



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**“ESPECTROMETRÍA INFRARROJA MEDIA (MIR) Y RECONOCIMIENTO
DE PAUTAS PARA LA DIFERENCIACIÓN DE TEQUILAS”**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN QUÍMICA

PRESENTA:
GARCÍA MONTIEL RICARDO

ASESORA: DRA. MARÍA GUADALUPE PÉREZ CABALLERO

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Espectrometría infrarroja media (MIR) y reconocimiento de pautas para la diferenciación de tequilas.

Que presenta el pasante: Ricardo García Montiel

Con número de cuenta: 405096350 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura de Química

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 25 de Agosto de 2015.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. María Guadalupe Pérez Caballero	
VOCAL	Dra. Ana María Velázquez Sánchez	
SECRETARIO	Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez	
1er. SUPLENTE	Dr. Julio César Botello Pozos	
2do. SUPLENTE	Dra. María del Rosario Moya Hernández	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

IHM/mmgm*

AGRADECIMIENTOS

Primero que todo dedicar esta Tesis a la persona a quien más se lo debo, sin ella simplemente no hubiera podido concretarla, todo lo que soy es gracias a ella y por esto dedico este primer espacio para corresponder todo ese apoyo y cariño brindado. **Mamá, muchas gracias por todo...** ¿Qué sería de nosotros sin ti?

A mi hermana que también fue parte importante en todo esto trayecto, y a quien agradezco todo el apoyo que en su momento pudo darme. A su vez, espero este trabajo le inspire a que de igual forma concluya el suyo. Eri, yo sé que lo puedes hacer.

A Brunito, lo que más quiero.

A mi Papá, porque desde niños, a mi hermana y a mí, nos hizo a la idea de que teníamos que estudiar para salir adelante.

A mi Abu, quien me dio tan lindos momentos que hoy día guardo de manera muy especial.

A mi asesora, la Dra. Lupita, otra persona muy importante en mi formación y a quien debo agradecer todo el conocimiento transmitido, el apoyo ofrecido, pero sobre todo, la paciencia para concluir esta tesis. Infinitas gracias Dra.

A mis compañeros de carrera que hoy día considero grandes amigos: Rocío, Anabell, Lourdes, Roxana, Víctor, Claudia, José Luis y Dania.

Una satisfacción de haber estudiado una licenciatura es que te permite laborar en lugares donde tienes la fortuna de conocer grandes personas de tan diversas áreas de conocimiento de las cuales terminas aprendiendo mucho, a todos ellos gracias por el compañerismo convertido en estrecha amistad.

Parte importante de mis estudios son mis profesores, así, he de agradecerles a todos ellos el que yo hoy día pueda reconocermé como Químico. De manera especial mencionar a los profesores: María Eugenia, Guillermina, Luis Antonio, Enrique.

A mis sinodales: Dra. Ana María Velázquez, Dra. Alma Revilla, Dra. Rosario Moya y Dr. Julio Botello, por su apreciable tiempo y sus valiosos comentarios respecto a este trabajo.

Al Dr. Juan Manuel Andrade, que con las observaciones que nos hacía, nos guiaba en el correcto análisis quimiométrico.

Por último, a mi Universidad, la enorme UNAM, pues fue en ella donde pude cumplir uno de mis más grandes anhelos. Así, he de agradecer a mi Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, por darme la formación profesional necesaria que, estoy seguro, no hubiera podido recibir en ninguna parte más.

POR MÍ RAZA HABLARÁ MÍ ESPÍRITU.

ÍNDICE

	Pagina
Introducción.....	5
Objetivos.....	7
Marco Teórico.....	8
1. El Tequila.....	8
• ¿Qué es el tequila?.....	8
• Clasificación de tequilas.....	9
• Antecedentes del tequila	10
• Proceso de elaboración de tequila.....	11
• Compuestos presentes en los tequilas.....	13
2. Infrarrojo Medio (MIR).....	14
3. Quimiometría.....	18
• ¿Qué es la Quimiometría?.....	18
• Importancia de la Quimiometría.....	18
• Tipos de análisis quimiométricos.....	20
• Análisis de Componentes Principales (PCA).....	20
• Análisis Clúster.....	21
Desarrollo Experimental.....	23
• Material y equipo.....	23
Resultados y Análisis.....	25
Conclusiones.....	48
Anexos	49
Bibliografía.....	52

INTRODUCCIÓN

El Tequila

La calidad de un tequila depende en gran medida del tipo de agave utilizado, del proceso de elaboración y de su tiempo de reposo. Sin embargo, hoy en día, son más frecuentes las adulteraciones en los tequilas, debido al incremento de la demanda en el mercado a nivel internacional, la cual ha elevado su valor comercial [1].

Se definen diversas clases de tequilas de acuerdo a los porcentajes de azúcares provenientes del agave variedad azul o de otros tipos de agave. Existen los denominados tequilas 100% agave, los cuales sólo contienen azúcares provenientes del *Agave tequilana Weber*, variedad azul. Los tequilas mixtos o denominados simplemente tequilas, que además de originarse de azúcares del agave variedad azul, pueden elaborarse a partir de azúcares de otras especies de agave u otras fuentes, en una proporción no mayor del 49%. Estas variedades de tequilas están reguladas por la NOM-006-SCFI-2005 [2]. Durante la producción del tequila, el tiempo de maduración o reposo da como resultado tequilas de diferente clase. Tequilas blancos, reposados, añejos y extra añejos. Las barricas y el tipo de madera, ya sea roble o encino, proporcionan al tequila, algunas sustancias que modifican su color, olor y sabor [2,3]. Es importante hacer notar que la edad de las barricas es un factor esencial durante el proceso de maduración, ya que las barricas con muchas posturas o barricas viejas, no serán tan efectivas como las barricas nuevas, aún si el tiempo de maduración se prolonga [1].

Infrarrojo Medio (MIR)

El análisis por IR es una técnica espectrométrica que presenta muchas ventajas respecto a otro tipo de técnicas analíticas, ya que no es una técnica invasiva y no requiere de un pretratamiento de las muestras que genere el dispendio de solventes o reactivos. Es muy viable para el análisis de los tequilas por lo que se eligió para su estudio [9].

Quimiometría

La Quimiometría nace aproximadamente en 1975 con los profesores Bruce Kowalski (Seattle, Washington) y Svante Wold (Suecia) y se define **de la siguiente manera:** "Es la aplicación de métodos estadísticos y matemáticos a los problemas químicos con el objetivo de extraer la

máxima y más útil información de los mismos” [4]. Contreras Loera [6] y Barbosa García [8] han aplicado técnicas quimiométricas al análisis de tequilas.

El análisis de componentes principales (PCA) es un procedimiento matemático, no supervisado, que reduce la dimensionalidad de un conjunto de datos mediante la consideración de las relaciones entre las variables experimentales y extrae información para observar las muestras. Para ello es necesaria la definición de unas nuevas variables matemáticas llamadas componentes principales, PCs. [5].

El análisis clúster (CA) es una herramienta exploratoria no supervisada empleada para revelar relaciones entre muestras. Esta técnica permite encontrar grupos de muestras (alternativamente, variables). Por lo que un clúster se puede definir como un grupo de muestras más o menos homogéneas (similares) las cuales, a su vez, pueden ser diferenciadas de otros grupos de muestras [5].

Estas técnicas quimiométricas también ayudan a relacionar variables que describen el comportamiento de fenómenos químicos, biológicos y tecnológicos [10].

En el presente trabajo el objetivo principal es aplicar las técnicas antes descritas en el análisis de tequilas a fin de diferenciarlos en sus clases (blancos, reposados y añejos), es decir, en función de su grado de añejamiento. También es posible que se logre obtener otro tipo de información en relación a la calidad y el grado de abocamiento. Este análisis se llevará a cabo mediante el uso del programa computacional GenEx. Este proceso involucra el uso de matrices de datos integradas por los espectros de IR de cada tequila. Dichos espectros pueden ser los originales o bien llevar un tratamiento derivativo. Asimismo, dentro de los tratamientos se puede optar por escalados, uso de diferentes intervalos de longitud de onda, etc. para lograr una diferenciación óptima. Ya que el programa arroja resultados es trabajo del investigador llevar a cabo el análisis y la interpretación de éstos.

OBJETIVOS

Objetivo General

Establecer modelos para realizar la diferenciación entre tequilas de acuerdo a su tiempo de reposo, como tequilas blancos, reposados y añejos por medio de la Espectrometría Infrarroja Media (MIR) y técnicas quimiométricas de exploración (Análisis de Componentes Principales y Análisis Clúster) para la posible determinación de adulteración y que éstos sean rápidos y simples con respecto al método de la Norma Mexicana.

Objetivos Particulares

- Llevar a cabo un Análisis de Componentes Principales (PCA) a partir de datos espectrométricos de Infrarrojo Medio (MIR), con el fin de evaluar la agrupación de los tequilas por clase (blancos, reposados y añejos).
- Realizar un Análisis Cluster para la clasificación de tequilas de acuerdo a su clase (blancos, reposados y añejos).
- Analizar los *Scores*¹ para encontrar pautas internas de los tequilas en función de su calidad y grado de reposo.
- Analizar los *Loadings*¹ para identificar las relaciones existentes entre las variables y la estructura química de compuestos que pudieran participar en la discriminación de los tequilas.

¹ La explicación de estos términos está contenida en el Marco Teórico dentro del apartado de Quimiometría.

MARCO TEÓRICO

1. El Tequila

El tequila es sin lugar a dudas, uno de los productos con el que más se reconoce a México en la mayor parte del mundo. Su presencia en los mercados internacionales (aunque no es nueva), se ha visto fortalecida en los últimos años a raíz de una serie de medidas estratégicas que sitúan al tequila en el gusto de los consumidores, no sólo como bebida combinada en forma de "margaritas", sino también como bebida de elevada calidad que se toma directamente.

El Estado de Jalisco, ubicado en el occidente de México es la entidad que provee más elementos mexicanos de reconocimiento internacional, como la charrería, el mariachi y el tequila. Este estado es la cuna de esta bebida al ser el principal productor de su materia prima, el *Agave tequilana Weber* variedad azul, ya que en este territorio se cultiva el 99.7 por ciento del total.

El tequila es una bebida alcohólica típicamente mexicana, obtenida por la fermentación¹, destilación y rectificación de mostos preparados con los azúcares extraídos de las cabezas del *Agave tequilana Weber* variedad azul, permitiéndose adicionar hasta un 49 por ciento de otros azúcares (de caña de azúcar o de otros vegetales) en la preparación de dichos mostos.

La producción del tequila comprende dos fases distintas: la agrícola (de siembra y cultivo de la planta) y la industrial.

La fase agrícola comprende actividades como preparación de almácigos, preparación de la tierra y labores tales como fertilización, limpieza, barbeo o corte de hojas o pencas para protección, etc. El crecimiento de la planta dura entre ocho y diez años para estar en madurez, luego de lo cual se cosecha la piña, la cual se transporta a la planta industrial para su transformación. Los procesos por los que pasa son la cocción, trituración, fermentación y destilación, de donde resulta el tequila como bebida.

¹ La fermentación es un proceso metabólico de tipo anaerobio realizado principalmente por microorganismos en el cual la glucosa se oxida en productos como etanol o ácido láctico.

Clasificación de tequilas

Dependiendo de sus características, el tequila se clasifica en cuatro tipos:

- 1) Tequila blanco: es el producto obtenido de la destilación y rectificación, ajustado con el agua de dilución a su graduación comercial. Es la presentación más barata.
- 2) Tequila joven abocado: es el mismo que el tipo blanco, sólo que se realiza el proceso de abocado consistente en suavizar el tequila mediante la adición de uno o más suavizantes y colorantes permitidos por la Secretaría de Salud de México.
- 3) Tequila reposado: es aquel que se almacena en recipientes de madera de roble o encino durante por lo menos dos meses y que es susceptible de ser abocado.
- 4) Tequila añejo: si el tiempo de maduración es de 18 meses, se produce el tequila añejo que es el más caro en el mercado; también es susceptible de ser abocado y ajustado con agua de dilución a su graduación comercial.

El tequila es reconocido internacionalmente por su denominación de origen, por lo que para tal efecto está sujeta a la Norma Oficial Mexicana, lo cual obliga a todos los productores a ser supervisados por distintos organismos oficiales, además del Consejo Regulador del Tequila, A. C., el cual se encarga de certificar la calidad de cada uno de los productos, con la ayuda del laboratorio de la Cámara Regional de la Industria Tequilera.

De acuerdo con la Norma Oficial Mexicana existen dos tipos de tequilas en sus diferentes versiones:

- 1) El Tequila mixto ó 51-49, que se produce a partir de 51 por ciento de azúcares obtenidos del *Agave tequilana Weber* variedad azul y el 49 por ciento restante de otros azúcares. Este se puede encontrar en sus versiones blanco, joven abocado, reposado y añejo.
- 2) El tequila 100 por ciento agave, el cual se define por sí solo, pues se obtiene en su totalidad a partir de los azúcares del *Agave tequilana Weber* variedad azul. Éste se puede encontrar en sus presentaciones, blanco, reposado y añejo.

Para distinguir estos dos productos, deberá ir en la etiqueta la leyenda de 100 por ciento agave para el segundo y para el primero sólo dirá *tequila*. Además, el tequila 100 por ciento agave debe ser envasado en México, por lo que deberá adicionarse en la etiqueta las leyendas "Envasado de Origen" y "Elaborado y Envasado bajo la Vigilancia del Gobierno Mexicano".

Antecedentes Históricos del Tequila

Cuenta la leyenda que algunos indios nahuatlacas que habitaban en lo que hoy es Jalisco, comenzaron a cocer los agaves en hornos bajo tierra, de los que después de macerarlos con piedras y fermentarlos con agua obtenían un licor fuerte muy apreciado por ellos. Con la llegada de los españoles, el jugo fermentado del agave se destilaba en aparatos de cobre, obteniendo un aguardiente espeso que fue del gusto de los conquistadores. En 1758 se le concedieron a José Antonio Cuervo, por orden del Corregidor de Nueva Galicia, extensas tierras en la finca de Villoslada, Jalisco. En 1795, José María Guadalupe Cuervo recibió del rey de España la primera concesión para producir tequila.

En la primera mitad del siglo XIX, José María Castañeda, estableció la fábrica de vino mezcal "La Antigua Cruz" (posteriormente llamada La Perseverancia), la cual fue adquirida en 1873 por Cenobio Sauza, quien ese año inició la exportación a Estados Unidos. Para 1889 la fabricación del tequila en Jalisco ya se había convertido en una de las principales industrias, existiendo en ese año 36 fábricas.

En el siglo XX, a raíz del reparto agrario, se redujo drásticamente la plantación de agave; sin embargo, la segunda guerra mundial permitió la reactivación de la industria aunque fuera sólo de manera temporal, puesto que al terminar dicha guerra la demanda de nuevo tuvo una caída drástica que pudo ser solventada gracias a la expansión del mercado nacional, que permitió incrementar la producción en 8.6 por ciento anual entre 1950 y 1970. Desde la década de los cincuenta, dos empresas se perfilaron como las líderes: Cuervo y Sauza, destilándose el 90 por ciento del tequila producido en dicho estado en el municipio de Tequila, donde en 1930 había ocho destilerías y en 1954 se incrementaron hasta quince. Actualmente, el tequila es una bebida mexicana protegida por la denominación de origen, la cual abarca a todo el estado de Jalisco, 29 municipios de Michoacán, seis de Guanajuato y siete de Nayarit, todos ubicados en el centro y

occidente del país, además de 10 municipios del estado de Tamaulipas (Figura 1). Sin embargo, es una bebida eminentemente jalisciense [13].

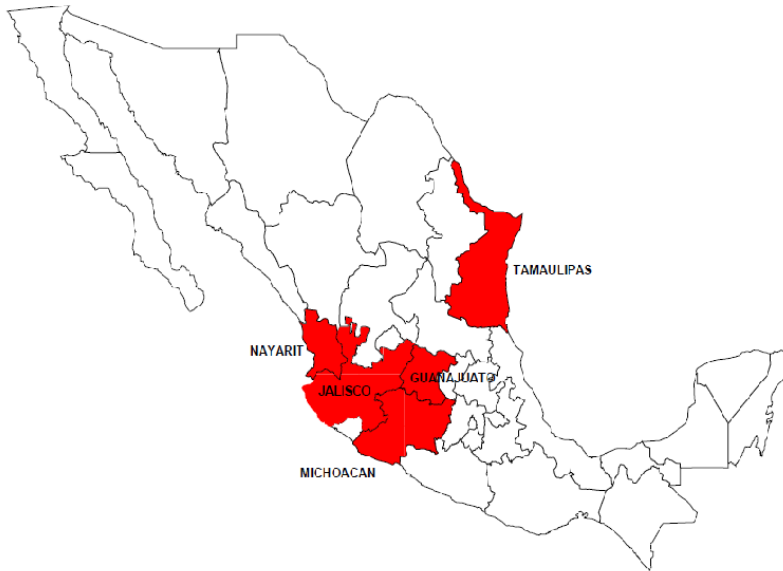


Figura 1. Estados donde se puede producir *Agave tequilana Weber* variedad azul protegidos por la denominación de origen.

Elaboración del Tequila

La primera parte de este proceso es la selección de "hijuelos" (Figura 2) de la especie *Agave tequilana Weber* variedad azul, para ser plantados únicamente en el territorio de denominación, zona protegida por la Declaración General de Protección a la denominación de origen. Estos hijuelos deben estar libres de enfermedades y con una altura aproximada de 50 cm. El resto de las plantas son utilizadas para la elaboración de tequila. La recolección se lleva a cabo cuando la planta alcanza su plena madurez, es decir, cuando es capaz de alcanzar las mejores mieles, y está lista para la jima. La jima consiste en cortar las hojas de la planta al ras de la base de manera manual (quien esto hace es conocido como Jimador), para dejar únicamente la cabeza o corazón del agave, que es la materia prima para la elaboración del tequila.



Figura 2. Hijuelos

Una vez que se corta del agave el corazón leñoso o piña se lleva a la fábrica, en donde sigue un proceso de elaboración, que se puede dividir en los siguientes pasos:

1) **Cocción:** las piñas se parten y se introducen en un horno. El proceso de cocción dura alrededor de 48 horas y durante este tiempo se le inyecta vapor de agua al horno. La cocción permite la descomposición de los azúcares y de esta manera el mosto (jugo de agave) queda listo para la fermentación.



Figura 3. Cocción

2) **Molienda:** una vez que se ha cocido, la piña es triturada para extraer el jugo del agave. Se usan molinos de piedra, trituradoras o molinos de acero inoxidable. El proceso se inicia pasando el agave cocido por el molino para desmenuzarlo y posteriormente se prensa para extraer el jugo. Finalmente se añade agua para extraer mejor los azúcares. Con el jugo del agave se forma el mosto o caldo de fermentación.

3) **Fermentación:** el mosto se inocula con levadura

(*Saccaromyces cerevisiae*),

comenzando la fermentación para producir alcohol y otros componentes



Figura 5. Fermentación



Figura 4. Molienda

característicos del tequila. La temperatura se mantiene entre 30°C y 45 °C durante un periodo de 12 a 72 horas.



Figura 6. Destilación

4) **Destilación:** se llevan a cabo dos destilaciones consecutivas del mosto. Generalmente se utilizan alambiques (cobre, acero inoxidable o acero inoxidable con refrigerante de cobre), y aunque es poco común, destilación en columnas. En la primera destilación se obtienen tres productos: las cabezas, que generalmente se reciclan con el fermentado para ser redestilado; la cola, llamada vinaza que se elimina del proceso y el ordinario (cuyo contenido de etanol está entre el 20-30% (v/v) de

alcohol). Posteriormente, el ordinario se pasa a otro alambique para llevar a cabo la segunda destilación. En este paso se obtienen también tres productos: la cabeza, que se elimina, la cola, que puede ser reciclada y el destilado, que es el producto final de la destilación, cuyo contenido en etanol es de alrededor del 55% (v/v). Después se diluye con agua hasta, aproximadamente un 38% de alcohol dependiendo la tequilera.

- 5) **Embotellado**: una vez obtenido el producto final se envasa directamente (si el tequila es de tipo blanco) o se almacena en barricas (Figura 7) para su maduración (si el tequila es de tipo reposado o añejo) [14].



Figura 7. Barricas (izquierda) donde se deja en reposo el tequila. Clases de tequila (derecha): blanco, reposado y añejo.

Compuestos presentes en los Tequilas

Se conoce que los tequilas contienen un sinnúmero de compuestos volátiles que producen el característico color y olor de los tequilas. Por su parte, los tequilas reposados y añejos adquieren otros compuestos adicionales durante el proceso de reposo en las barricas en función de su tiempo de reposo. Es así, que la variedad y concentración de este tipo de compuestos puede hacer la diferencia entre un tequila blanco, uno reposado y uno añejo.

Los compuestos mayoritarios presentes en el tequila son: el etanol, alcohol isoamílico, fenil etanol, entre otros alcoholes superiores y entre los ácidos están el acético, decanoico y dodecanoico [15].

2. Infrarrojo Medio (MIR)

La Espectrofotometría Infrarroja tiene casi 125 años de existencia. El primer espectro de vibraciones moleculares se observó en 1881 por Abney y Festing quienes prepararon emulsiones fotográficas sensibles al infrarrojo cercano y fotografiaron el espectro de absorción de 48 líquidos orgánicos. Encontraron bandas características en estos espectros, las cuales asociaron con la presencia de hidrógeno en las moléculas estudiadas. En 1892, Julius obtuvo el espectro infrarrojo de 20 compuestos orgánicos, encontrando que todos los compuestos que contienen metilo (CH_3) exhiben una banda de absorción de $3.45 \mu\text{m}$ y llegó a la conclusión de que la absorción de 'ondas caloríficas' se debe a movimientos intramoleculares; en otras palabras, la estructura interna de la molécula determina el tipo de absorción. También encontró que el efecto no es 'aditivo'; es decir, que no se puede predecir el espectro de absorción de un compuesto a partir del conocimiento de los espectros de los átomos constituyentes [16].

La espectroscopia vibracional fue una de las primeras técnicas espectroscópicas que encontró un uso extendido, en particular la espectroscopia de absorción infrarroja (IR) que recibe su nombre de la región del espectro electromagnético implicado (Figura 8). Hay una segunda forma de espectroscopia vibracional (Raman) que se sustenta en un fundamento físico diferente y proporciona información similar y complementaria al IR. La región IR del espectro electromagnético se encuentra entre $12800\text{-}10 \text{ cm}^{-1}$.

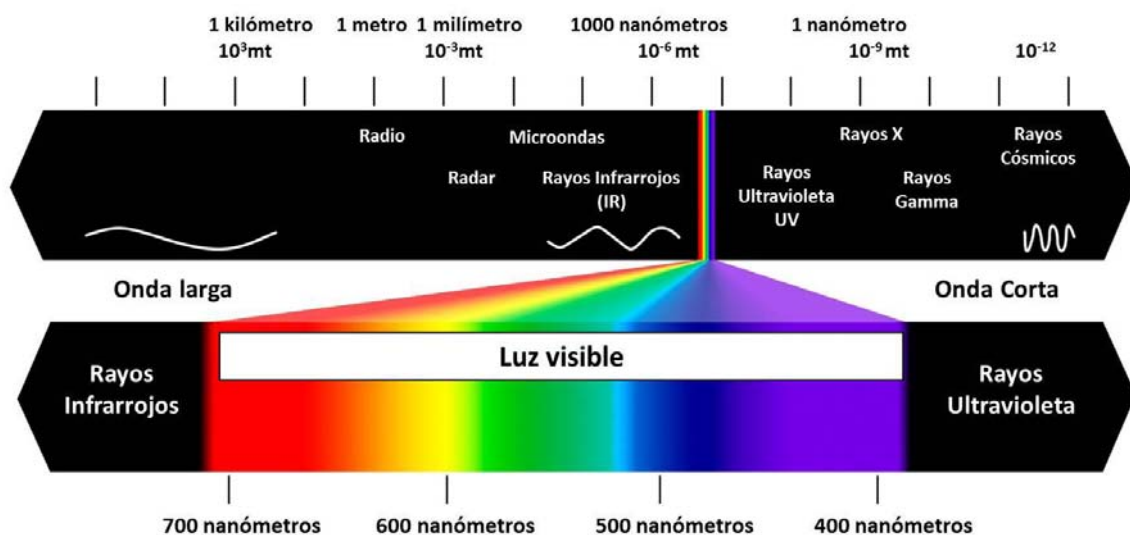


Figura 8. Espectro electromagnético de la luz [18].

Tanto desde el punto de vista de las aplicaciones como de los aparatos se puede dividir en tres zonas: IR cercano (NIR): $12800-4000\text{ cm}^{-1}$, IR medio: $4000-400\text{ cm}^{-1}$ (MIR) e IR lejano: $400-10\text{ cm}^{-1}$ (FIR), siendo en el IR Medio (MIR por sus siglas en inglés) donde se dan la mayoría de las aplicaciones analíticas tradicionales, aunque desde la década de los 80 la utilización del NIR ha experimentado un innegable auge. El IR requiere una mínima o nula preparación de la muestra y ofrece un análisis cuantitativo sin consumir o destruir la muestra. Con frecuencia se combina con un espectrofotómetro Visible-Ultravioleta y dispositivos de fibra óptica para análisis remoto, encontrando especial interés en control de procesos.

Por su parte, el IR lejano requiere el uso de fuentes y materiales ópticos especiales. Se emplea para el análisis de compuestos orgánicos, inorgánicos u organometálicos que contengan átomos pesados (masa atómica superior a 19) y proporciona información útil en estudios estructurales.

Por lo que respecta al IR medio, existen espectrofotómetros comerciales desde 1940, aunque los avances más significativos en la técnica se produjeron con el desarrollo de instrumentos que incorporan el método de transformada de Fourier (FT-IR), que ha mejorado la calidad de los espectros y minimizado el tiempo requerido para la obtención de datos. Hoy en día, casi todos los instrumentos utilizados en espectroscopia infrarroja están equipados con sistema de análisis que utilizan transformadas de Fourier de haz sencillo.

Una de las grandes ventajas de la espectroscopia IR es su versatilidad, ya que permite estudiar prácticamente cualquier muestra con independencia del estado en que se encuentre: líquidos, disoluciones, pastas, polvos, fibras, películas, gases o superficies son algunos ejemplos.

Como en otros procesos de absorción de radiación electromagnética, la interacción de la radiación infrarroja con la materia provoca un cambio en ella. En el caso que nos ocupa, los cambios ocurren en el estado vibracional de las moléculas. El espectro vibracional de una molécula se considera una propiedad física única y por tanto característica de esta molécula. Así, entre otras **aplicaciones, el espectro IR se puede usar como "huella dactilar" en la identificación de muestras desconocidas mediante la comparación con espectros de referencia.**

Los espectros son a menudo complicados y resulta difícil asignar cada una de las bandas que aparecen en ellos a movimientos atómicos específicos. Esto no es siempre necesario para extraer **información muy valiosa, de modo que el conocimiento "incompleto" de los espectros no disminuye su utilidad para realizar análisis cuantitativos y cualitativos.** De hecho, la espectroscopia

IR junto a la espectrometría de masas y la resonancia magnética nuclear, forman la base del análisis orgánico cualitativo contemporáneo centrado en la identificación de la estructura molecular de compuestos y mezclas desconocidas. También es cada vez de mayor relevancia el IR en el campo del análisis cuantitativo, en el que la estimación de contaminantes atmosféricos provenientes de los procesos industriales ocupa un lugar relevante.

Como primera aproximación, un espectro IR se obtiene al pasar radiación a través de una muestra y se determina la fracción de esta radiación incidente que ha sido absorbida. La energía particular a la que aparece cada banda en un espectro guarda relación con la frecuencia de vibración de una parte de la molécula.

Las características más relevantes de la espectrometría Infrarroja son las siguientes:

1. Si dos moléculas están constituidas por grupos funcionales distintos, o tienen distinta distribución isotópica, configuración, o se encuentran en ambientes distintos, los espectros infrarrojos serán distintos.
2. Una sustancia definida puede identificarse por su espectro infrarrojo. Estos espectros pueden ser considerados como las huellas digitales de dicha sustancia.
3. Los espectros muestran bandas que son típicas de grupos funcionales particulares y que tienen localizaciones e intensidades específicas dentro de los espectros infrarrojos
4. A partir de los espectros se pueden inferir los grupos funcionales que contribuyen en una molécula o compuesto.
5. Las intensidades en las bandas del espectro de una mezcla son generalmente proporcionales a las concentraciones de las componentes individuales. Por lo tanto, es posible determinar la concentración de una sustancia y realizar análisis de muestras con varias componentes.
6. Es posible, mediante el uso de dispositivos experimentales adecuados, obtener espectros infrarrojos sin alteración de la muestra, lo que constituye a esta espectrometría como una herramienta de análisis no destructiva.
7. El tiempo necesario para obtener y almacenar un espectro infrarrojo es del orden de minutos.

La espectroscopia en la región del infrarrojo medio (que comprende de $4000-400\text{ cm}^{-1}$ del espectro electromagnético) es una de las técnicas analíticas disponibles más importantes para

conseguir información sobre aspectos cualitativos y cuantitativos de analitos en tiempo real en los procesos de manufacturación

Una razón fundamental para el atractivo de la espectroscopia infrarroja es la espectroscopia de transformada de Fourier (FTIR) que se desarrolló para superar las limitaciones encontradas con los instrumentos dispersos.

La técnica de la espectrometría infrarroja está ampliamente extendida en el mundo de la industria ya que está relacionada con diferentes áreas de aplicación: agricultura, biotecnología, cosméticos, ciencias de la tierra, de la atmósfera y mineralogía, control medioambiental, alimentos y bebidas, ciencia forense, medicina y química clínica, industria del petróleo, industria farmacéutica, ciencia de los polímeros, ciencia de los materiales, etc. Como se observa las aplicaciones son innumerables y para los fines de este trabajo hablaremos un poco, a guisa de ejemplo, lo relacionado al uso de la espectroscopia infrarroja en el análisis de bebidas.

Las aplicaciones de la espectroscopia del infrarrojo medio en la alimentación y en las bebidas son bastante amplias, como lo muestra Duarte y col. [11], quienes aplican la espectroscopia FTIR para el control de calidad de 50 tipos de cerveza. De este modo se puede identificar los parámetros espectrales que pueden proporcionar información sobre los factores que afectan a la calidad de la producción de las cervezas.

Lachenmeier [7] describe el uso de la espectrometría FTIR en combinación con el análisis multivariante de datos para el control de calidad y la evaluación de autenticidad de diversas bebidas alcohólicas y cervezas, en controles alimentarios oficiales. Solo dos minutos son necesarios para la medida en FTIR. Para las bebidas alcohólicas ni siquiera es necesaria una preparación de la muestra, para las bebidas con CO₂ como la cerveza es necesario quitar primero el gas. Los resultados obtenidos sugieren que la espectroscopia FTIR es una técnica útil en el control de bebidas alcohólicas, ya que es posible realizar simultáneamente la determinación cuantitativa de componentes esenciales.

También el uso de la técnica FTIR en el análisis de vinos ha sido muy bien estudiada [12].

La técnica de espectroscopia por FT presenta una serie de características que la hacen más adecuada en algunas aplicaciones en las que otras técnicas tendrían problemas.

Permite, por ejemplo, medir la longitud de onda de forma absoluta sin necesidad de hacer **medidas de referencia o calibrados en λ como ocurre con otras técnicas (monocromador,**

interferómetro Fabry-Perot). En esta propiedad reside el éxito de la técnica no como espectrómetro, sino como medidor de longitudes de onda.

Además, a diferencia de otros montajes, no utiliza elementos dispersores para determinar el espectro (redes de difracción, prismas, etc.) por lo que, en principio, al detector le llega una cantidad de luz mucho mayor, consiguiendo una relación señal/ruido superior (ventaja multiplex). Por este motivo, resulta muy útil a la hora de medir espectros de fuentes débiles, por ejemplo, en astronomía.

Finalmente, con un Michelson ideal no existe, en principio, el problema de otras técnicas como el interferómetro de Fabry-Perot del intervalo espectral libre. Es por ello que, de una sola medida con el Michelson se podría determinar el espectro completo de la fuente.

3. Quimiometría

En 1975, *The Chemometrics Society*, definió la **Quimiometría** como: **"la disciplina química que utiliza los métodos matemáticos y estadísticos para diseñar o seleccionar procedimientos de medida y experimentos óptimos, y para proporcionar la máxima información química mediante el análisis de datos químicos"**. **D. L. Massart la define como: "la disciplina química que utiliza la matemática, la estadística y la lógica formal para diseñar o seleccionar procedimientos experimentales óptimos, proporcionar la máxima información química relevante a partir del análisis de datos químicos y obtener conocimiento a partir de sistemas químicos"**.

La Quimiometría mejora el rendimiento del proceso analítico en todas sus etapas, y asegura la calidad de los resultados. Una vez obtenidos los datos, el tratamiento de los mismos permite aumentar la calidad de los resultados, facilitar su interpretación y fundamentar las conclusiones con rigor. La Quimiometría genera valor añadido en dos sentidos:

- a) Permite diseñar y realizar experimentos más eficaces y extraer más información a partir de los datos.
- b) Potencia la incorporación del químico y en general del profesional del laboratorio, a la cadena de control del proceso productivo. Es así que de esta forma dicho profesional deja de ser un mero productor de datos, y se convierte en alguien que genera, interpreta y comunica información relevante para la toma de decisiones.

El desarrollo de la Quimiometría como disciplina científica independiente se inició hasta 1969, con los trabajos de Jurs, Kowalski e Isenhour. Años después aparecieron las primeras revistas especializadas de investigación en Quimiometría: *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* (1986) y *Journal of Chemometrics* (1987).

El desarrollo de la Quimiometría fue tardío como consecuencia de la lenta evolución de la instrumentación científica. En la primera mitad del siglo XX era difícil y costoso obtener, tratar y almacenar datos químico-analíticos. Se disponía de pocos datos y su examen directo permitía al analista extraer toda la información significativa. Esta situación comenzó a cambiar hacia 1960, debido al fuerte impulso que experimentó el desarrollo de nueva instrumentación.

Sin embargo, en la década 1960-1970, la recopilación de los datos y su tratamiento manual con algoritmos matemáticos eran procesos lentos y tediosos. Por ello, los algoritmos con cierta complejidad de cálculo (incluida la regresión lineal simple) no tuvieron interés práctico hasta la evolución y popularidad de las calculadoras electrónicas hacia 1975. Por otra parte, la idea de que los datos químicos generados por los nuevos instrumentos podían transformarse en información significativa mediante técnicas estadísticas estaba poco extendida. Como observó C. F. Bender, **“durante años, los científicos experimentalistas han llenado de datos los cuadernos de laboratorio, y a menudo los han descartado por falta de técnicas de interpretación adecuadas”** (1973).

El impulso definitivo de la Quimiometría como disciplina científica independiente fue debido a la popularización de la computadora y su incorporación a los instrumentos científicos, a mediados de la década 1980-1990. Actualmente, un laboratorio analítico automatizado es capaz de generar, tratar y almacenar en corto tiempo muchos miles de datos, referentes a muestras que han sido analizadas secuencialmente mediante técnicas de enorme poder resolutivo: cromatografía, electroforesis, espectrometría, entre otras, acopladas a diversos detectores simples, multicanales y de barrido.

Muchas técnicas quimiométricas se encuentran incorporadas al software de la instrumentación analítica, y se aplican de un modo habitual por los profesionales del laboratorio químico-analítico.

El análisis de datos por métodos quimiométricos puede generalizarse en la siguiente dicotomía:

1. De cuantificación: buscan determinar la cantidad de uno o más analitos existentes en una muestra; métodos que se enfocan en ello son por ejemplo: PCR (Regresión de Componentes Principales) y PLS (Regresión por Mínimos Cuadrados Parciales).
2. De clasificación: Su objeto está en lograr la diferenciación existente entre los analitos de una muestra atendiendo a diversas variables; ejemplo de estos métodos son PCA, Clúster, Curvas potencia, etc.

Debido a que el objeto de este trabajo radica en la diferenciación entre tequilas, se hablará de los métodos quimiométricos de clasificación, específicamente en el Análisis de Componentes Principales y en el Análisis Clúster que fueron los utilizados en este trabajo.

Análisis de Componentes Principales (PCA)

Es una técnica habitual en el análisis multivariante, con propiedades muy bien estudiadas y aplicadas en diversos campos y con diferentes objetivos. Entre ellos se destaca la clasificación, poniendo de manifiesto las relaciones existentes entre las diferentes muestras y en la reducción de datos, paso previo en diferentes tipos de calibración.

Como definición se podría decir que PCA es una técnica multivariable en la cual un número de variables más o menos correlacionadas son transformadas a otro número menor de variables no correlacionadas. Esta colinealidad significa que la matriz de datos X tiene algún tipo de variabilidad dominante que se lleva la información principal; el objeto de PCA es eliminar la información redundante y la variabilidad debida al ruido.

El punto de partida de todos los análisis multivariados es una matriz de datos X . Cada fila de esta matriz se denomina objeto, correspondiendo en química a una muestra; cada una de las columnas, denominadas variables, corresponden a las medidas que se realizan a los objetos. En espectroscopia, esa matriz puede corresponder a los espectros de un conjunto de muestras; cada objeto (fila de la matriz) corresponde al espectro de una muestra, y las columnas son números de onda a las que se ha registrado el espectro. Si registramos M muestras a K números de onda tendremos una matriz de dimensiones $M \times K$.

El PCA busca las direcciones que expliquen la máxima variabilidad de las muestras, definiendo unos nuevos ejes que describirán el volumen en que se encuentran las mezclas. En otras palabras,

El PCA transforma las variables originales, posiblemente correlacionadas entre sí, en otros nuevos **ejes llamados Componentes Principales o PC's**. Estos nuevos ejes son los componentes principales, los cuales son ortogonales entre sí y son combinaciones lineales de las variables originales. El primer componente principal es la dirección que explica la máxima variabilidad de las muestras; el segundo, se escoge que sea perpendicular al primero, y explique la máxima variabilidad de las muestras una vez restada la explicada por el primer componente principal, y así sucesivamente. Las varianzas de los datos referidas a los nuevos ejes son los elementos de la diagonal principal. Las coordenadas de los datos en los nuevos ejes reciben el nombre de Scores y las variables se **expresan linealmente en función de los PC's, donde los coeficientes de estas combinaciones lineales se denominan Loadings**, e indican la contribución del PC a la variable original [19].

Para poder definir esos ejes matemáticamente se utilizan los cosenos de los ángulos que forman cada uno de estos nuevos ejes con los ejes antiguos, son los loadings y las coordenadas de las muestras en estos nuevos ejes son los scores.

Análisis Cluster (AC)

El Análisis de Cluster (o Análisis de Conglomerados) es una técnica de Análisis Exploratorio de Datos para resolver problemas de clasificación. Su objeto consiste en ordenar objetos (personas, cosas, animales, plantas, variables, etc.) en grupos (conglomerados o clusters) de forma que el grado de asociación/similitud entre miembros del mismo cluster sea más fuerte que el grado de asociación/similitud entre miembros de diferentes clusters. Cada cluster se describe como la clase a la que sus miembros pertenecen. Además, este método permite descubrir asociaciones y estructuras en los datos que no son evidentes a priori pero que pueden ser útiles una vez que se han encontrado. Los resultados de un Análisis Cluster pueden contribuir a la definición formal de un esquema de clasificación tal como una taxonomía para un conjunto de objetos, a sugerir modelos estadísticos para describir poblaciones, a asignar nuevos individuos a las clases para diagnóstico e identificación, etc.

Se puede encontrar dos tipos fundamentales de métodos de clasificación: **Jerárquicos** y **No Jerárquicos**. En los primeros, la clasificación resultante tiene un número creciente de clases anidadas y en el segundo las clases no son anidadas.

Los métodos pueden dividirse en **Aglomerativos** y **Divisivos**. En los primeros se parte de tantas clases como objetos tengamos que clasificar y en pasos sucesivos vamos obteniendo clases de objetos similares, mientras que en los segundos se parte de una única clase formada por todos los objetos que se va dividiendo en clases sucesivamente.

DESARROLLO EXPERIMENTAL

Material y equipo:

- + Equipo: Espectrómetro Perkin Elmer, modelo FT-IR FRONTIER con ATR de diamante en el intervalo de 4000 a 400 cm^{-1} con una resolución de 1 cm^{-1} , 16 scans (Figura 9).
- + Software GenEx © (MultiD Analysis AB, Göteborg, Suecia).



Figura 9. Espectrómetro Perkin Elmer, modelo FT-IR FRONTIER

Para el presente trabajo se analizaron en total **84 tequilas**, de los cuales: 28 son blancos, 37 reposados y 19 añejos. En los anexos de esta tesis se encontrará la lista completa de los tequilas estudiados, tanto su clase como su marca.

*En este análisis se identificará a los tequilas blancos con el color verde, a los reposados con el color azul y a los añejos con el color rojo.

La parte experimental consistió en la obtención de espectros de cada tequila en el FT-IR. Para ello, se limpió el diamante –donde se colocaba la muestra- con etanol y se secó con papel óptico (esto solo al inicio del experimento). Después con una micropipeta se obtenía una cantidad del tequila a analizar y se vertía sobre el diamante del FT-IR, se limpiaba con papel óptico y nuevamente se vertía la muestra del mismo tequila para ser leída por el equipo y obtener su respectivo espectro. Este procedimiento para cada tequila analizado.

Por cada tequila se obtuvo solo un espectro (salvo alguna anomalía en la medición que obligará a repetir la medición).

La siguiente parte de este trabajo, ya generados los espectros, se resume de la siguiente manera:

Pasos para la obtención de los modelos:

1. Obtención de espectros.
2. Tratamiento de datos.
3. Obtención de grupos de tequilas por análisis de componentes principales (PCA).
4. Obtención de Dendogramas por análisis cluster.

RESULTADOS Y ANÁLISIS

Pretratamiento

Después de obtener los espectros de absorción MIR de las muestras de tequilas, se generan las respectivas matrices de absorbancia en función del número de onda. Previo al análisis en el programa GENEX, se realiza un pretratamiento de datos en el siguiente orden:

1. Corrección ATR
2. Corrección de la línea base (CLB)
3. Ajuste a cero (la absorbancia de cada espectro a 4000 cm^{-1} se ajusta a cero).
4. Primera o segunda derivadas.

En el caso de los datos brutos el pretratamiento se limita a los tres primeros puntos.

Los espectros de los tequilas analizados con corrección ATR, corrección de la línea base y ajuste a cero, muestran el siguiente perfil:

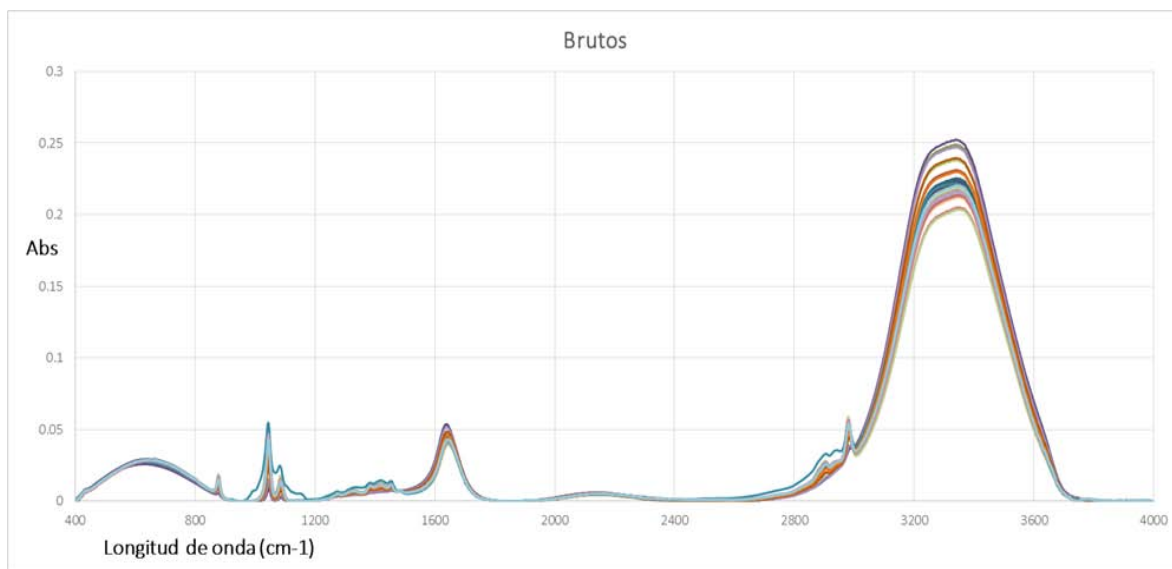


Figura 10. Perfil de espectros de todos los tequilas en el intervalo de $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$

La Figura 11 muestra los espectros de las tres clases de tequilas, en los que se puede evidenciar que en varias regiones se encuentran superpuestos. Sin embargo, se logrará su diferenciación por medio de métodos quimiométricos como son el Análisis de Componentes Principales (PCA) mediante el software GENEX.

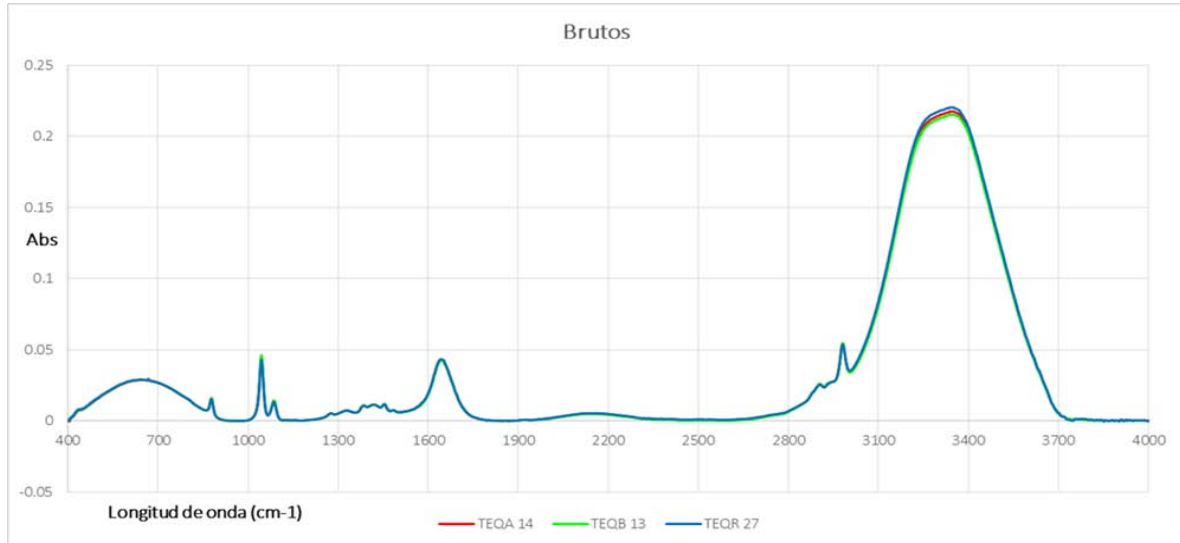


Figura 11. Perfil de espectros de un tequila blanco, un reposado y un añejo, corrección ATR y ajuste a cero en el intervalo de 4000-400 cm^{-1}

Para el PCA, se usaron diferentes colores para identificar cada clase de tequila, esto es: verde para tequilas blancos, azules para tequilas reposados y rojos para tequilas añejos. En este programa se variaron algunas condiciones de trabajo como son: intervalo de onda, escalado (ninguno, centrado en la media o autoescalado) y la eliminación de muestras anómalas. Todas estas modificaciones pueden combinarse entre sí, o simplemente prescindir de ellas durante el análisis. Al final, lo importante es la obtención de un modelo óptimo que permita la diferenciación de tequilas por clases.

A manera de ejemplo, se exponen algunas de esas modificaciones usadas durante el análisis

- Con diferentes escalados (Figura 12):

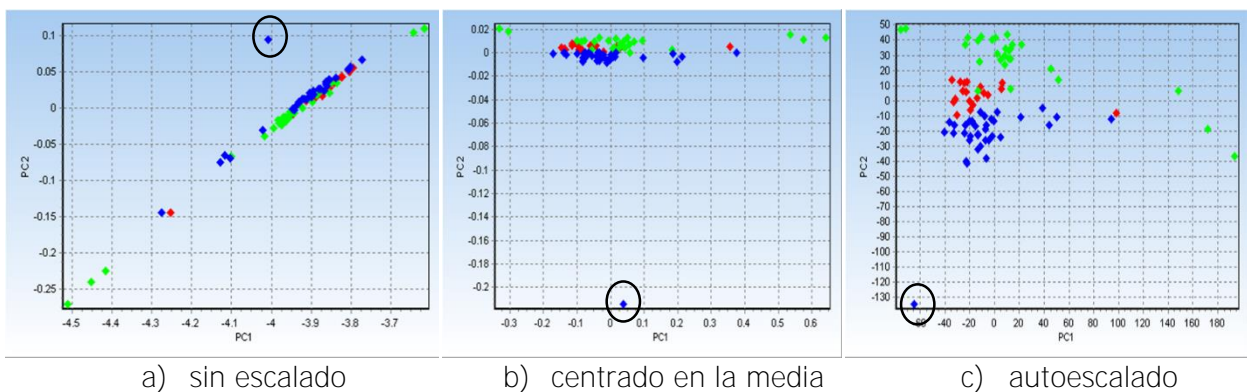


Figura 12. Gráficos de scores de datos brutos en el intervalo 4000-400 cm^{-1} con diferentes escalados

En los tres gráficos anteriores la distribución de los scores (muestras) es diferente en cada caso debido al tipo de escalado. Además, se puede notar una muestra anómala, marcada por un círculo negro, la cual se analizará más adelante.

Tabla 1. Comparación de resultados en la varianza de PCA de datos brutos con corrección ATR y ajuste a cero

Intervalo Número onda (cm ⁻¹)	Escalado	Varianza		
		% PC1	% PC2	% PC3
4000-400	Sin escalado	99.97	0.026	0.003
4000-400	Centrado en la media	96.88	2.316	0.367
4000-400	Autoescalado	53.027	0	31.508

En la Tabla 1 se presentan los valores porcentuales de varianza para cada componente principal de acuerdo a las condiciones marcadas en cada caso. Un componente principal, recordemos, es un vector que describe mejor las muestras que las variables originales y cuya dirección es la máxima varianza; así, se podría esperar (en condiciones ideales), que aquel componente con mayor varianza ofrezca los mejores resultados en PCA, que en nuestro caso eso sería la diferenciación por clases de tequila.

Lo importante de la Tabla 1 comparativa es darse cuenta de que para el mismo intervalo espectral, al modificar el escalado en el análisis, los porcentos de varianza cambian.

En este caso no nos detendremos a explicar cada gráfico de scores mostrado previamente, ni tampoco sus respectivos valores de varianza de acuerdo al tipo de escalado, pues eso se presentará detalladamente en los resultados más adelante; lo de ahora sólo es mostrar de forma ilustrativa las herramientas que pueden ser utilizadas en GENEX durante el PCA para la obtención del modelo óptimo.

Muestras anómalas

Como se observa en la Figura 12 había una muestra anómala, la cual se aleja significativamente de los otros tequilas. Este comportamiento puede deberse a muchas causas. Desde que algunas

de las muestras sean de naturaleza diferente respecto al resto, o bien se tuvo algún error en la determinación del espectro. Este tipo de muestras es necesario eliminarlas para que no interfieran con el análisis. En este caso, esta muestra corresponde al tequila reposado 31 el cual en la zona de $900-1200\text{ cm}^{-1}$ se puede observar que las bandas del espectro de este tequila sobresalen de las demás (Figura 10). Sin duda este tequila posee una diferencia evidente en su espectro con respecto a los demás tequilas, misma diferencia que es identificada por PCA. **Este tipo de muestras son consideradas como "anómalas" y por lo general suelen excluirse de PCA.**

Una vez conocidas las herramientas utilizadas en GENEX para la obtención de los modelos óptimos, lo que sigue es mostrar los resultados finales y las condiciones en las que se llegaron a éstos.

Inicialmente se trabajó con los datos brutos con corrección ATR y ajuste a cero, los cuales corresponden a los de la Figura 10. Sabiendo que en esa misma figura se encuentran todos los tequilas analizados, independientemente de su clase, resultaría prácticamente imposible diferenciar cuál de esos espectros corresponde a un tequila blanco, un tequila reposado o un tequila añejo. Es aquí donde entra el uso de la Quimiometría como instrumento para la diferenciación de tequilas por clases, en específico el Análisis de Componentes Principales.

PCA con datos Brutos

Hasta aquí se observa que no es suficiente el pretratamiento de los datos brutos (con corrección ATR y ajuste a cero) ni la eliminación de muestras anómalas para generar modelos satisfactorios en la diferenciación por clases.

En principio, se consideran intervalos de número de onda donde se perciban diferencias significativas, lo cual no es simple, aún con un acercamiento. En el caso de la Figura 11, con un acercamiento estas diferencias se notan en las zonas: $800-1100$, $1200-1800$ y $2800-3500\text{ cm}^{-1}$ del espectro. Sin embargo, al incluir estos intervalos en el modelo, cada uno de éstos, así como, la combinación de ellos, no permite alcanzar resultados satisfactorios para la diferenciación entre clases de tequilas.

Uno de los intervalos de número de onda donde se logró una primera diferenciación entre clases de tequilas, fue $750-2300\text{ cm}^{-1}$, con centrado en la media, como se aprecia en los siguientes gráficos de scores de la Figura 13.

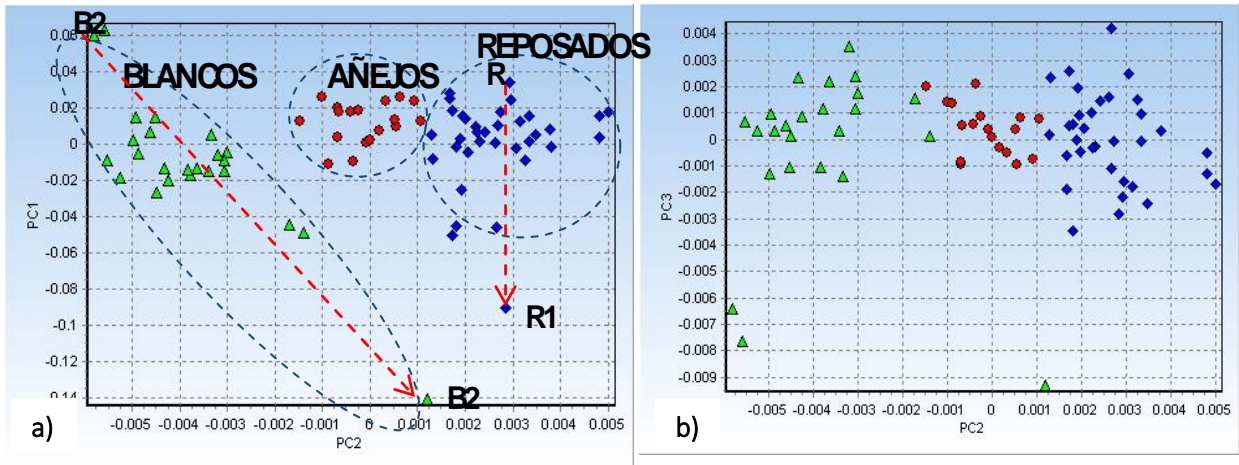


Figura 13. Gráficos de scores para el conjunto de los tequilas brutos, centrado en la media, intervalo número de onda 750-2300 cm^{-1}
a) Subespacio PC1-PC2 b) Subespacio PC2-PC3

Tabla 2. Condiciones para el análisis de PCA de datos brutos en el intervalo 750-2300 cm^{-1}

Intervalo Número Onda (cm^{-1})	Escalado	Tequilas anómalos	Varianza		
			% PC1	% PC2	% PC3
750-2300	Centrado en la media	A15, B02, B03, B28, B30, R31	97.765	1.099	0.552

En estos gráficos de scores se muestra que tres PCs explican el 99.417% de la varianza inicial (PC1: 97.765%, PC2: 1.099% y PC3: 0.552%). Los PCAs realizados bajo estas condiciones permitieron observar una clara diferencia entre las clases de tequilas (blancos, reposados y añejos), específicamente a lo largo de PC2 (Figura 13). Asimismo, la parte a) de esta figura, muestra una pauta interna en el caso de los grupos de tequilas blancos y reposados. La Tabla 2 resume las condiciones óptimas del modelo.

Sin embargo, al realizar una búsqueda exhaustiva, se encontró otro intervalo mucho más estrecho y no contenido en el primero que también permitió la diferenciación por clases de tequilas. Este intervalo fue de 3600-3700 cm^{-1} .

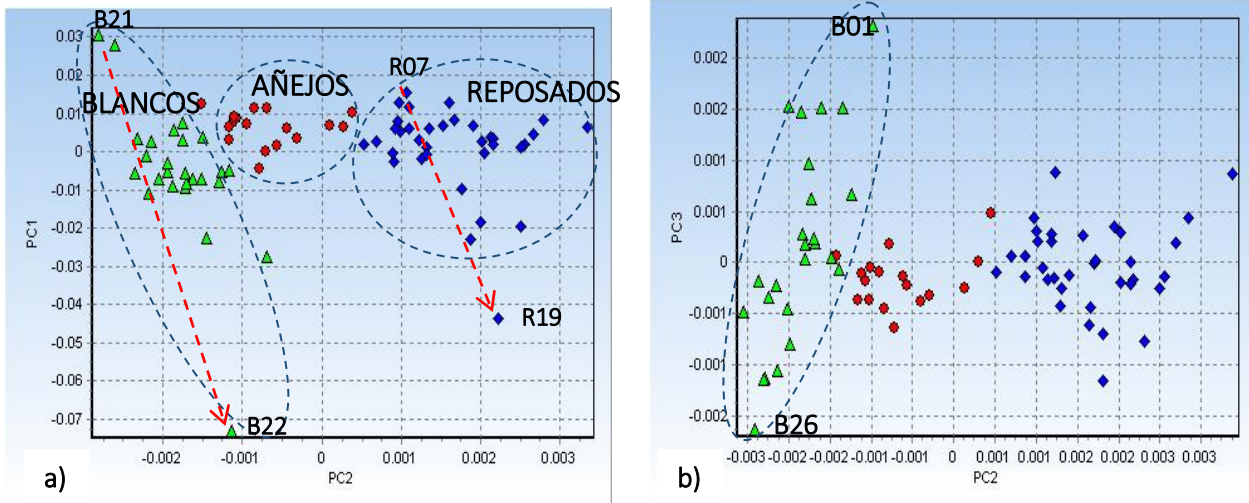


Figura 14. Gráficos de scores para el conjunto de los tequilas brutos, centrado en la media, intervalo número de onda 3600-3700 cm^{-1}
a) Subespacio PC1-PC2 b) Subespacio PC1-PC3

Tabla 3. Condiciones para el análisis de PCA de datos brutos, intervalo 3600-3700 cm^{-1}

Intervalo Número Onda (cm^{-1})	Escalado	Tequilas anómalos	Varianza		
			% PC1	% PC2	% PC3
3600-3700	Centrado en la media	A05, B02, B03, R31	98.25	1.43	0.22

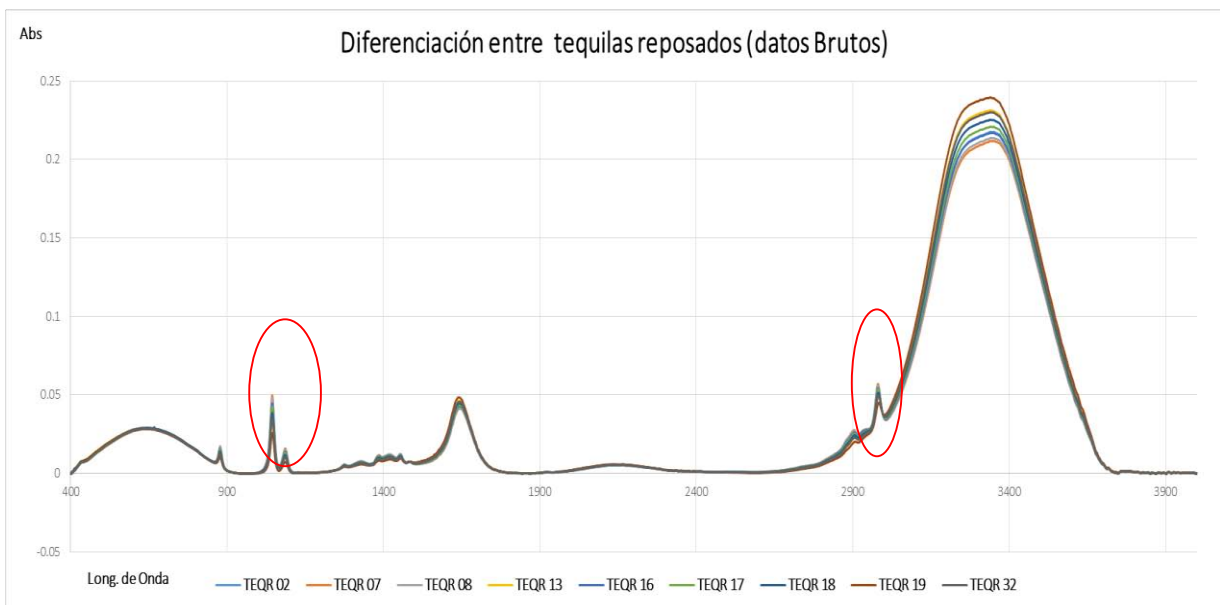
La Figura 14 ilustra este resultado y la Tabla 3 resume las condiciones del modelo. Se pueden observar tres claros agrupamientos por cada clase de tequila. Esta separación muestra el gran poder de PCA como herramienta en el análisis de resultados en química analítica, pues como se había visto en la Figura 11, resultaba imposible apreciar una distinción entre los espectros de cada tequila. PCA tiene la capacidad de obtener y encontrar diferencias que en otras circunstancias pasarían inadvertidas.

En este caso el PC1 muestra una varianza de 98.2%. Sin embargo, al observar el subespacio PC1-PC2, no es PC1 el responsable de la diferenciación sino PC2 como se constata en el subespacio PC2-PC3, con una varianza de apenas del 1.431%. Esto indica que existe alguna variable que tiene mayor peso en este análisis para otorgar casi toda la varianza a PC1, pero que no es la responsable de la diferenciación de los tequilas en clases y es la varianza de PC2 la que determina esta diferencia.

Pautas Internas

Al analizar los scores de datos brutos de la Figura 14 a), en el caso de los blancos y reposados se encontraron, la existencia de pautas internas a lo largo de PC1. Para cada clase, se analizaron sus correspondientes espectros a fin de identificar las zonas en donde se apreciaban las diferencias más notorias. En particular se examinaron con detalle las zonas de 900-1100, 1400-1750 y 2900-3700 cm^{-1} . Es claro que el último intervalo se debe a la presencia de grupo hidroxilo del agua y los alcoholes, éstos últimos productos de la fermentación. A manera de ejemplo, la Figura 15 exhibe un conjunto de espectros de tequilas reposados, elegidos a lo largo de PC1.

Figura 15. Espectros de tequilas reposados a lo largo de PC1 en el intervalo 400 a 4000 cm^{-1}



La Figura 16 presenta un acercamiento de la región 1000-1100 cm^{-1} de la Figura 15, donde se puede apreciar con claridad que las intensidades de las bandas correspondientes a los máximos de 1044 y 1086 cm^{-1} se incrementan desde el tequila TR19 al TR07. Las intensidades de ambas bandas podrían estar relacionadas con el grado de fermentación de los tequilas, ya que el valor de 1044 cm^{-1} y 1086 cm^{-1} podrían estar vinculados con la existencia de derivados furfúricos, producto de la fermentación (ver apartado de análisis de loadings más adelante). ¿Acaso la distribución de los tequilas en esa región sea una indicación del grado de fermentación?

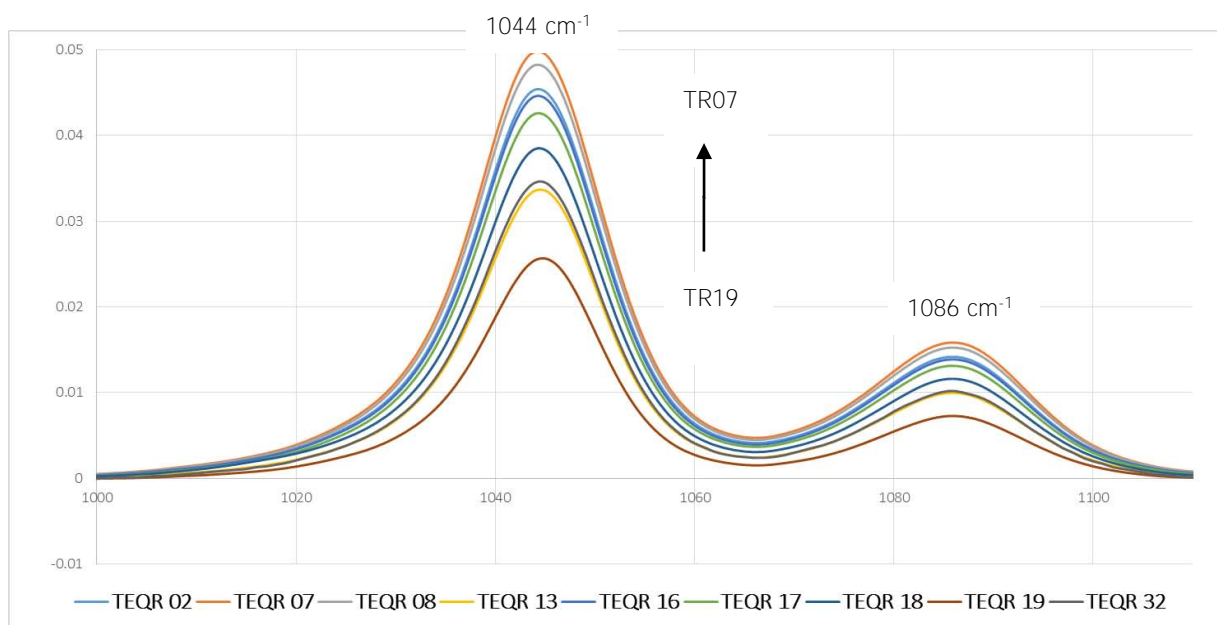


Figura 16. Acercamiento de la zona 1000-1100 cm^{-1} de espectros de tequilas reposados

La Figura 17 muestra un segundo acercamiento en el intervalo 2940-3060 cm^{-1} donde se observa en detalle que la intensidad de la banda con máximo en 2981 cm^{-1} se incrementa del tequila TR019 al TR07. Así, el tequila reposado que ostenta en este caso una banda más intensa, es el TR07 y la menos intensa el TR19.

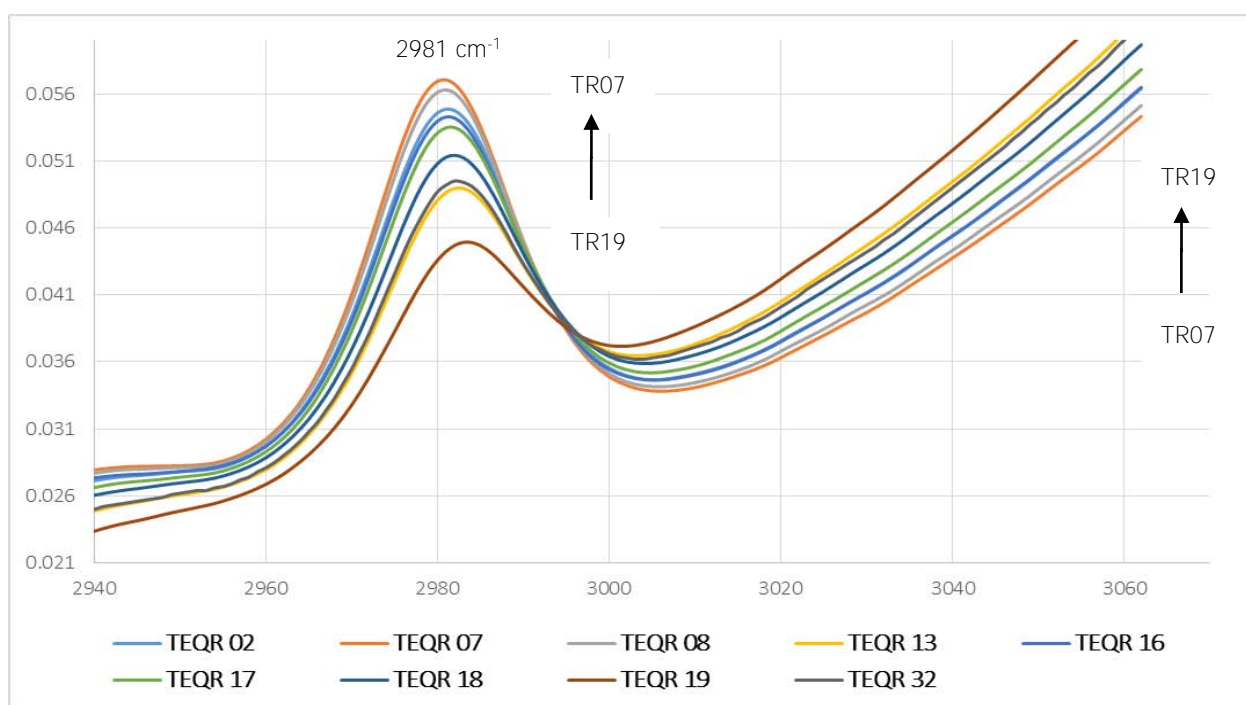


Figura 17. Acercamiento de la zona 2940-3060 cm^{-1} de espectros de tequilas reposados

Es en esta zona donde se aprecia la aparición de un punto isobéptico en aproximadamente 2995 cm^{-1} . Una posible explicación podría ser que este punto pone de manifiesto la relación que existe entre los compuestos con mayor grado de oxidación como los furfurales con grupos carbonilos y los de menor grado de oxidación como los alcoholes. Esto podría indicar que un tequila como el TR07 podría contener compuestos con un mayor grado de oxidación que un tequila como el TR19. Este mismo comportamiento observado en los tequilas reposados, puede verificarse también con los tequilas añejos (figuras 18 y 18a) y blancos (figura 19 y 19a).

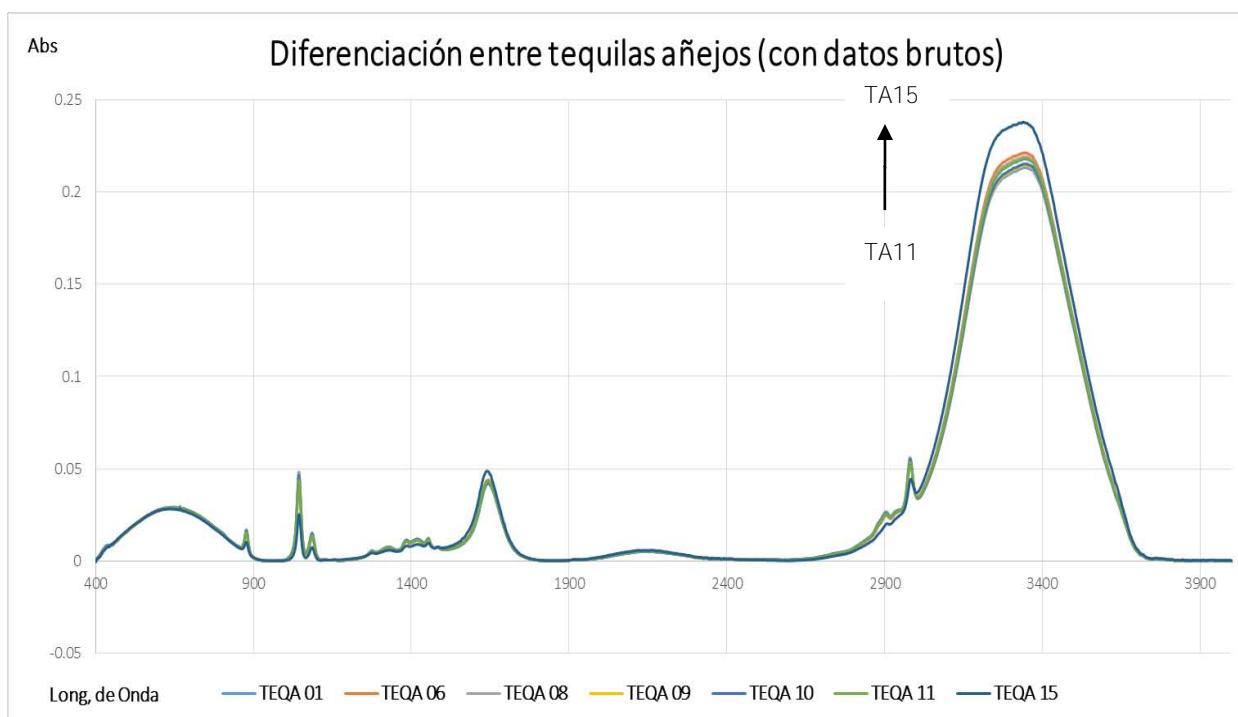


Figura 18. Espectro comparativo entre tequilas añejos que mostraron distribución en PC1.

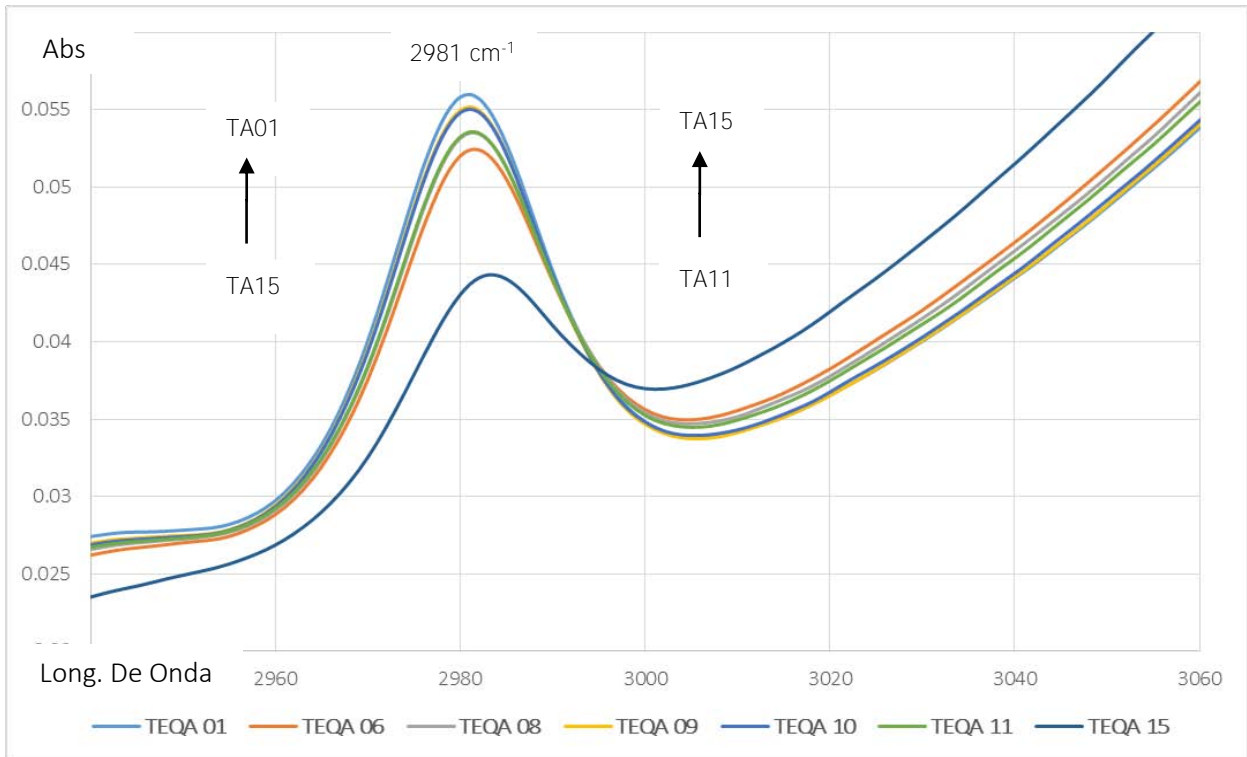


Figura 18 a. Acercamiento de la zona 2940-3060 cm^{-1} de espectros de tequilas añejos.

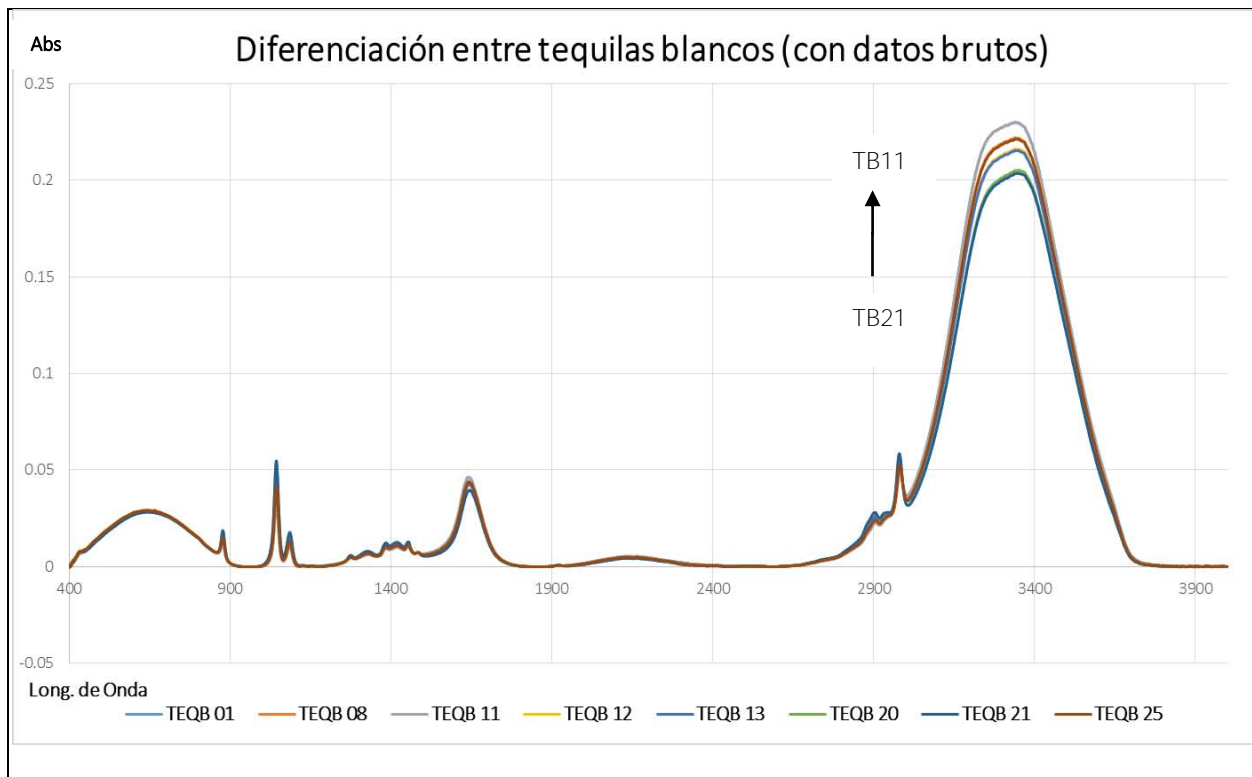


Figura 19. Espectro comparativo entre tequilas blancos que mostraron distribución en PC1.

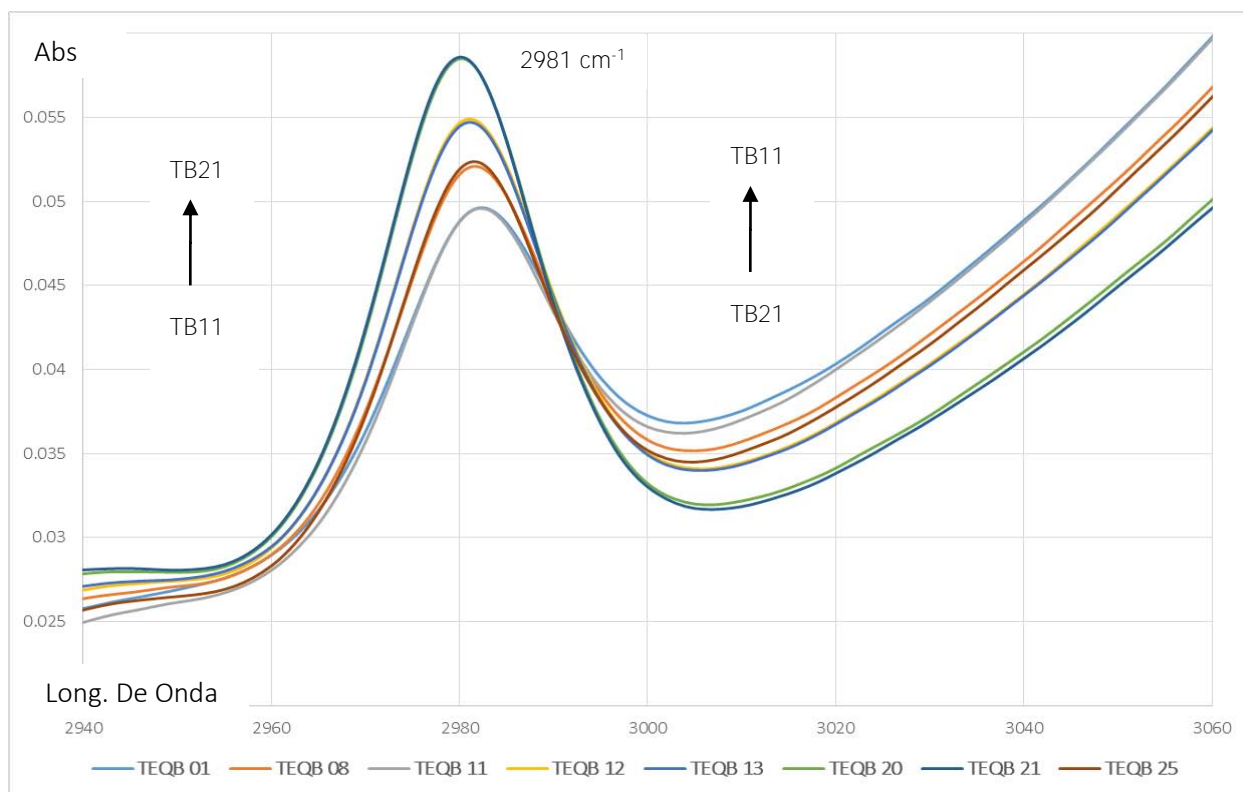


Figura 19 a. Acercamiento de la zona $2940\text{-}3060 \text{ cm}^{-1}$ de espectros de tequilas blancos.

PCA con datos de primera derivada

A los datos brutos con corrección ATR y ajuste a cero se les aplicó la primera derivada (Figura 20), proceso que es hecho por el software del instrumento FT-MIR. A continuación se presenta el perfil de espectros típicos con primera derivada para un tequila blanco, uno reposado y uno añejo. Al observar estos espectros (con acercamiento), vemos que las zonas donde se aprecian diferencias entre las clases de tequilas son: 800-1200, 1300-1800 y 2800-3100 cm^{-1} . No obstante, al intentar obtener un modelo por PCA que incluyera estos intervalos en forma individual o combinada, no se logró la separación entre clases. Sin embargo, al explorar otros intervalos, se encontró que con los intervalos 1400-1700 y 3600-3700 cm^{-1} con centrado en la media, se logró obtener un modelo que alcanzó la separación por PC1, según se muestra en los gráficos de scores de la Figura 21, en las condiciones marcadas en la Tabla 4.

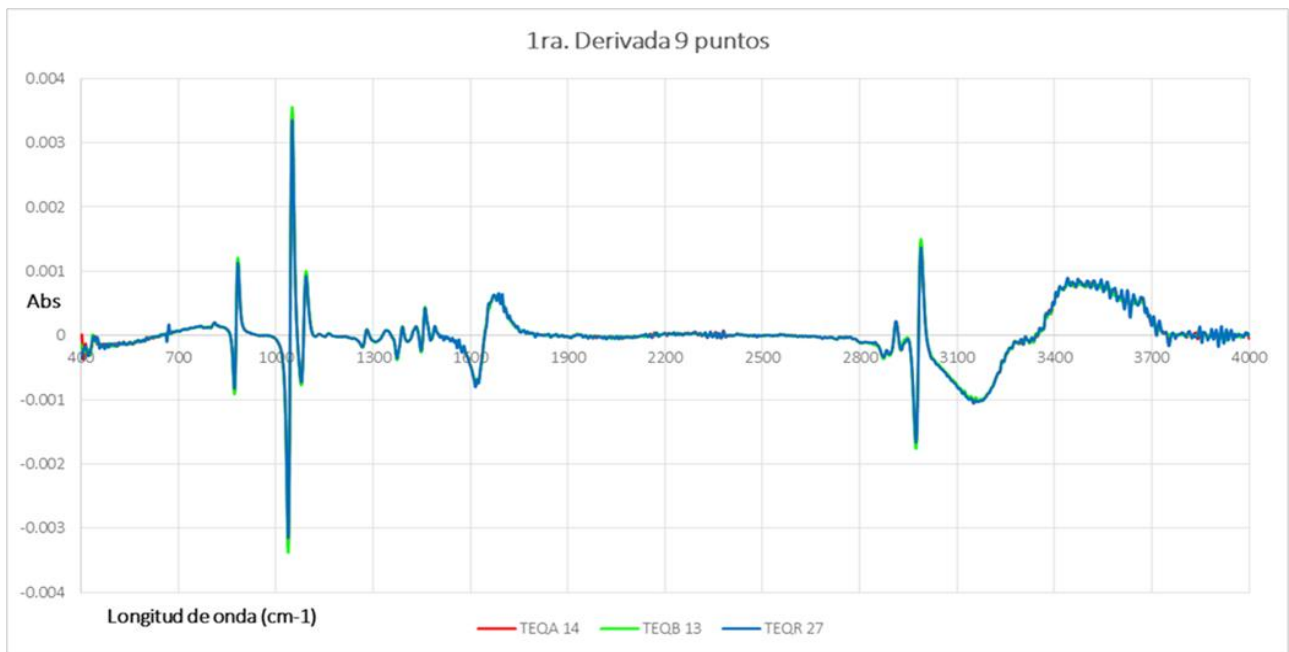


Figura 20. Perfil de espectros de Primera Derivada de un tequila blanco, un reposado y un añejo en el intervalo de 4000-400 cm^{-1}

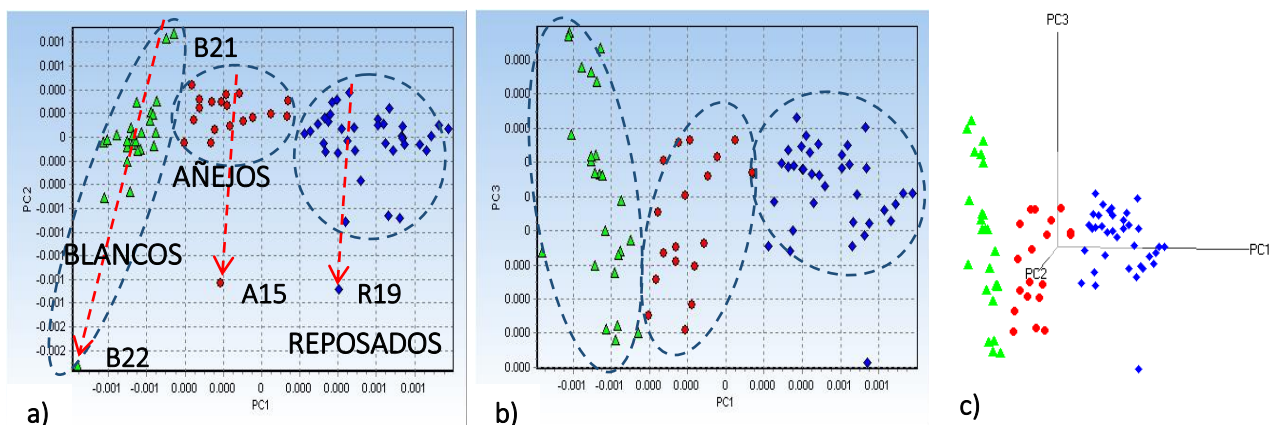


Figura 21. Gráficos de scores para el conjunto de los tequilas con primera derivada, centrado en la media, intervalo número de onda 1400-1700 y 3600-3700 cm^{-1}
a) Subespacio PC1-PC2 b) Subespacio PC1-PC3 c) Subespacio PC1-PC2-PC3

Tabla 4. Condiciones para el análisis de PCA de primera derivada, intervalos 1400-1700 y 3600-3700 cm^{-1}

Intervalo Número Onda (cm^{-1})	Escalado	Tequilas anómalas	Varianza		
			% PC1	% PC2	% PC3
1400-1700 3600-3700	Centrado en la media	B02, B03, B30	59.784	29.9763	1.976

Además, se puede observar que a lo largo de PC1 aparece primero el grupo de los blancos, luego los añejos y por último los reposados. Cada grupo presenta una dispersión diferente. El grupo de los reposados se encuentra medianamente disperso tanto en PC1 como PC2. El grupo de los tequilas blancos presenta un alargamiento sobre PC2. Estas características podrían estar asociadas a las diferencias en la composición química de los tequilas, dependiendo de su clase.

Otro modelo óptimo que también logró diferenciar los tequilas por clases, se encontró al emplear el intervalo 3600-3700 cm^{-1} bajo las condiciones de la Tabla 5. La Figura 22 muestra estos resultados. La varianza acumulada de 3 componentes fue de 96.425 % (PC1=77.012 %, PC2=15.426 % y PC3=1.464 %). En el subespacio PC1-PC2 se observa que la separación se da a lo largo de PC1.

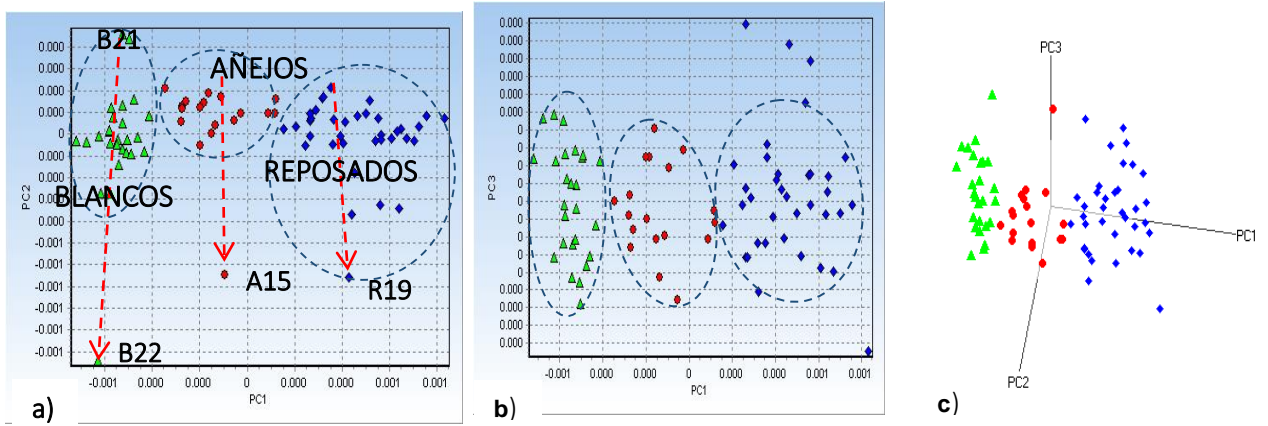


Figura 22. Gráfica de scores para el conjunto de datos con 1ª derivada de tequilas, centrado en la media, intervalo número de onda: 3600 a 3700 cm^{-1}

a) Subespacio PC1-PC2 b) Subespacio PC1-PC3 c) Subespacio PC1-PC2-PC3

Tabla 5. Condiciones para el análisis de PCA de primera derivada, intervalo 3600-3700 cm^{-1}

Intervalo Número Onda (cm^{-1})	Escalado	Tequilas anómalos	Varianza		
			% PC1	% PC2	% PC3
3600-3700	Centrado en la media	A05, B02, B03	77.012	15.426	1.464

PCA de datos con segunda derivada

Un tequila añejo, un tequila reposado y un tequila blanco, tratados con segunda derivada, muestran el siguiente perfil a lo largo del intervalo MIR:

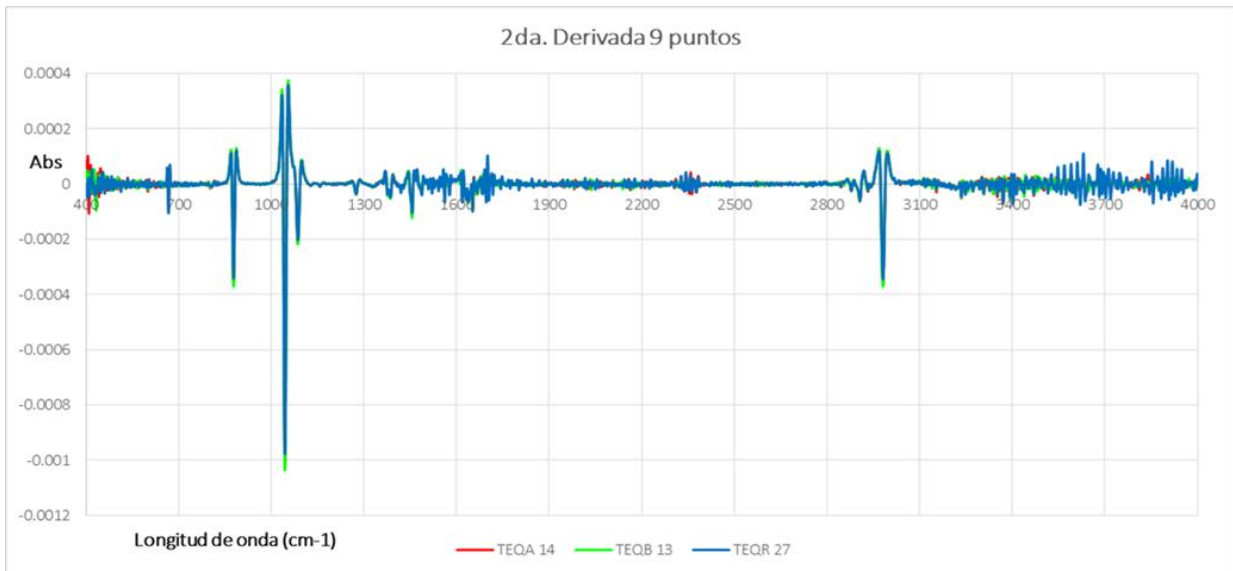


Figura 23. Perfil de espectros de un tequila blanco, uno reposado y uno añejo con datos con segunda derivada en el intervalo de 4000-400 cm^{-1}

En la Figura 23, los intervalos de longitud de onda que "a simple vista" exhiben alguna diferencia entre los tres tipos de tequilas son: 700-1100, 1400-1700, 2300-2400 y 2800-3000 cm^{-1} ; pero ninguno de éstos o su combinación, lograron la diferenciación de tequilas por su clase. Sin embargo, el PCA realizado, empleando el intervalo de 1400-1700 y 3600-3700 cm^{-1} y bajo las condiciones de la Tabla 6, permitió observar una clara diferenciación entre los tequilas. La Figura 24 muestra las gráficas de scores. Tres PCs explican el 85.730 % de la varianza inicial. Se observa una separación de las tres clases de tequila a lo largo de PC2 (Figura 24 (b)). Los grupos quedan conformados por tequilas reposados, añejos y blancos. En la Figura 24 (c) se puede observar nuevamente que el subespacio de *scores* PC1-PC2-PC3 presenta una buena separación de los tres tipos de tequila.

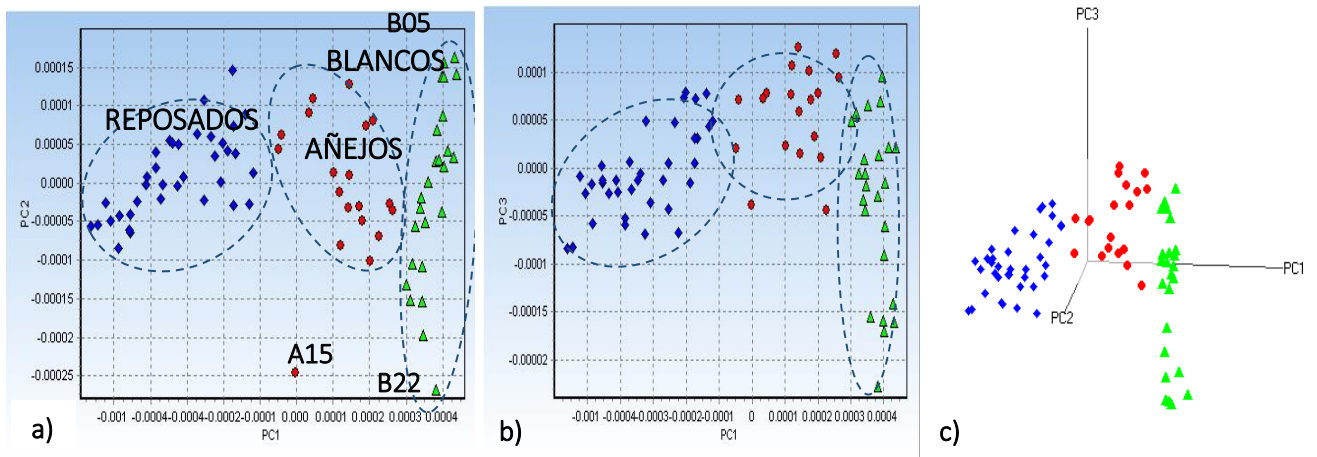


Figura 24. Gráficos de scores para el conjunto de datos de tequilas con segunda derivada, centrado en la media, intervalo número de onda 1400-1700 y 3600-3700 cm^{-1}
a) Subespacio PC1-PC2 b) Subespacio PC1-PC3 c) Subespacio PC1-PC2-PC3

Tabla 6. Condiciones para el análisis de PCA de segunda derivada, intervalos 1400-1700 y 3600-3700 cm^{-1}

a)	Intervalo número Onda (cm^{-1})	Escalado	Tequilas anómalos	Varianza		
				% PC1	% PC2	% PC3
	1400-1700 3600-3700	Centrado en la media	B02, B03, B30	76.9079	5.2268	3.5959

Finalmente, se obtuvo un segundo modelo con el intervalo 3600-3700 cm^{-1} . Los gráficos de scores se presentan en la Figura 25 en las condiciones de la Tabla 7.

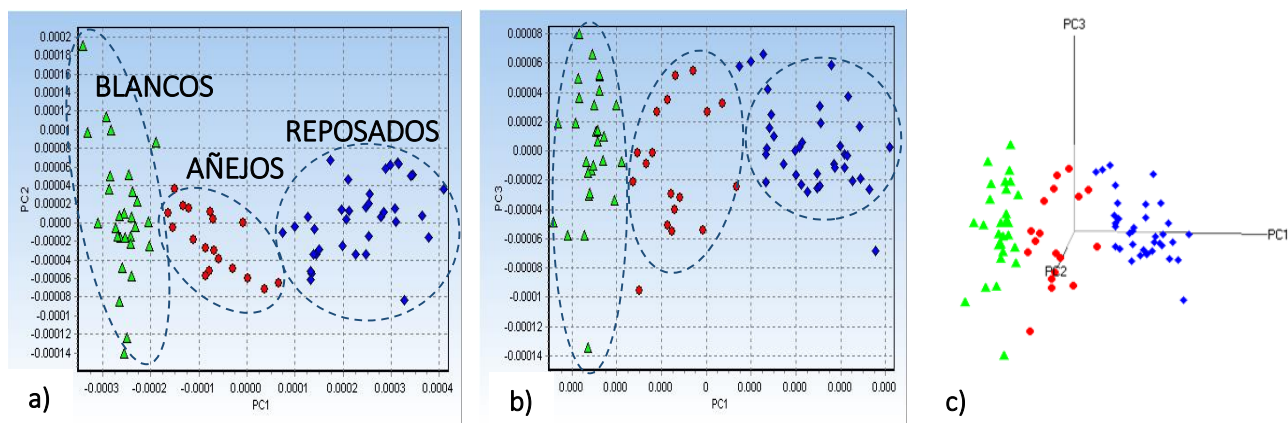


Figura 25. Gráficos de scores para el conjunto de datos de tequilas con segunda derivada, centrado en la media, intervalo número de onda: 3600-3700 cm^{-1}
a) Subespacio PC1-PC2 b) Subespacio PC1-PC3 c) Subespacio PC1-PC2-PC3

Tabla 7. Condiciones para el análisis de PCA de segunda derivada, intervalo 3600-3700 cm^{-1}

Intervalo número Onda (cm^{-1})	Escalado	Tequilas anómalos	Varianza		
			% PC1	% PC2	% PC3
3600-3700	Centrado en la media	A19	82.485	4.090	1.831

Tres PCs explican de la varianza 88.8077 % de la varianza del sistema. (PC1: 82.485 %, PC2: 4.090 % y PC3: 1.831 %). Los subespacios PC1-PC2 y PC1-PC3 muestran la separación por clases de tequilas sobre PC1, pero en este último se observa una dispersión a lo largo de PC3.

Comparación de modelos

Por otra parte, como se constató a lo largo de este análisis, la condición de mayor peso para lograr la diferenciación de los tequilas por clases, fue la elección de los intervalos de número de onda. Tanto con datos brutos como con derivadas, el intervalo de número de onda que aparece en tres de los modelos, fue el de 3600-3700 cm^{-1} . Este intervalo coincide con las señales de IR asociadas al grupo hidroxilo de los alcoholes, las cuales aparecen en la región de 3400-3700 cm^{-1} , dependiendo el tipo de interacción de este grupo funcional.

Tabla 8. Comparativo de los PCA realizados con las diferentes condiciones

Modelo	Intervalo número onda (cm ⁻¹)	Escalado	Tratamiento	PC que determina la diferencia	Varianza		
					% PC1	% PC2	% PC3
1	7500-2300	centrado en la media	Brutos	PC2	97.7650	1.0995	0.5527
2	3600-3700	centrado en la media	Brutos	PC2	98.2534	1.4312	0.2213
3	1400-1700 y 3600-3700	centrado en la media	primera derivada	PC1	59.784	29.9763	1.9765
4	3600-3700	centrado en la media	primera derivada	PC1	77.0128	15.4268	1.4642
5	1400-1700 y 3600-3700	centrado en la media	segunda derivada	PC1	76.9079	5.2268	3.5959
6	3600-3700	centrado en la media	segunda derivada	PC1	82.4855	4.0907	1.8315

En resumen (Tabla 8), en los modelos obtenidos a partir de los datos brutos (Modelos 1 y 2) es el PC2, el componente principal responsable de la separación entre las clases, mientras para los modelos obtenidos a través de la primera derivada (Modelos 3 y 4) y segunda derivada (modelos 5 y 6) es el PC1 el responsable de la separación. Así, el mejor modelo fue el que se realizó con la segunda derivada en el intervalo de 3600-3700 cm⁻¹, ya que sólo se eliminó a una muestra, la varianza de PC1 fue el más alto (82.4855 %) con centrado en la media.

Análisis de loadings de datos brutos

Los loadings son valores de las variables obtenidos a partir del PCA del modelo óptimo el cual corresponde al presentado en los gráficos de la Figuras 13 y 14. Su análisis nos permite identificar aquellos números de onda de mayor peso específico para llevar a cabo la diferenciación o el agrupamiento de las muestras (en este caso la diferenciación por clases de tequilas). La importancia de estos números de onda es que pueden ser vinculados con la estructura química de los compuestos que determinan la diferencia entre las clases de tequila.

Se realizó el análisis de loadings bajo las mismas condiciones de los modelos óptimos de PCA, para los datos brutos (Modelos 1 y 2). Las Figuras 26 y 27 muestran los correspondientes gráficos de loadings para 3 PC el modelo 1 y 2, respectivamente y su comparación con un tequila modelo (reposado 27).

Al realizarse un análisis de los correspondientes loadings de este modelo (el correspondiente al de la figura 26), como era de esperarse, en el loading 1 no destaca ninguna variable cuyo valor sea apreciable, ya que el PC1 no determina ninguna diferencia.

El PC2 responsable de la diferenciación de los tequilas por clases, viene determinado principalmente por las variables en el intervalo de número de onda desde 3605 a 3640 cm^{-1} , el cual corresponde a las señales de vibración y estiramiento del O-H del grupo hidroxilo de los alcoholes que absorben en la región de 3500 a 3600 cm^{-1} del MIR.

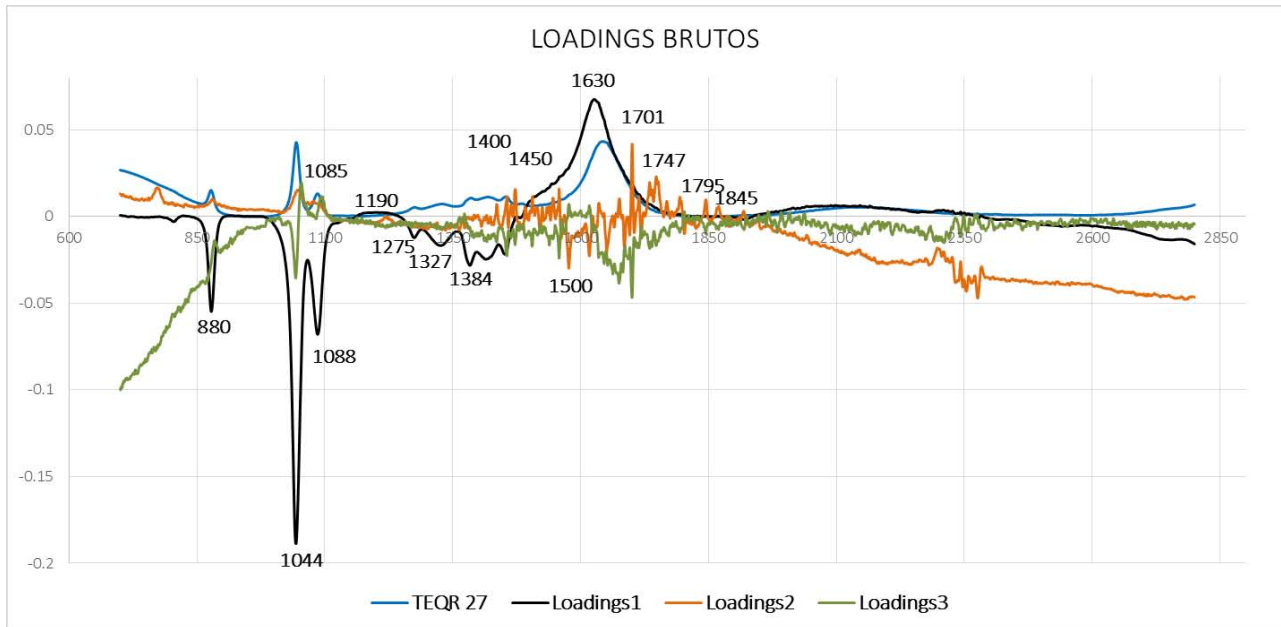


Figura 26. Loadings para el modelo 1 (conjunto de datos Brutos de tequilas, centrado en la media. Intervalo número de onda: 700-2800 cm^{-1})

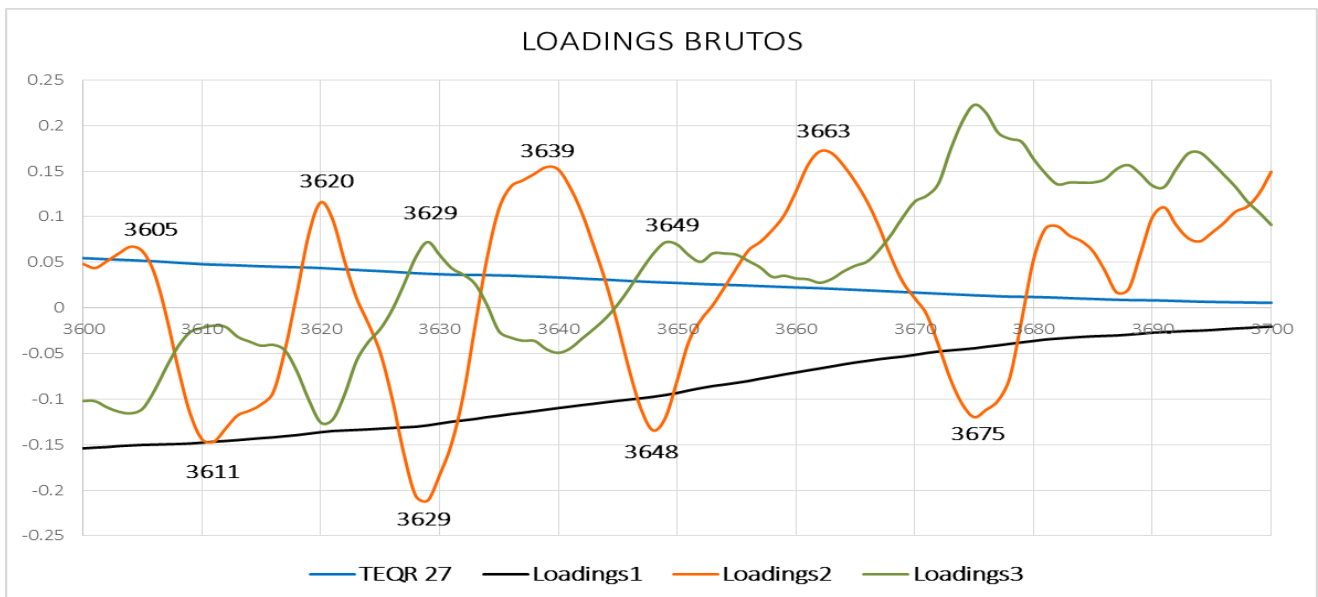


Figura 27. Loadings para el modelo 2 (conjunto de datos Brutos de tequilas con centrado en la media. Intervalo número de onda 3600-3700 cm^{-1})

En ambos gráficos (figura 26 y 27) se señalan aquellos loadings o variables de mayor peso. Dichas variables se relacionaron con los valores de señales de grupos funcionales reportados en tablas de MIR con el fin de elucidar los posibles compuestos que influyen en la diferenciación de los tequilas por clase.

La Tabla 9 resume dichos loadings (números de onda) y su magnitud, así como su relación con las señales de absorción de grupos funcionales, tomando en cuenta los compuestos mayoritarios existentes en tequilas.

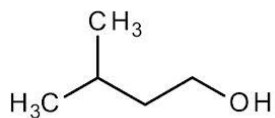
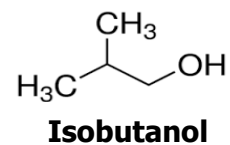
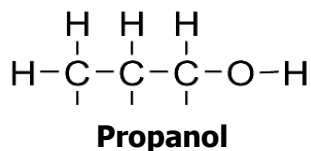
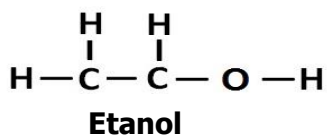
Tabla 9. Absorción de grupos funcionales orgánicos en IR y su asociación con Loadings

Grupo funcional	Número onda (cm⁻¹)	Loading número onda (cm⁻¹)	Magnitud de Loading
Vibraciones –OH	3700-3400	3629, 3663 (3, 2)	-0.211, 0.169
Aromaticidad de compuestos con heteroátomos	2100-1800	1845 (2)	0.009
Carbonilo de éster	1790-1650	1795 (2)	0.009
Ésteres alifáticos	1750-1735	1747 (2)	0.021
Carbonilo de aldehído alifático	1740-1720	1735 (2)	0.019
Carbonilo de cetona	1775-1665	1768 (2)	0.008
Carbonilo de ácido carboxílico alifático	1725-1700	1701 (2)	0.041
Carbonilo de cetona alifática	1715	1701 (2)	0.041
Carbonilo de aldehído aromático	1710-1685	1701 (2)	0.041
Aldehídos, ésteres	1700	1701 (2)	0.041
Éteres, cetonas	1700-1600	1630 (1)	0.066
Vibración C-O-C en compuestos con heteroátomos	1190-990	1085 (2)	0.032
Ésteres alifáticos superiores	1185	1190 (1)	0.002
Alcoholes primarios y secundarios	1000-1100	1088 (1)	-0.066
Vibración C-H en compuestos con heteroátomos	1000-700	1044 (1)	-0.188
Carbonilo de ácido carboxílico con OH	960-880	880 (1)	-0.052
Carbonilo de acetatos	925	896 (1)	-0.022

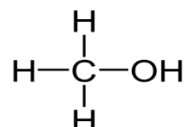
(*) Los loadings más destacados están marcados en negrita

Relación de loadings con grupos funcionales

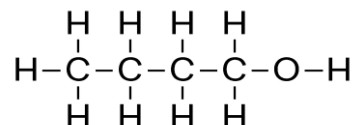
Con el propósito de relacionar los grupos funcionales con los loadings, se tomará en cuenta los compuestos mayoritarios presentes en los tequilas, tales como:



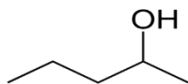
Alcohol Isoamílico



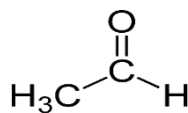
Metanol



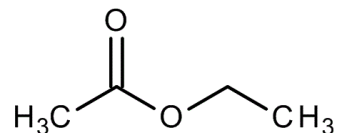
Butanol



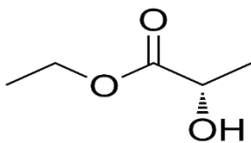
2-Pentanol



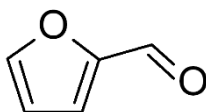
Acetaldehído



Acetato de Etilo



Lactato de Etilo



Furfural

Entre los loadings, según la Tabla 9, destacan primordialmente las variables 3629 y 3663 asociadas a vibraciones –OH, que en conjunto con la variable de 1088 indican la participación de alcoholes primarios y secundarios (región entre 1000-1100 cm^{-1}) lo cual es congruente con la composición de lo tequilas; otra variable importante es 1044 cm^{-1} relacionada con vibraciones C-H en compuestos con heteroátomos, como los derivados furfurales, los cuales podrían estar jugando un papel muy importante en la diferenciación de los tequilas por clases. Análogo resultado se obtuvo en la diferenciación de clases por UV-Vis [17]; C-O-C en compuestos con heteroátomos 1190-990 cm^{-1} , vibraciones –OH: 3400-3700 cm^{-1} ; otras variables con menos peso son la de 1630 cm^{-1} relacionada con éteres y cetonas cuyas señales aparece en la región de 1700-1600 cm^{-1} ; ésteres: 1700 cm^{-1} . Entonces, podemos inferir que la diferencia entre los tipos de tequilas está relacionada con los componentes químicos que poseen los grupos funcionales antes mencionados.

Análisis Clúster (CA)

El Análisis Clúster (CA) es un análisis complementario al PCA, pues a partir de las condiciones obtenidas en cada modelo de este análisis es posible realizarlo.

Para ello, se llevaron a cabo distintos CA usando los espectros brutos, de primera y segunda derivadas de los tequilas, tomando en cuenta, en cada caso, las condiciones de los modelos óptimos. A continuación se presentan sólo los dendogramas donde hubo mejor clasificación por tipos de tequilas.

El primer dendograma presentado es el obtenido con los datos brutos, bajo las condiciones especificadas al pie de la Figura 28. En éste se muestra cómo los únicos que permanecieron agrupados son los tequilas reposados, en la parte media; a los extremos se agruparon los tequilas blancos, con ciertos añejos entre ellos, ya que la mayoría de los añejos quedaron en un grupo de lado izquierdo, junto a los tequilas reposados.



Figura 28. Dendrograma para el conjunto de datos brutos con el método de enlace completo y la distancia Manhattan

Análisis de datos con primera derivada.

De acuerdo a la combinación de algoritmos utilizados (que se muestran bajo la imagen del Dendrograma) se obtiene que cada tequila queda perfectamente ubicado dentro de su tipo de clase: blanco, reposado y añejo.

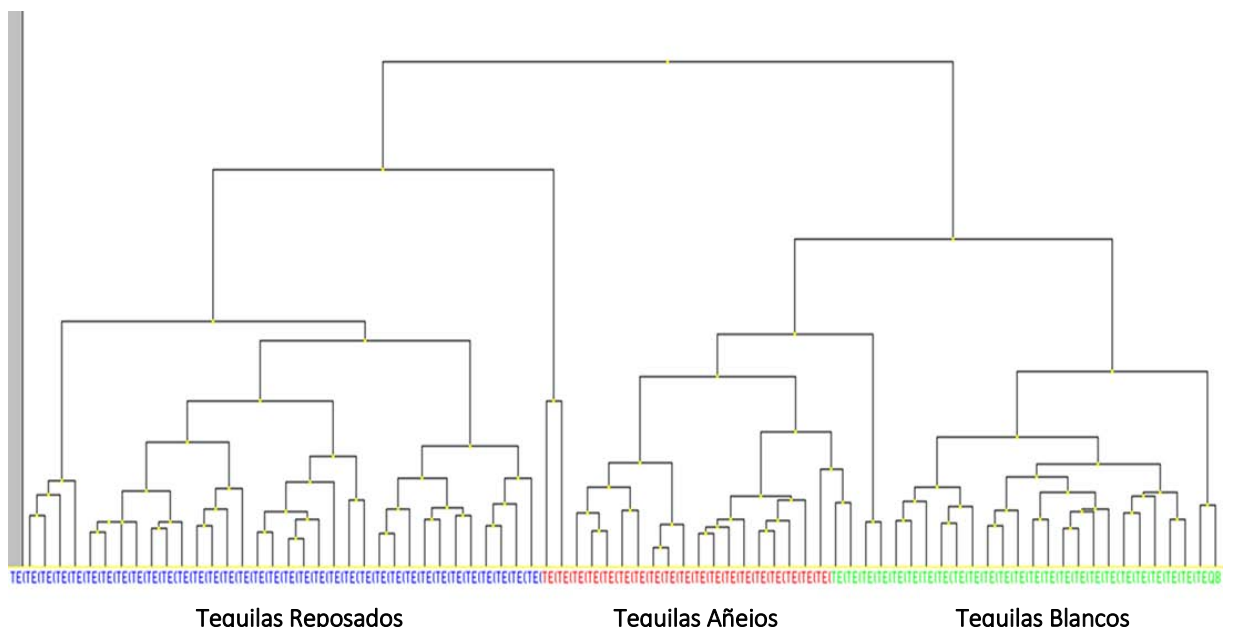


Figura 29. Dendrograma para el conjunto de datos de la primera derivada con el método de enlace completo y la distancia Manhattan

Análisis de datos con segunda derivada.

Este dendograma está conformado por dos grandes divisiones; una que agrupa a todos los tequilas reposados y otra que a su vez se subdivide en otras dos; una donde se ubican los tequilas añejos y la otra los tequilas blancos. Si bien en una subdivisión están los blancos y en la otra los añejos, por el momento es difícil argumentar el porqué se encuentran o parten de la misma división siendo que los primeros son directamente embotellados después de su producción, mientras que los añejos son sometidos a un reposo en barricas durante varios meses, generando una diversidad de compuesto químicos, lo que haría esperar que los añejos quedasen agrupados junto a los reposados, debido a que ambos tipos fueron expuestos a un añejamiento.

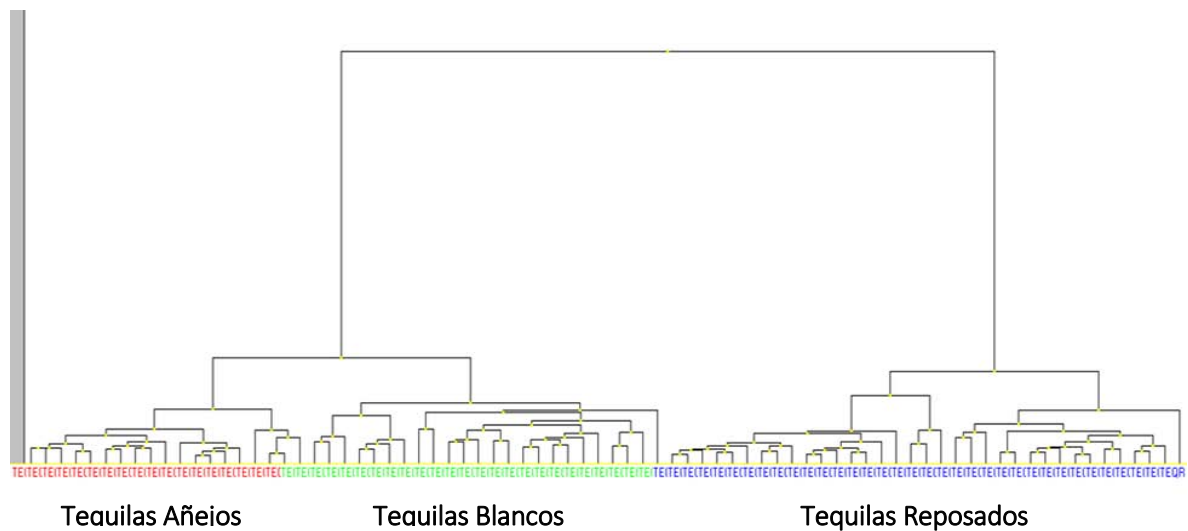


Figura 30. Dendograma para el conjunto de datos de la segunda derivada con el método de enlace promedio y la distancia euclídea al cuadrado

CONCLUSIONES

- La combinación de los datos brutos, la primera y segunda derivadas de los espectros FT-MIR y las técnicas quimiométricas, análisis de componentes principales y análisis clúster, permitió establecer modelos óptimos para realizar una diferenciación entre las clases de tequilas blancos, reposados y añejos.
- En el caso de los tequilas blancos y reposados, el análisis de las pautas internas de los scores de datos brutos, condujo a la observación de un punto isobéptico que puso de manifiesto la relación que existe entre los compuestos con mayor grado de oxidación como los furfurales con grupos carbonilos y los de menor grado de oxidación como los alcoholes.
- El análisis de loadings realizado a partir de los modelos óptimos por PCA, permitió identificar las relaciones existentes entre las variables y las estructuras de ciertos grupos funcionales de compuestos que influyen en la diferenciación de tequilas por clases.
- En general, el uso de herramientas quimiométricas en combinación con el análisis instrumental químico, como el IR, lograron ser de gran utilidad para la identificación, clasificación y discriminación de sustancias o productos, lo que podría encontrar gran aplicación a nivel industrial, especialmente en el sector alimenticio, obteniendo algún tipo de información respecto a la calidad del producto y ayudando en la identificación de adulteraciones.

ANEXOS

Lista de tequilas utilizados en este análisis.

* La letra B mostrada después del nombre de cada tequila significa que el tequila es de la botella original, mientras que la F es de muestras de tequilas contenidas en frascos que fueron donadas.

Tequilas blancos (TB):

Etiqueta	Nombre del Tequila
TB01	Cazadores B
TB02	Cazadores F
TB03	Cazadores F
TB04	100 Años B
TB05	100 Años F
TB06	100 Años F
TB07	Jimador B
TB08	Jimador F
TB09	Amo B
TB10	Amo F
TB11	Amo F
TB12	Arcano B
TB13	Orendain B
TB15	Orendain F
TB16	Orendain F
TB17	Viuda de Romero B
TB18	Viuda de Romero B
TB19	Viuda de Romero F
TB20	Herradura B
TB21	Herradura B
TB22	Hacienda del Cristero B
TB23	Sierra B
TB24	Espolon B
TB25	Puerto Vallarta B
TB26	Puerto Vallarta F
TB27	Puerto Vallarta F
TB28	Casco Viejo F
TB30	Dos Siglos B

Tequilas reposados (TR):

Etiqueta	Nombre del Tequila
TR01	Corralejo B
TR02	Corralejo F
TR03	Hornitos B
TR04	Hornitos B
TR05	José Cuervo B
TR06	José Cuervo B
TR07	Olmeca Tezon B
TR08	Olmeca Tezon F
TR09	Olmeca Tezon F
TR10	Don Ramon B
TR11	Don Ramon F
TR12	Viuda de Romero B
TR13	Viuda de Romero F
TR14	Espolon B
TR15	100 Años B
TR16	100 Años F
TR17	100 Años F
TR18	Antiguo TH F
TR19	Cazadores B
TR19A	Cazadores B
TR20	Jimador B
TR21	Don Manuel B
TR22	Olmeca B
TR23	Olmeca F
TR24	Olmeca F
TR25	Huitzila Mezcal B
TR27	1800 F
TR28	Herradura B
TR29	Campo Azul F
TR30	Sauza F
TR31	Centinela F
TR32	Cabrito B
TR33	Sierra B
TR34	Orendain B
TR35	Altísima B
TR36	Corazón Maya B
TR37	Con Orgullo B

Tequilas añejos (TA):

Etiqueta	Nombre del Tequila
TA01	Coa de Azul B
TA02	Coa de Azul F
TA03	Coa de Azul F
TA04	Jimador B
TA05	Don Agustín B
TA06	Don Agustín F
TA07	Con Orgullo B
TA08	Gran Centenario B
TA09	Campo Azul B
TA10	Campo Azul F
TA11	Campo Azul F
TA12	Herradura B
TA13	Cuervo F
TA14	Sauza F
TA15	Revolución B
TA16	El Gran Jubileo B
TA17	Tres Generaciones B
TA18	Los Tres Toños B
TA19	Corralejo B

BIBLIOGRAFÍA

- [1] M. Bautista-Justo, L. García Oropeza, J.E. Barbosa-Corona, L.A. Parra Negrete., "El *Agave Tequilana Weber*". *Acta universitaria*, agosto, 2001/vol.11, número 002. Universidad de Guanajuato, México, pp. 26-34.
- [2] Norma Oficial Mexicana NOM-006-SCFI-2005, bebidas Alcohólicas-Tequila-especificaciones.
- [3] Guzmán, P.M. "Aguardientes de México: Tequila, Mezcal, Charanda, Bacanora, Sotol. *Bebidas Mexicanas*". 6(4), 1997, pp. 37-40.
- [4] Ulises Contreras, O. Barbosa-García, J.L. Pichardo Molina, G. Ramos Ortíz, J.L., "Screening method for identification of adulterate and fake tequilas by using UV-VIS spectroscopy and chemometrics". *Food Research International* 2010, pp. 2356-2362.
- [5] Andrade Garda J.M., "Análisis Exploratorio de datos y Calibración Multivariante." Curso impartido en la FES-Cuautitlán, UNAM 2010.
- [6] Contreras Loera U., Barbosa García O., Ramos Ortiz G., Pichardo Molina Maldonado J.L., "Identificación y discriminación de Tequilas reposados in situ para la protección de marca". *Nova Scientia*. México 2010, pp. 22-32.
- [7] Lachenmeier Dirk W., "Rapid quality control of spirit drinks and beer using multivariate data analysis of Fourier transform infrared spectra". *Food Chemistry* 2007, pp. 825-832.
- [8] Barbosa García O., Ramos Ortiz G, Maldonado J.L., Meneses Nava M.A., Pichardo Molina J. L., Landgrave J. E. A., Cervantez Martínez J., "UV-Vis absorption spectroscopy and multivariate analysis as a method to discriminate tequilas". *Spectrochimica Acta Part A* 2007, pp. 129-134.
- [9] de Fuentes Nava M., Bosch Ojeda C., Sánchez Rojas F., "Aplicación de la Espectroscopía del Infrarrojo Medio en Química Analítica de Procesos". *Sociedad Química de México* 2008, pp. 93-103.
- [10] Miller, James N., Miller, Jane C., "Estadística y Quimiometría para Química Analítica", cuarta edición, España 2002.

- [11] Duarte, I. F.; Barros, A.; Almeida, C.; Spraul, M.; Gil, A. M. "Multivariate Analysis of NMR and FTIR Data as Potential Tool for the Quality Control of Beer". *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 1031-1038.
- [12] Bauer, R; Nieuwoudt, H.; Bauer, F. F.; Kossmann, J.; Koch, K. R.; Esbensen, K. H. "FTIR Spectroscopy for Grape and Wine Analysis". 2008. American Chemistry Society.
- [13] Macías Macías Alejandro, "El en la industria del tequila en Jalisco, México", *Agroalimentaria*, Nº 13, diciembre, 2001, pp 57-61.
- [14] Ceballos Magaña Guillermina, tesis doctoral, "Caracterización analítica de destilados de Agave tequilana mediante técnicas de análisis multivariante", *Universidad de Sevilla, España*, 2007.
- [15] Acosta Navarrete Susana, López Pérez Mercedes, "El tequila, su aroma y su sabor", *Ciencias*, 87, Julio-Septiembre, México, 2007.
- [16] Gómez Raúl, Murillo Rogelio, "Espectroscopía Infrarroja".
- [17] López Nieves R., tesis licenciatura, "Identificación y discriminación de tequilas 100% agave mediante la aplicación de la Espectroscopia Ultravioleta-Visible y de Técnicas Quimiométricas Multivariantes", *UNAM. FES Cuautitlán. México*. 2015.
- [18] <http://www.artinaid.com/2013/04/que-es-la-luz-o-el-electromagnetismo/>
- [19] Fernández Espinosa A., "Especiación química y física de metales en la materia particulada atmosférica: aplicación al estudio de la contaminación ambiental en la ciudad de Sevilla", ed. *Universidad de Sevilla. Fundación Focus-Abengoa*.