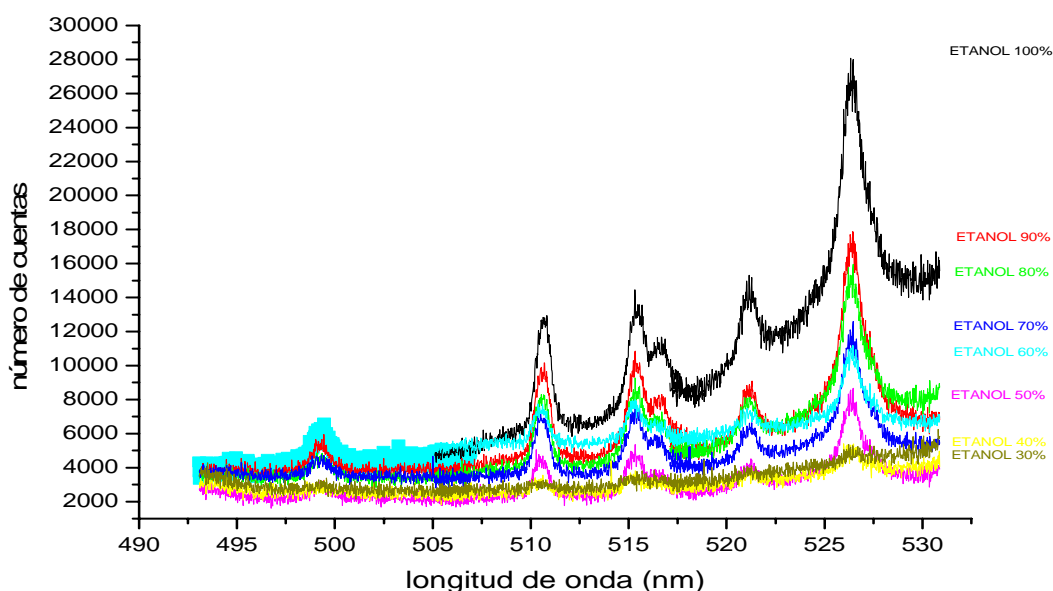


Fig.5.1. Espectros de etanol a diferentes concentraciones

Como podemos observar para las concentraciones de 90 y 80% existe una diferencia de altura entre los picos menor que la diferencia entre 100 y 90%, esto se debe a que el arreglo de incidencia del rayo láser y la toma de la dispersión a la muestra es perturbada cada vez que se realiza el cambio de esta ya que este sistema consta de postes con bases móviles que son sujetados a la mesa de trabajo mostrados en la figura 4.10, que tiene la ventaja para encontrar la posición óptima de la muestra y por otra parte tiene la desventaja de ser un sistema inestable debido a que en cierto lapso de tiempo se tiene que ajustar el sistema debido al cambio de muestras, por lo tanto se propone que una vez que se haya encontrado el arreglo óptimo se fabrique una base fija.

Para la detección de concentraciones bajas como primer paso se cambio la longitud de onda del rayo láser a 514 nm color verde con el objetivo de aumentar la intensidad y obtener una mejor respuesta de dispersión pero al obtener los espectros la fluorescencia se hizo presente tapando los picos, por tal motivo se regreso al arreglo inicial del láser azul a 488 nm.

Para los espectros del etanol de concentraciones que van del 30 al 1% que se muestran en las figuras 4.11-4.13, fue posible su detección debido a los cambios que se realizaron en el arreglo y en los contenedores de vidrio (fondo plano) para eliminar la refracción que ocasiona la curvatura de los tubos de ensaye convencionales y la adición de un objetivo de microscopio de 20X con la finalidad de focalizar la luz de forma convergente en la base de la muestra de esta forma concentrar la luz del rayo láser y mejorando la dispersión Raman, para las concentraciones menores al 10% se cambio a un objetivo de 40X mejorando aun más la señal, es importante aclarar que al aumentar la focalización con un objetivo de mayor capacidad el láser se concentra demasiado perdiendo un mayor contacto con la muestra disminuyendo la señal Raman y por tal motivo no se recomienda seguir aumentando la capacidad del objetivo más allá de 40X.

Por otra parte se hizo uso de un contenedor cilíndrico de metal con rendija para eliminar parte de la fluorescencia provocada por el recipiente que afecta a los espectros.

Cuando se requiere trabajar con concentraciones menores al 5% fue necesario abrir el tamaño de rendija del monocromador para aumentar la cantidad de luz proveniente de la fibra óptica además se aumentó el tiempo de análisis y se realizaron acumulaciones (varios barridos con las mismas condiciones) para a cada muestra con la finalidad de obtener una media para disminuir el ruido. Con todos estos arreglos solo fue posible captar el pico más intenso del etanol.

Los cambios al arreglo de incidencia-dispersión y los contenedores de vidrio se representan en la figura 4.10

Una vez que se obtuvieron todos los espectros a diferentes concentraciones se realizó la curva de calibración de diferente forma.

La primera forma de realizar la curva de calibración fue relacionar la altura de un solo pico (526 nm) con la concentración como se muestra en la figura 5.2

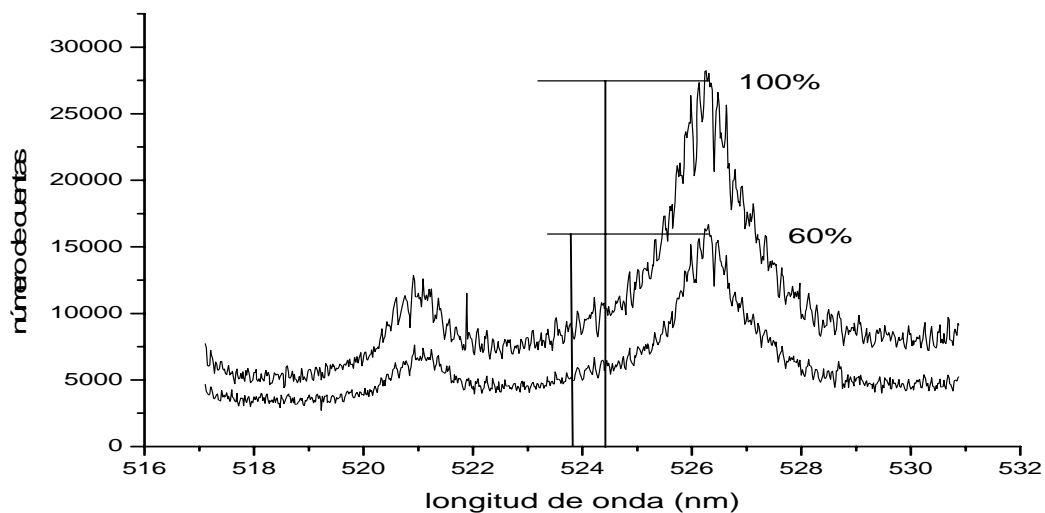


Fig.5.2. Relación de Altura de los picos a 526 nm y concentraciones (% v/v).

Tabla.5.2. Alturas contra concentración.

alturas	concentraciones
16078,88	100%
15556,85	90%
11276,11	80%
12006,96	70%
9048,73	60%
6316,71	50%
6473,32	40%
5046,4	30%
2958,24	20%
1487,82	10%
1120,65	5%
421,08	1%

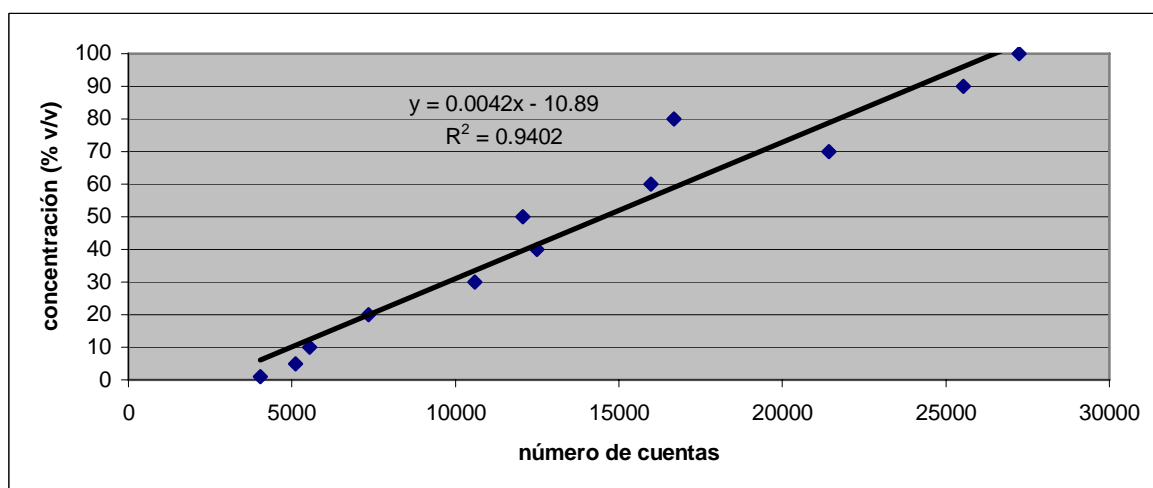


Fig. 5.3 Curva de calibración del etanol utilizando las alturas de los picos

La segunda fue calculando la diferencia de altura entre los picos a 526.29 y 521 nm (fig.5.4) y relacionándola con la concentración correspondiente. De esta forma se pudo evitar los problemas antes mencionados que eran originados por el arreglo de las muestras y que hacía que los espectros no fueran constantes para relacionar directamente la altura de los picos con la concentración (fig.5.5).

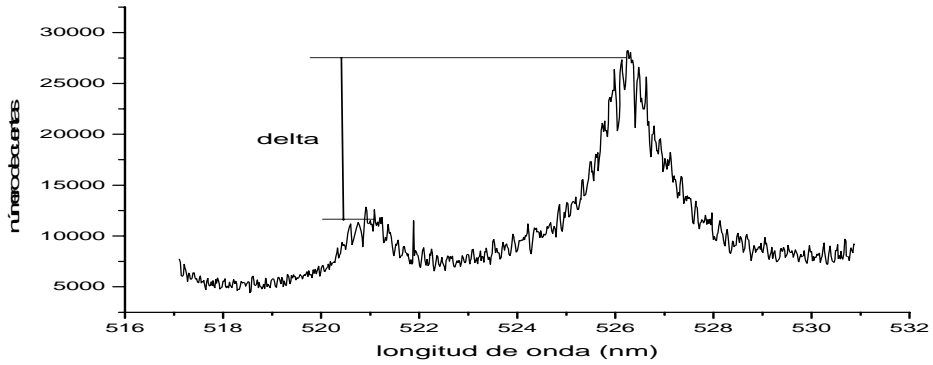


Fig.5.4. Obtención de las diferencias de las alturas.

Tabla.5.3. Deltas contra concentración.

deltas	concentraciones
16078,88	100%
15556,85	90%
11276,11	80%
12006,96	70%
9048,73	60%
6316,71	50%
6473,32	40%
5046,4	30%
2958,24	20%
1487,82	10%
1120,65	5%
421,08	1%

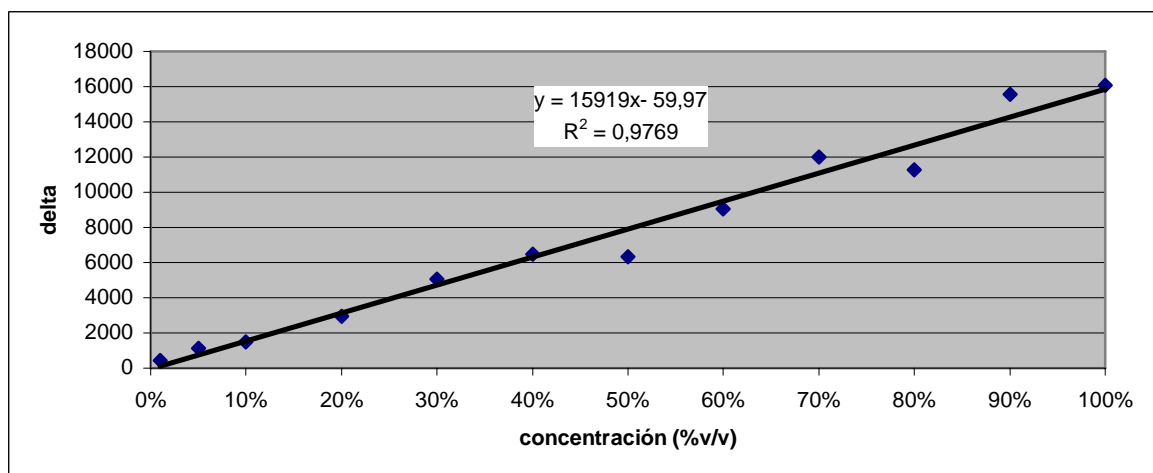


Fig. 5.5. Curva de calibración del etanol utilizando diferencias de alturas

5.2 Análisis de espectros Raman para los compuestos organolépticos.

Para los compuestos organolépticos es importante localizar las posiciones de sus picos característicos y sobre todo el más intenso ya que estos en concentraciones bajas son los únicos que se pueden detectar. Para una mezcla los picos que no son tan intensos pueden ser difíciles de observar por su cercanía con los demás componentes, por lo tanto los picos más intensos son más útiles para este tipo de análisis.

Tabla 5.4 Posiciones de los dos picos más representativos (mayor altura) para los componentes organolépticos del tequila.

Compuesto	Posición 1 (nm)	Posición 2 (nm)	Altura 1 (numero de cuentas)	Altura 2 (numero de cuentas)
Acetato de etilo	504.47	526.26	10232.19	9250.58
Acetato metílico	509.5	504.67	15682.77	10844.55
Acetato isoamílico	526.28	534.02	13386.51	8439.56
2-feniletanol	514.14	531.26	64011.79	24112.85
2-metil-1-butanol	526.29	508.94	15224.48	8563.22
2 -propanol	508.67	526.24	16310.90	11748.26
Isobutanol	526.27	508.78	10941.61	6554.74
3- metil-1-butanol	526.29	507.24	26777.84	12244.20
1-propanol	526.23	507.27	16152.44	12648.79
Metanol	514.53	526.45	12546.40	9170.55
Lactato de etilo	509.85	526.21	12317.29	11031.61
Etanol	526.5	521	12044.084	11548.72

El número de cuentas de los picos de cada compuesto depende principalmente de la polarizabilidad de las moléculas, es decir, cada uno de ellos tiene una respuesta diferente con las mismas condiciones de operación; como se puede observar para el 2-feniletanol el cual muestra un pico muy intenso superior a los 64000, sin en cambio para el acetato de etilo el pico más intenso tiene un número de cuentas mayor de 10000.

Podemos notar que la mayoría de los compuestos presentan un pico alrededor de 526 nm que podrían confundirse en el momento de el análisis del espectro de una mezcla; por este motivo se tomo otro pico de referencia que esta indicado en la tabla 5.4

Para el análisis de compuestos organolépticos en la etapa de fermentación se tienen concentraciones en ppm. Se prepararon soluciones en agua y sólo se obtuvieron por problemas de miscibilidad algunos de los compuestos. En las figuras (5.6, 5.7) se hace una comparación de los espectros al 3% y 1% p/p en el cual se puede identificar a cada uno de los componentes por sus diferentes modos de vibración (picos).

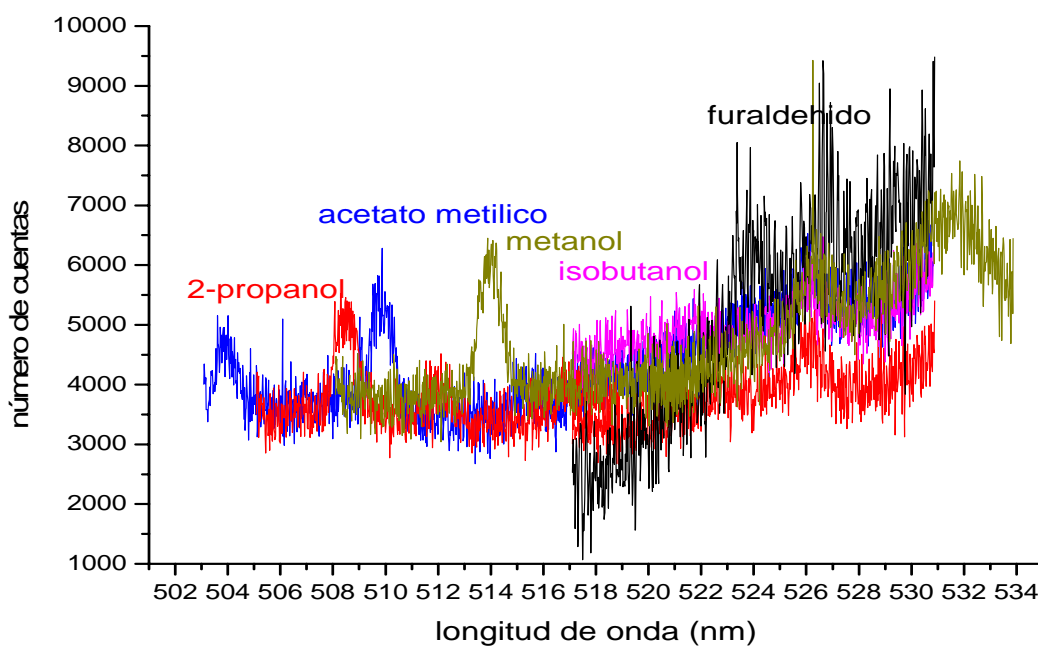


Fig.5.6. Comparación de los espectros al 3% p/p

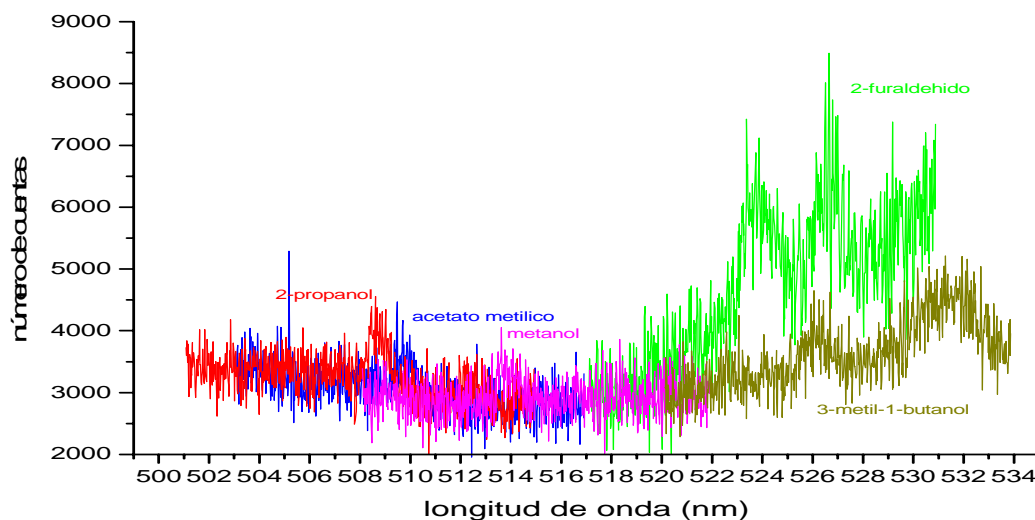


Fig.5.7. Comparación de los espectros al 1% p/p

Haciendo un análisis de las posiciones de cada uno de los diferentes picos en los gráficos (5.6 y 5.7) y corroborando en la tabla 5.4 podemos determinar a que componente se hace referencia. Estos dos gráficos pueden darnos una idea de lo que se puede observar posiblemente sin considerar problemas de fluorescencia ocasionada por la coloración en la fermentación.

6. CONCLUSIONES

Se implementó un método por espectroscopia de Raman, que permite determinar la concentración de soluciones de etanol y compuestos organolépticos comúnmente producidos durante el proceso de producción de tequila. Se analizaron sustancias puras y soluciones hasta una concentración mínima del 1%. En los procesos de producción de tequila el etanol se presenta hasta una concentración máxima del 60%. No obstante los compuestos organolépticos son producidos hasta una concentración máxima de 200 ppm. Dadas estas cifras y de acuerdo a los resultados observados, concluimos que la aplicación de la espectroscopia de Raman sería posible para el análisis de etanol. No obstante, el análisis de compuestos organolépticos demanda el uso de dispositivos de medición que permitan incrementar la sensibilidad del método sin incrementar las interferencias asociadas a las características del dispositivo de medición utilizado en este trabajo.

TABLA DE ABREVIATURAS

SIMBOLO	SIGNIFICADO
pH	Potencial de hidrógeno
nm	Nanómetro
μm	Micrómetro
CCl ₄	Tetracloruro de carbono
ppm	Partes por millón
p/p%	Por ciento peso-peso

Bibliografía

1. Skoog, Holler, Nieman, "Principios de Análisis Instrumental", quinta edición, Ed. Mc Graw Hill, Aravaca Madrid (España), 463-479, 2000.
2. CIATEJ "Ciencia y tecnología del Tequila Avances y Perspectivas", Guadalajara México, 14-115, 2004.
3. Stephen P. Gurden, Johan A. Westerhuis and Age K. Smilde, "Monitoring of batch processes Using Spectroscopy" AICHE Journal, 48, 2283-2295, 2002.
4. Eugene D. Olsen, "Métodos Ópticos de Análisis", Ed. Reverté, España, 333-379, 1990.
5. Karl Scügerl "Progress in monitoring, modeling and control of bioprocess during the last 20 years" J. Biotech. 85, 149-173, 2001.
6. Adrian D. Shaw, Naheed Kaderbhai, Alun Jones, Andrew M. Woodward, Royston, Goodacre, Jem j. "Noninvasive, on line Monitoring of the Biotransformation by yeast of glucose to ethanol using dispersive Raman Spectroscopy and Chemistries", APPLIED Spectroscopy, 55,1410-1419,1999.
7. Yu-san Huang, Takeshi Karashima, Masuyuki Yamamoto, "Raman spectroscopic signature of life in a living yeast cell",JRS, 35, 525-526, 2004.
8. Harry L.T. Lee, Paolo Boccazzi, Nathalie Gorret, "In situ bioprocess monitoring of Escherichia coli bioreactions using Raman spectroscopy",Vibrational spectroscopy, 35, 131-137, 2004
9. S. Sivakesava, J. Irudayaraj and A. Demirci, " Monitoring a bioprocess for ethanol production using FT-MIR and FT-Raman Spectroscopy",J. I. M. V, 26, 185-190, 2001.
10. Chistopher Cannizzaro, Martin Rhiel, Ian Marison, "On-line Monitoring of Phaffia rhodozyma Fed-Batch Process With In Situ Dispersive Raman Spectroscopy", Biotech. and Bioing., 83, 668-680, 2003.
11. A. Stratmann, G. Schweiger, " Fluid Phase Equilibria of Ethanol and Carbon Dioxide Mixture With Concentration measurements by Raman Spectroscopy", APPLIED SPECTROSCOPY, 783-788, 2002.