



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**“DESARROLLO DE UN MODELO MEDIANTE REGRESIÓN
MULTIVARIANTE POR MÍNIMOS CUADRADOS PARCIALES (PLS) Y
ESPECTROSCOPIA INFRARROJA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE
LOS PRINCIPALES COMPUESTOS PRESENTES EN TEQUILAS”**

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE:

Q U Í M I C O

P R E S E N T A:

OLVERA MARQUEZ VICTOR HUGO

ASESORA: DRA. MARIA 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

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN
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

Desarrollo de un modelo mediante regresión multivariante por mínimos cuadrados parciales (PLS) y Espectroscopia infrarroja para la cuantificación de los principales compuestos presentes en tequilas.

Que presenta el pasante: Victor Hugo Olvera Márquez

Con número de cuenta: 303242596 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 01 de Junio de 2015.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. María Guadalupe Pérez Caballero	
VOCAL	Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez	
SECRETARIO	Dr. Julio César Botello Pozos	
1er. SUPLENTE	I.A. Sandra Margarita Rueda Enríquez	
2do. SUPLENTE	Q.F.B. Martha Angélica Villegas González	

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

IHM/mmgm*

Dedicatorias y Agradecimientos

El presente trabajo dedico de manera muy especial a mis padres, hermanos y a todas aquellas personas que han sido parte importante en mi vida, gracias por su apoyo, sus consejos.

A mi madre Ma. Luisa Márquez por todo el apoyo que me has brindado por enseñarme a luchar por mis sueños, te admiró mucho y gracias por todo el tiempo que me nos has brindado eres una gran persona.

A mi padre Prócoro Olvera gracias por enseñarme que cuando uno quiere hacer las cosas las realiza a pesar de toda dificultad que se pueda presentar, me enseñaste a no dejarme caer tan fácilmente, que con esfuerzo y dedicación uno puede llegar muy lejos.

A mis hermanos Luis Manuel y Guadalupe Karina por todo el apoyo que siempre he tenido de ustedes en los momentos buenos y malos.

A toda la familia Olvera.

A mi princesa María Roció López Nieves, gracias por estar a mi lado, por el amor que me demuestras, por todos los gratos momentos que hemos vivido, por todos los regaños que me has dado siempre con el fin de hacerme salir adelante. Te amo muchísimo, me siento feliz al compartir todos mis proyectos contigo. Saldremos adelante juntos.

A la señora Emma por todo el cariño que me ha brindado, gracias por hacerme sentir parte de su familia.

A Diana Fabiola López Nieves por brindarme tu amistad, gracias por hacerme sentir parte de tu familia.

A mis amigos de la Universidad Anabell, Ricardo, Roxana, Claudia, los cuales considero unos grandes amigos, fueron parte de los últimos años en la facultad los cuales fueron de gran felicidad, gracias por todos esos grandes momentos.

A Elizabeth Cruz me brindaste tu amistad y aunque te conozco poco tiempo te considero una gran amiga, gracias por esos momentos de felicidad que me has brindado.

Agradezco a mi asesora de tesis Dra. Guadalupe Pérez Caballero, Gracias por apoyarme en la realización de este proyecto, por todos los consejos y apoyo tanto profesional como personal que me han servido para seguir adelante. Gracias por esa bonita amistad que me ha brindado, es una gran persona.

Agradezco por las sugerencias y comentarios en la revisión de tesis a mis sinodales Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez, Dr. Julio César Botello Pozos, I.A. Sandra Margarita Rueda Enríquez, Q.F.B. Martha Angélica Villegas González.

Agradezco al Dr. José Manuel Andrade Garda de la Universidad de Coruña, España, por el gran apoyo que me brindo en el análisis quimiométrico.

Al M.C Yuri Castro, por haberme brindado su apoyo en el análisis PLS, le agradezco todo el tiempo brindado.

A mis profesores por compartir todo su conocimiento gracias por haberme dado una formación profesional.

Gracias a los integrantes del laboratorio 10 “Fisicoquímica Analítica” de la UIM de la FESC-UNAM, por haberme permitido trabajar en sus instalaciones ya que hicieron posible la realización de esta tesis.

Gracias a la Universidad Nacional Autónoma de México, en especial a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, por haber sido parte de mi formación académica y profesional.

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Índice

Síntesis.....	1
Introducción... ..	2
1. Objetivos	4
1.1. Generales.....	4
1.2. Particulares.....	4
2. Marco teórico	5
2.1. Tequila	5
2.1.1. Definición	5
2.1.2. Agave	5
2.1.3. Elaboración del tequila.....	6
2.1.4. Clasificación del tequila.....	9
2.1.5. Denominación de Origen	11
2.1.6. Características del tequila auténtico.	11
2.1.7. Composición de las bebidas destiladas.	12
2.1.8. Adulteración en bebidas alcohólicas.	13
2.1.9. Normas que rigen la calidad del tequila.	14
3. Espectroscopia IR.....	14
3.1. Introducción a técnicas espectroscópicas.....	14
3.2. Modos normales de vibración	16
3.3. Instrumentación	18
3.3.1. Espectrofotómetros FT-IR.....	19
3.3.2. Accesorios estándar	21
3.3.3. Regiones espectrales importantes en el IR	23
3.3.4. Aplicaciones del IR en análisis cualitativo	25
3.3.5. Análisis cuantitativo	26
3.4. Aplicaciones MIR en la industria.	27
4. Quimiometría.....	28
4.1. Etapas del proceso de modelado.	29
4.2. Diseño de experimentos.	33
4.3. Análisis cualitativo.....	33
4.3.1. Análisis en componentes principales (PCA).....	33

4.3.2. Análisis de agrupamientos (clusters)	34
4.4. Análisis cuantitativo.....	34
4.4.1. Regresión lineal múltiple (MLR).....	35
4.4.2. Regresión en componentes principales (PCR).....	36
4.4.3. Regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS).....	36
4.4.4. Elección del número de componentes principales.	37
5. Desarrollo experimental.....	40
5.1. Material y reactivos	40
5.1.1. Equipo	40
5.1.2. Reactivos	41
5.1.3. Material	41
5.1.4. Tequilas analizados	42
5.2. Procedimiento experimental	43
5.2.1. Preparación de solución etanol-agua.....	43
5.2.2. Preparación de soluciones madre	43
5.2.3. Preparación de estándares	44
5.2.4. Preparación de los sistemas	44
5.2.5. Medición de espectros	45
5.2.6. Software.....	46
5.3. Pretratamiento de espectros.....	46
5.4. Construcción de los modelos óptimos	46
5.5. interpretación de pruebas estadísticas.	47
6. Resultados y análisis de resultados	52
6.1. Características espectrales.....	52
6.2. Análisis de Mínimos Cuadrados Parciales a partir de datos de FT-MIR	55
6.2.1. Análisis de Mínimos Cuadrados Parciales (PLS) con el software QUANT+.	55
6.2.2. Modelo óptimo para la cuantificación de Acetato de Etilo	55
6.2.3. Cuantificación de metanol.	63
6.2.4. Cuantificación de 3-metil-1-Butanol.	70
7. Conclusiones.....	77
Referencia.....	78
ANEXO.....	80

Síntesis

En el presente trabajo se realizó la cuantificación algunos alcoholes secundarios presentes en los tequilas mediante mínimos cuadrados parciales (PLS) a partir de de espectros de infrarrojo medio (MIR) de 120 sistemas de los correspondientes analitos en concentración variable y conocida. Primeramente se obtuvieron los modelos óptimos para posteriormente aplicarlos en tequilas adquiridos en comercios de prestigio, con el objeto de cuantificar metanol, acetato de etilo y 3-metil-1-butanol.

Los datos de MIR se obtuvieron en un espectrofotómetro FT-IR MIR Perkin Elmer, en un Intervalo de 4000 a 400 cm^{-1} con resolución de 1 cm^{-1} y un ATR de diamante. Para lograr el modelo óptimo, se variaron las regiones del intervalo de número de onda, escalado, normalización, corrección de línea base y se eliminaron las muestras mal comportadas (muestras anómalas).

Se lograron obtener 3 modelos óptimos por mínimos cuadrados parciales (PLS) para la predicción de las concentraciones de metanol, acetato de etilo y 3-metil-1-butanol en tequilas. Se compararon las concentraciones obtenidas con las previamente determinadas por cromatografía de gases.

Los valores de concentración obtenidas de cada analito se localizaron dentro de las concentraciones máximas y mínimas permitidas en la NOM-006.SCFI-2012 para los tequilas.

Introducción

El tequila es consumido a nivel nacional e internacional. Es un aguardiente elaborado en una pequeña región de México, se obtiene de la planta agave "*Tequilana Weber*", mejor conocida como **agave azul**. Existen los denominados tequilas 100% agave, los cuales sólo contienen azúcares provenientes del agave tequilana weber 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-2012. [1]

El proceso de la elaboración del tequila consiste principalmente en los siguientes pasos: Se cortan las piñas. Se llevan a un horno. Se muelen y se coloca en tinas para la fermentación. Se destila. El tequila 100% agave o tequila mixto puede ser envasado o añejarse en barricas de roble blanco, para dar origen a diferentes tipos de tequila como lo son: blanco, joven, reposado, añejo y extra añejo. [2,9]

El tequila contiene sustancias congenéricas que se encuentran en una cantidad conocida como puede ser alcoholes superiores, ácidos, acetales, aldehídos, cetonas, esterres, furanos, fenoles, pirazinas, compuestos azufrados y terpenos. [3]

De acuerdo con la norma NOM-006-SCFI-2012 algunos compuestos presentes en el tequila deben encontrarse dentro de ciertos límites de concentración para poder acreditar la calidad del tequila. De acuerdo con la Norma Oficial Mexicana la concentración total de alcoholes superiores debe estar entre 20-500 mg/100 mL de etanol anhidro; al rebasar dicho valor puede afectar el sabor del tequila o causar daños en la salud del consumidor. En el metanol se establecen valores de concentración de 30-300 mg/100 mL de metanol anhidro. Su presencia en exceso puede tener efectos tóxicos como neuritis óptica y acidosis metabólica en los tejidos entre ellos destaca el ácido fórmico, responsable de graves trastornos de equilibrio ácido-base y el formaldehído que produce lesiones en la retina dando origen a la ceguera irreversible. [1]

Un reto cada vez más importante para la industria tequilera es la obtención de productos de calidad. Para asegurar esta calidad, es necesario que los productos cumplan con la normativa establecida antes de salir al mercado. Los métodos tradicionales consumen tiempo y son costosos. La industria moderna necesita, métodos de análisis simples, rápidos, fiables y con un bajo costo por análisis; es por ello que la espectroscopia MIR en combinación con las técnicas quimiométricas, constituyen una técnica idónea para el control de calidad.

En el presente trabajo se diseñó un modelo a partir de datos FT-MIR de 120 sistemas con concentraciones conocidas de los analitos de interés, en combinación con la técnica multivariante de mínimos cuadrados parciales (PLS) para cuantificar alcoholes superiores, metanol y acetato de etilo, metilpropanol, metilbutanol y propanol en diferentes tequilas comerciales con el fin de contar con un método más simple y rápido para verificar si los tequilas cumplen con la norma oficial mexicana.

1. Objetivos

1.1. Generales

Establecer un modelo de regresión/calibración multivariante por mínimos cuadrados parciales (PLS) para la cuantificación de los principales compuestos presentes (metanol, acetato de etilo, n-propanol, 3-metil-1-butanol y 2-metil-1-propanol) en diferentes marcas de tequilas a partir de datos espectroscópicos de infrarrojo (MIR) con el fin de contar con un método más simple y rápido para verificar si cumplen con la norma mexicana.

1.2. Particulares

Desarrollar modelos mediante la técnica multivariante de mínimos cuadrados parciales (PLS) a partir de espectros IR-MIR para la cuantificación de metanol, acetato de etilo y 3-metil-1-butanol en tequilas.

Aplicar los modelos óptimos para la cuantificación de alcoholes superiores en tequilas y compararlos con las concentraciones previamente obtenidas mediante cromatografía de gases.

2. Marco teórico

2.1. Tequila

2.1.1. Definición

Tequila es una palabra de origen náhuatl “*tequitl*” que significa trabajo u oficio y “*tlan*” lugar, es decir “*lugar de trabajo*”. [9]

La norma mexicana **NOM-006-SCFI-2012**, define al tequila como: “Bebida alcohólica regional obtenida por destilación de mostos, preparados directa y originalmente del material extraído, en las instalaciones de la fábrica de un productor autorizado la cual debe estar ubicada en el territorio comprendido en la declaración, derivados de las cabezas de “**Agave Tequilana Weber**” **variedad azul**, previa o posteriormente hidrolizadas cocidas y sometidas a fermentación alcohólica con levadura, cultivadas o no, siendo susceptibles los mostos de ser enriquecidos y mezclados conjuntamente en la formulación con otros azúcares hasta en una proporción no mayor de 49% de azúcares reductores totales expresados en unidades por masa.[1]

2.1.2. Agave

Las plantas de *Agave* son originarias del Continente Americano, con la mayor concentración de especies nativas de México en donde se les conoce con los nombres comunes de “magueyes” o “mezcales”. [6]

El Agave es una planta de la familia de las amarilidáceas, de hojas largas y fibrosas, de forma lanceolada, de color verde azulado, cuya parte aprovechable para la elaboración de tequila es la piña o cabeza. Florece de junio a agosto, fructifica de septiembre a diciembre. La única especie admitida para los efectos en la NOM-006-SCFI-2012, es el “**Agave Tequilana Weber**” variedad **azul**, que haya sido cultivada dentro de la zona señalada en la declaración (Figura 2.1.2.1). [3,9]



FIGURA 2.1.2.1 Agave Tequilana Weber

2.1.3. Elaboración del tequila.

La primera tarea es: selección de hijuelos de la especie agave “**Tequilana Weber**”; estos hijuelos deben estar libres de enfermedades y con una altura aproximada de 50 cm. [7]

A su vez, de acuerdo con la Declaratoria General de protección a la denominación de Origen Tequila y la NOM del Tequila, la citada variedad de agave debe cumplir con otros requisitos para que pueda ser utilizado en la fabricación de Tequila, esto es:

- Su cultivo debe realizarse dentro de una zona geográfica delimitada por la declaratoria general de denominación de origen.
- Debe estar registrado en el organismo de certificación del Tequila.

El ciclo de la planta es de aproximadamente 10 años, plazo en el que se alcanza su plena madurez; es decir, cuando es capaz de aportar las mejores mieles. [7]

Pasos para la elaboración del tequila:

- **Jima.** Acción que consiste en separar la parte no aprovechable de las hojas o pencas de agave cuando ésta ha alcanzado el desarrollo adecuado para su industrialización. El resultado de esta operación es la obtención de

la “piña” del agave formado por el tallo y la parte basal de las hojas o pencas en donde se encuentran almacenados los carbohidratos utilizados para la elaboración del Tequila. La herramienta utilizada en la jima del agave es la Coa. [1]

- **Recepción de la materia prima.** Después de la cosecha, las piñas se transportan a las industrias y antes de ingresarlas se realiza un muestreo para determinar la cantidad de azúcares reductores (fructuosa, glucosa). [2]
- **Cocimiento o hidrólisis.** Considerando que el principal carbohidrato que contiene el agave es la inulina (polímero de fructosa y glucosa) y que este compuesto no es susceptible de ser fermentado por las levaduras, es necesario realizar la hidrólisis para obtener azúcares simples (principalmente fructosa). Para ello, se utiliza principalmente un procedimiento térmico o enzimático o bien, la combinación de ambos. La hidrólisis se lleva a cabo en hornos de mampostería por 48 horas o autoclaves y en ambos casos se emplea vapor a una temperatura entre 100 y 110°C. [4,5,9]
- **Molienda:** La molienda se divide en varias etapas y tiene como propósito extraer los azúcares que se encuentran en la fibra del agave. La etapa de molienda se inician con el desgarramiento de las piñas, el cual consiste pasar el agave cocido por una máquina que se encarga de desmenuzarlo para, posteriormente, llevarlo a una sección en donde prensas de tipo cañero exprimirán los jugos. Una vez exprimido este material fibroso, pasa por una selección donde se aplica agua para la máxima extracción de los azúcares. Como resultado de este proceso se obtiene un jugo de agave que contiene un 12% de azúcares. Con esta materia prima se formula el mosto o caldo para la fermentación. [4,5,9]
- **Fermentación:** Es una de las etapas más importantes del proceso, ya que es aquí donde se lleva a cabo la transformación de los azúcares en alcohol etílico, y otros productos en menores proporciones. La fermentación se

lleva a cabo en grandes tinas de acero inoxidable, las cuales son cargadas con las mieles también llamadas mostos. [1,4,5,9]

- **Destilación:** Es el procedimiento por el cual los fermentos son separados, mediante calor y presión, en productos de riqueza alcohólica (tequila) y vinazas; estas últimas constituyen un producto de desecho. Los puntos de ebullición de los diferentes compuestos y los diversos volúmenes y presiones del alambique ayudan a la separación de gases, que se condensan en productos de mayor riqueza alcohólica. En la elaboración del tequila son necesarias dos destilaciones, la primera llamada “destrozamiento” y la segunda llamada “rectificación” en la cual se incrementa la riqueza alcohólica y se eliminan los productos indeseables, obteniendo un producto de mayor pureza, el tequila que se recibe del “destrozamiento” o primera destilación se le llama “tequila ordinario”, y el que termina de la segunda destilación o “rectificación” es considerado como “tequila blanco”. Además de las vinazas, existen otros subproductos del inicio y final de la destilación conocidos como “cabezas” y “colas” respectivamente. [9,10]
- **Añejamiento:** La finalidad del añejamiento es conferir al tequila el color, aroma y sabor característico, el cual se deposita en barricas de roble blanco o encino, donde permanece de 5 meses a 3 años. Finalmente se ajusta el contenido alcohólico a 38-40°G.L el cual es filtrado para separar algunas partículas provenientes de barrica. [9,10]

La figura 2.1.3.1 ilustra el proceso anteriormente descrito de la elaboración del tequila.



FIGURA 2.1.3.1 Proceso de la elaboración de Tequila (DOT).

2.1.4. Clasificación del tequila

Existe en el mercado una gran variedad de marcas de tequila; algunas con un reconocido prestigio y otras nuevas de dudosa calidad. La **NOM-006-SCFI-2012**, indica dos categorías básicas de tequilas: tequila 100 % agave y tequila mixto. [1]

- **Tequila 100% de agave**

Producto que no es susceptible en la fermentación de ser enriquecido con otros azúcares distintos a los obtenidos del **“Agave Tequilana Weber” variedad azul** de alta calidad.

Para que este producto sea considerado como **“Tequila 100% de agave”** debe ser embotellado en la planta de envasado que controle el propio productor autorizado, misma que debe estar ubicada dentro del territorio comprendido en la declaración.

Este producto debe ser denominado únicamente a través de alguna de las siguientes leyendas: **“100% de agave”** o **“100% puro de agave”**. [1]

- **Tequila mixto o simplemente tequila**

Es aquel producto que se obtiene de la destilación y rectificación de mostos, en cuya formulación se han adicionado hasta una proporción no mayor del 49% de azúcares, distintos derivados de la molienda, como pueden ser glucosa, piloncillo o sacarosa. [2]

De acuerdo a las características adquiridas en procesos posteriores a la destilación y rectificación, el tequila 100% agave y el tequila mixto se clasifican en una de las siguientes clases:

- **Tequila blanco.** Producto embotellado posterior a la destilación.
- **Tequila abocado, joven u oro.** Es un producto igual al blanco, sólo que a diferencia de haber sido modificado, en color y sabor, para hacerlo parecer lo más posible a un producto reposado o bien siendo la mezclas de tequila blanco con tequilas reposados; la forma de modificarlo es la que es aceptada por el CRT, con insumos que ellos permiten.
- **Tequila reposado.** Sujeto a un proceso de maduración de por lo menos tres meses en recipientes de madera de roble o encino y hasta once meses.
- **Tequila añejo.** Sujeto a un proceso de maduración de por lo menos un año en recipientes de madera de roble o encino, cuya capacidad máxima sea de 600 litros; su contenido alcohólico comercial debe, en su caso, ajustarse con agua de dilución.
- **Tequila Extra Añejo.** Sujeto a un proceso de maduración de por lo menos tres años en barricas de roble blanco o encino, sin especificar el tiempo de maduración en la etiqueta. [9]

2.1.5. Denominación de Origen

Para que la bebida destilada del agave azul pueda ser llamada tequila, tiene que ser producida en un área delimitada geográficamente. Actualmente se ha permitido que dicha denominación también pueda ser usada por los 125 municipios de Jalisco, 7 municipios de Guanajuato, 30 municipios de Michoacán, 8 municipios de Nayarit y 11 municipios de Tamaulipas, con un total de 181 municipios de 5 estados (Figura 2.1.5). [6,7]

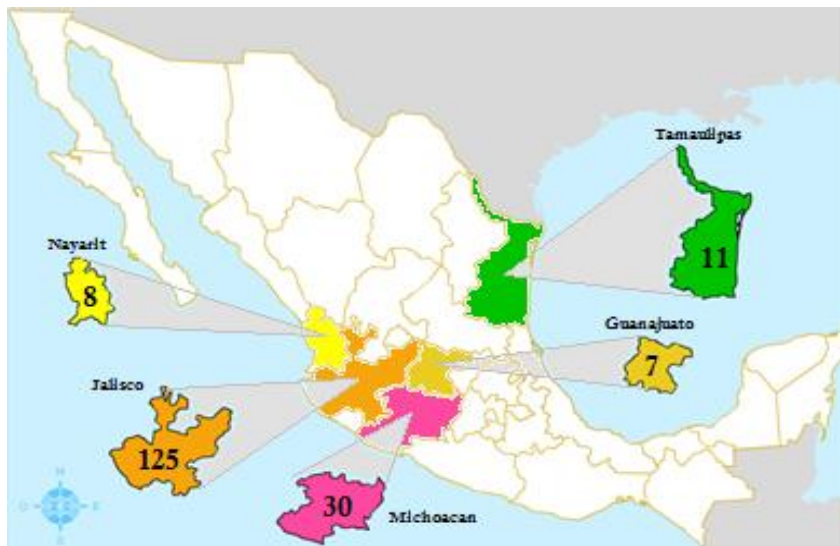


FIGURA 2.1.5 Estados con denominación de origen tequila (DOT).

2.1.6. Características del tequila auténtico.

El Consejo Regulador del Tequila (CRT) tiene como funciones salvaguardar la denominación de origen del tequila, tanto a nivel nacional como internacional y la de garantizar al consumidor la autenticidad del tequila dando las siguientes indicaciones en la etiqueta. (Figura 4.1.6.1)

- La palabra TEQUILA
- Categoría: (TEQUILA O TEQUILA 100% DE AGAVE)
- Clase: blanco, joven, reposado, añejo y extra añejo.
- Contenido neto expresado en litros o mililitros.
- Porcentaje de alcohol en volumen "Alc. Vol." (de 35% a 55%).

- Nombre o razón social del productor y domicilio de productor y envasador.
- Leyenda “HECHO EN MÉXICO”.
- Contraseña oficial NOM y número de productor autorizado (4 dígitos).
- Lote.
- Leyenda precautoria.
- Marca registrada.



FIGURA 2.1.6.1 Características de la etiqueta del tequila.

2.1.7. Composición de las bebidas destiladas.

Compuestos que confieren sabor y aroma:

- **Metanol:** Muy frecuente en productos elaborados a partir de fruta ya que éstos contienen pectinas que pueden desprender metanol. Se considera una sustancia indeseable y tóxica ya que en concentraciones altas puede ocasionar ceguera y muerte.

- **Alcoholes superiores:** También denominados alcoholes de fusel. Se encuentran en altas concentraciones en cualquier tipo de bebidas destiladas. Si estas concentraciones son excesivamente altas se pueden considerar como sustancias indeseables. Entre los principales se encuentra el isoamílico y el isobutílico.
- **Ácidos orgánicos:** El principal es el ácido acético que proviene una parte de la fermentación y por otra parte de la madera de la barrica. Otros ácidos orgánicos importantes son el propiónico, isobutírico y el caproico.
- **Ésteres de ácidos grasos:** El más importante es el acetato de etilo.
- **Compuestos carbonílicos:** El más importante es el acetaldehído. Otros son el furfural y la vainilla, muchos de ellos procedentes de las barricas.

Estos compuestos son los que van a caracterizar los distintos tipos de bebidas destiladas, ya que proporcionan su sabor agradable al tequila. [10]

2.1.8. Adulteración en bebidas alcohólicas.

La adulteración se refiere a una parcial o total sustitución de una especie por otra y frecuentemente involucra la mezcla de productos auténticos con unos similares, pero menos caros. Esta adulteración no es fácil de detectar, aunque frecuentemente hay marcadores naturales presentes en el material adulterado que pueden ser monitoreados. La detección de la autenticidad tiene particular importancia en bebidas alcohólicas, porque éstas generalmente están asociadas con una región de origen específico, lo que hace más importante al producto. [11]

2.1.9. Normas que rigen la calidad del tequila.

De acuerdo a la **NOM-006-SCFI-2012**, tanto el tequila 100% agave como el tequila mixto debe cumplir con las especificaciones señaladas TABLA 2.1.9.1 [1]

TABLA 2.1.9.1 Especificaciones fisicoquímicas del tequila [1]

Valores expresados en mg/100mL de alcohol anhidro								
Parámetros	Tequila blanco		Tequila joven		Tequila reposado		Tequila añejo	
	MIN	MAX	MIN	MAX	MIN	MAX	MIN	MAX
Alcoholes superiores	20	500	20	500	20	500	20	500
Metanol	30	300	30	300	30	300	30	300
Acetato de etilo	2	200	2	200	2	200	2	200

Como materia prima para la elaboración de bebidas alcohólicas, la **NOM-142-SSA1-1995** únicamente permite el uso de alcohol etílico cuyo contenido de productos secundarios no exceda las siguientes especificaciones TABLA 2.1.9.2. [12]

TABLA 2.1.9.2. Especificaciones sanitarias. [12]

Especificaciones	Límite máximo mg/100mL de etanol anhidro
Metanol	100
Aldehídos	30
Furfural	4
Alcoholes Superiores	200

3. Espectroscopia IR

3.1. Introducción a técnicas espectroscópicas

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

implicada. 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 $12800-10\text{ cm}^{-1}$. 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: $4000-400\text{ cm}^{-1}$; IR lejano: $400-10\text{ cm}^{-1}$, siendo en el IR medio 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 NIR 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. Es utilizado 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. [22,23]

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.

La espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR) aplicada a materiales biológicos proporciona un reflejo de la composición química y

estructural de los mismos. Los espectros de absorción de los materiales biológicos complejos están representados por bandas constituidas por una superposición de picos originados por la absorción de sus constituyentes (proteínas, carbohidratos, lípidos y otros compuestos de bajo peso molecular), representando “huellas digitales” altamente específicas de los mismos. FT-IR ha sido empleada a nivel mundial en el análisis de fluidos humanos (sangre, suero, orina, líquido sinovial, líquido amniótico, etc.) bacterias, hongos, virus, células individuales, tejidos, secciones de tejidos, etc., lo que ha permitido el diagnóstico de diversas enfermedades infecciosas, procesos oncológicos y odontología. En el caso del estudio de microorganismos los espectros FT-IR revelan una imagen de la composición química de la pared celular.

3.2. Modos normales de vibración

Las vibraciones en moléculas poliatómicas son mucho más complejas que en la simple molécula diatómica que *sólo puede vibrar en un modo* (stretching).

El número de modos independientes de vibración en una molécula de N átomos se calcula asumiendo que el movimiento de cada átomo se puede describir en términos de desplazamientos a lo largo de tres direcciones espaciales, de modo que tendremos $3N$ desplazamientos a considerar. Tres combinaciones de esos desplazamientos resultan en el movimiento en el espacio de toda la molécula y por tanto se corresponden con traslaciones de su centro de masas (figura 3.2.1). Si la molécula es no-lineal, otras tres combinaciones de desplazamientos especifican la rotación de toda la molécula alrededor de su centro de masas, por lo que quedan $3N-6$ combinaciones de desplazamientos en los átomos que dejan el centro de masas y la orientación de la molécula inalterados, y que son las distorsiones de la molécula que nos interesan. [23]

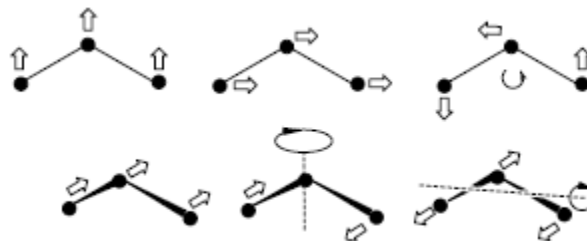


FIGURA 3.2.1 Tipos de vibración

Estos modos normales son por tanto movimientos particulares del colectivo de átomos que conforman la molécula, independientes unos de otros y con su frecuencia de vibración característica. Aunque estos movimientos sean colectivos, en muchos casos es posible identificar la vibración como principalmente de tipo *stretching* o de tipo *bending*.

El requerimiento general para absorber radiación infrarroja es que la vibración debe producir un **cambio neto en el momento dipolar** de la molécula. (Ej. $\text{N}\equiv\text{N}$ inactivo; $\text{C}\equiv\text{O}$ activo)

En moléculas altamente simétricas es frecuente que pares o triadas de modos sean idénticos. En este caso se llaman modos de vibración degenerados y dan lugar a una sola banda. (Ej. $\text{W}(\text{CO})_6$ una única banda *stretching*). [23]

Regla de exclusión: si una molécula tiene centro de inversión ninguno de sus modos normales puede ser activo a la vez en IR y Raman, pudiendo ser un modo inactivo en ambos.

Las vibraciones que tienen frecuencias muy cercanas suelen aparecer como una sola banda.

Las vibraciones que tienen poca intensidad pueden no ser observadas.

3.3. Instrumentación

Los espectrofotómetros IR tienen los mismos componentes básicos que el resto de aparatos utilizados en procesos de absorción; por ejemplo, en el estudio de la zona visible-ultravioleta del espectro. Básicamente, se necesita un instrumento para medir la transmisión de radiación electromagnética de una muestra en función de la longitud de onda o del número de ondas. El elemento más importante debe permitir aislar la radiación de regiones espectrales definidas y permite diferenciar entre los distintos tipos de espectrofotómetros: no dispersivos, dispersivos y de transformada de Fourier (FT). En éstos últimos, se utiliza un interferómetro que permite una modulación de la radiación dependiente de la longitud de onda. Otro elemento esencial en los espectrofotómetros es una fuente de radiación que debe aportar la mayor intensidad posible en la región de longitud de onda que se está investigando. Las fuentes de radiación térmicas son las más utilizadas, proporcionando una radiación continua. El propósito del sistema óptico es transmitir la radiación desde la fuente al detector con la mínima pérdida. Los sistemas de lentes de vidrio o cuarzo utilizados en otras regiones no tienen utilidad en el IR porque absorben radiación, de modo que se utilizan espejos de vidrio con un recubrimiento de oro o aluminio. El sistema óptico va equipado con un compartimento para la muestra, en el que ésta se sitúa en el camino de la radiación, bien mediante celdas u otros accesorios que permitan realizar medidas diferentes a la transmisión. (Ej. *Attenuated Total reflectance*: ATR) El detector se emplea para convertir la señal óptica en una señal eléctrica fácilmente medible, como el voltaje. Esto se consigue con la ayuda de equipos electrónicos para amplificar y digitalizar las señales. Mientras que los primeros espectros se registraban de forma analógica sobre papel, hoy en día el ordenador es un componente esencial con múltiples posibilidades para procesar y almacenar los espectros. Los aparatos basados en el método de transformada de Fourier ofrecen una relación señal/ruido mucho mejor y mayor rapidez en la obtención de espectros, por lo que se imponen en el mercado. A continuación se esquematiza un instrumento de este tipo. (Figura 3.3) [22]

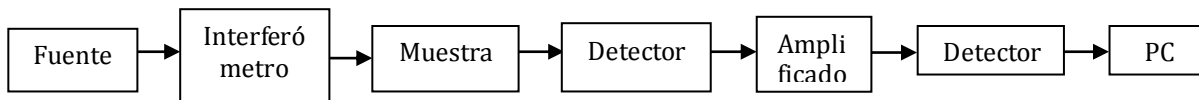


FIGURA 3.3 esquema de general de los componentes de un espectrofotómetro IR

3.3.1. Espectrofotómetros FT-IR.

Los espectrofotómetros dispersivos son los primeros que se utilizaron, aunque muy pocos quedan activos en la actualidad para medidas de rutina en el IR-medio. Emplean un dispositivo para restringir la longitud de onda que se mide de forma sucesiva, frente a la medida simultánea de todas las longitudes de onda que realizan los aparatos basados en la transformada de Fourier. En éstos últimos el componente más importante es el interferómetro (Figura 3.3.1.1)

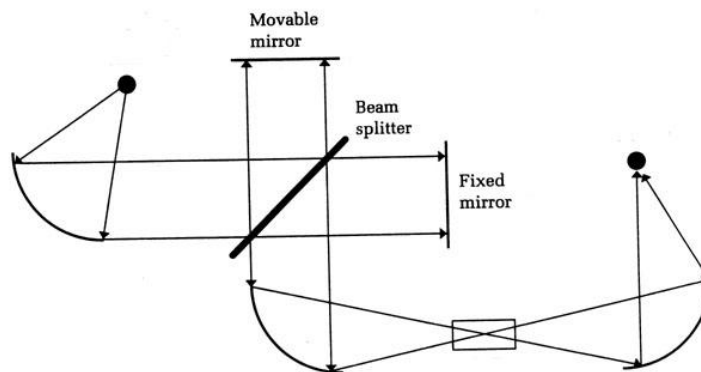


FIGURA 3.3.1.1. Esquema de un espectrómetro FT-IR con un interferómetro Michelson clásico.

En un interferómetro Michelson el haz de radiación que viene de la fuente se divide mediante un espejo semipermeable en dos haces parciales que se reflejan en sendos espejos, uno fijo y otro móvil, vuelven al *beamsplitter* y se recombinan en interferencia. Un desplazamiento del espejo móvil cambia el camino óptico en ese brazo del interferómetro, introduciendo una diferencia de fase entre los haces y por tanto un cambio en la amplitud de la interferencia. La intensidad de señal

que llega al detector tras atravesar la muestra, representada como función de la diferencia en la trayectoria de ambos haces (retardo) es lo que se llama interferograma. Con una radiación monocromática se obtiene una señal coseno, que en el caso de caminos ópticos idénticos en ambos brazos proporciona una interferencia constructiva sin diferencia de fase entre los haces y por tanto una intensidad máxima. [22]

En la Figura 3.3.1.2 se muestran algunos interferogramas y los espectros (intensidad en función de frecuencia o número de ondas) a los que dan lugar mediante el tratamiento matemático de transformada de Fourier, observándose que para bandas espectrales anchas el máximo del interferograma cae rápidamente.

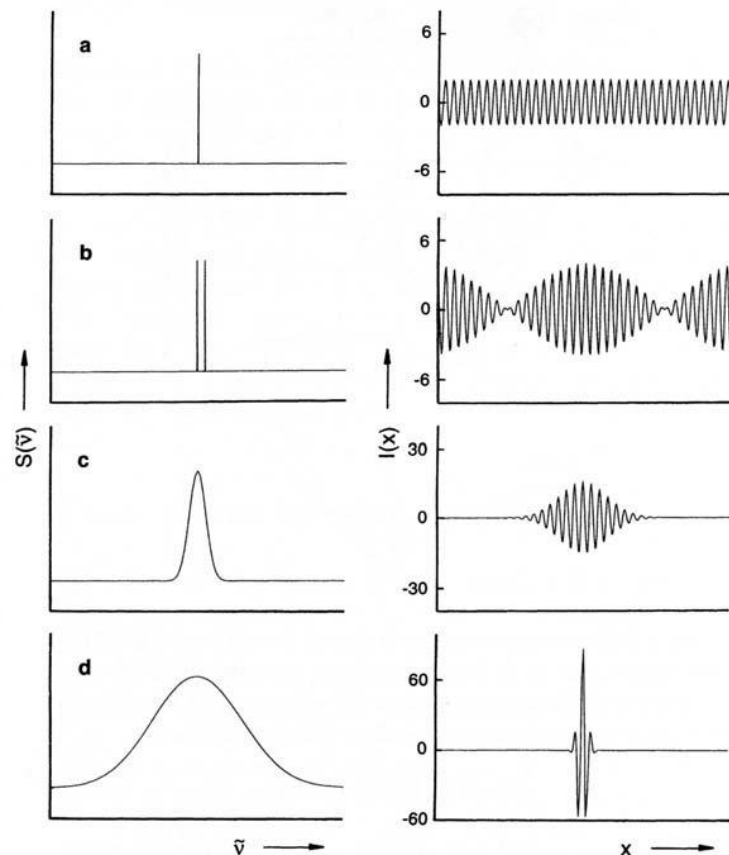


Figura 3.3.1.2: Espectros (izquierda.) y sus respectivos interferogramas. Radiación monocromática(a) y radiación continua de una fuente térmica (d)

La mayoría de espectrómetros FT-IR son instrumentos de un sólo haz con un diseño similar al que se muestra en la Figura 3.3.1.3.

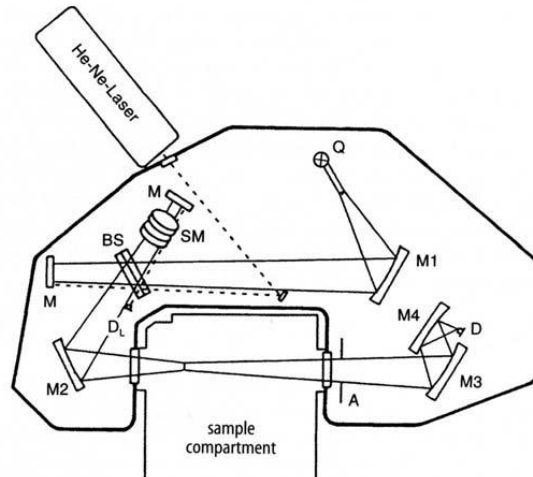


Figura 3.3.1.3 Diseño general de FT-IR

3.3.2. Accesorios estándar

Celdas: son contenedores con un camino óptico definido apropiados para situar muestras líquidas o gaseosas en el paso del haz, que deben cumplir los siguientes requisitos: [23]

- Las ventanas deben ser permeables al paso de la radiación a las longitudes de onda en uso, y de ser posible no provocar pérdidas por reflexión o dispersión.
- El material debe ser resistente a la muestra.
- El camino óptico debe estar perfectamente definido para análisis cuantitativo y permitir variaciones en el análisis cualitativo.
- En la medida de lo posible deben permitir recuperar la muestra.

Accesorios de reflectancia total atenuada (ATR): Esta gama de dispositivos son especialmente útiles para obtener espectros IR de muestras que no pueden ser colocadas en los soportes habituales para el método de transmisión. Así, son

apropiadas para estudiar sólidos gruesos insolubles o muy absorbentes, muestras líquidas, incluyendo láminas, recubrimientos, polvos, hilos, adhesivos, polímeros y muestras acuosas. La ATR requiere poca o ninguna preparación para la mayoría de las muestras y es una de las técnicas de muestreo más versátiles.

La ATR ocurre cuando un haz de radiación entra desde un medio más denso (con un mayor índice de refracción) en un medio menos denso (con un menor índice de refracción). La fracción del haz incidente reflejado se incrementa cuando aumenta el ángulo de incidencia. Toda la radiación incidente se refleja en la interfaz cuando el ángulo de incidencia es mayor que el ángulo crítico (que es función del índice de refracción). El haz penetra una distancia muy pequeña más allá de la interfaz hacia el medio menos denso antes de que suceda la reflexión completa. Esta penetración se llama «onda evanescente» y se produce a una profundidad de unas pocas micras. Su intensidad se ve atenuada por la muestra en las regiones del espectro IR donde la muestra absorbe. [22]

Reflectancia especular: Constituye un método no destructivo para analizar capas delgadas sobre sustratos selectivos sin necesidad de preparación de la muestra. La reflexión especular se observa cuando el medio reflectante es una superficie enormemente pulida. En este caso el ángulo de reflexión es igual al ángulo de incidencia de la radiación. Si la superficie contiene una sustancia capaz de absorber radiación en el infrarrojo, la intensidad relativa de la reflexión es menor en las longitudes de onda donde la superficie absorbe que en las longitudes de onda en las que no hay absorción. Por ello, la representación gráfica de la reflectancia, que es la fracción de la potencia radiante incidente que se refleja respecto a la longitud de onda o número de onda, proporciona un espectro para un compuesto que es similar, en su aspecto general, al espectro de transmisión de la especie.

Reflectancia difusa: La espectrometría de reflectancia difusa es una forma eficaz de obtener espectros en el infrarrojo directamente sobre muestras pulverizadas con un mínimo de preparación de la misma. Además de ahorrar tiempo en la preparación de la muestra, permite la obtención de datos de la región espectral del

infrarrojo convencional de muestras que no han sufrido una alteración apreciable de su estado original.

3.3.3. Regiones espectrales importantes en el IR

El IR medio se suele estudiar en cuatro zonas:

Región de vibración de extensión X-H (4000-2500 cm^{-1})

Esta absorción corresponde a la extensión de enlaces con hidrógeno (alcoholes, aminas y enlaces C-H), y no se ve muy afectada por el resto de la molécula por lo que las bandas son bastante constantes en esa zona.

Las vibraciones de *stretching* C-H de los grupos metilo y metileno son las más características a la hora de identificar un compuesto como orgánico conteniendo al menos un centro alifático, y aparecen entre 3000-2850 cm^{-1} .

El O-H *stretching* produce una banda ancha en el rango 3700-3600 cm^{-1} , que probablemente es una de las más dominantes y características entre las absorciones de grupos funcionales. Si hay enlace por puente de hidrógeno (muy frecuente aunque en distinta extensión) se produce un ensanchamiento de las bandas y una ligera disminución en la frecuencia de absorción. La distinción entre alcoholes primarios, secundarios y terciarios se hace con la ayuda de las bandas C-O- *stretching* y O-H *bending*.

El N-H *stretching* se suele observar entre 3400 y 3300 cm^{-1} y generalmente es una absorción más aguda que la O-H. Los compuestos con el grupo NH_2 presentan una estructura doblete mientras que las aminas secundarias tienen una única banda aguda.

Región del triple enlace (2500-2000 cm^{-1})

En esta región absorbe un número muy limitado de compuestos, de modo que su presencia se hace fácilmente evidente ($-\text{C}\equiv\text{N}$, $\text{C}\equiv\text{O}$, $-\text{C}\equiv\text{C}-$, $-\text{N}^+\equiv\text{C}^-$). Mientras que el $-\text{C}\equiv\text{C}-$ *stretching* se presenta como una banda muy débil, las demás son de intensidad media.

Región del doble enlace (2000-1550 cm^{-1})

Las bandas principales se deben al grupo carbonilo $\text{C}=\text{O}$ (1830-1650 cm^{-1}) y al doble enlace $\text{C}=\text{C}$, siendo la primera mucho más intensa que la segunda y una de las más fáciles de reconocer en el espectro. Otras bandas en esta zona son la $\text{C}=\text{N}$ y la flexión de aminas y alcoholes. [22]

Una serie de bandas débiles de combinación entre 2000 y 1650 cm^{-1} se suelen utilizar para asignar el grado de sustitución en anillos bencénicos.

Si hay humedad en la muestra, absorciones anchas debidas a las vibraciones O-H en torno a 3500 y 1400 cm^{-1} ocultan la existencia de otras posibles bandas en esas zonas.

Región de huella dactilar (1500-600 cm^{-1})

En esta región del espectro pequeñas diferencias en la estructura y la constitución de una molécula dan por resultado cambios importantes en la distribución de los picos de absorción. Como consecuencia, la correspondencia de dos espectros en esta región constituye una prueba de su identidad. Muchos enlaces sencillos absorben en esta región y se produce fuerte interacción entre enlaces vecinos. Debido a su complejidad, es muy difícil interpretar de forma exacta el espectro en esta región (a diferencia de las anteriores), pero es esta complejidad y singularidad la que permite la utilidad de identificación como “huella dactilar”.

3.3.4. Aplicaciones del IR en análisis cualitativo

La identificación de grupos funcionales específicos, especialmente en moléculas orgánicas, es la aplicación principal de la espectroscopia IR, en tanto que permite la caracterización de sustancias desconocidas y el seguimiento de especies concretas. A continuación se presentan las principales familias de compuestos en los que esta técnica ha encontrado aplicación cualitativa.

– **Compuestos orgánicos**

Una de las principales aplicaciones de la Espectroscopia IR es la identificación de compuestos orgánicos.

– **Compuestos inorgánicos**

Los compuestos inorgánicos son estudiados habitualmente por IR. Reciben especial atención los compuestos de boro, silicio y fósforo.

– **Polímeros**

Esta técnica es un método habitual para la caracterización de polímeros, ofreciendo información sobre la estructura y composición del material. Así, se obtienen datos de isomería conformacional y configuracional, enlaces por puente de hidrógeno, orden en la cadena y cristalinidad.

– **Sistemas biológicos**

La comprensión de las relaciones entre la estructura y la función de los materiales biológicos es uno de los retos en la biología actual. La Espectroscopia IR ha demostrado ser una herramienta poderosa en el estudio de moléculas biológicas, especialmente las proteínas y los lípidos. [23]

3.3.5. Análisis cuantitativo

Cada propiedad de una sustancia que dependa claramente de su concentración puede utilizarse como base para un método de análisis cuantitativo. En el caso del IR se utiliza la cantidad de radiación electromagnética absorbida, y el parámetro a medir es el cociente entre la intensidad de la radiación (de una longitud de onda determinada) antes y después de atravesar la muestra. La ley de Beer describe la relación entre esta magnitud determinada experimentalmente y la concentración:

$$A = -\log (I/I_0) = a \cdot b \cdot c \quad (3.3.5)$$

Donde **b** es el espesor de la celda que atraviesa la radiación y **a**, la absorptividad molar, es una constante para cada sustancia a una longitud de onda. Esta relación de proporcionalidad directa motiva que sea la absorbancia la magnitud utilizada en estudios cuantitativos, mientras que la transmitancia se prefiere en los estudios cualitativos. En teoría, para analizar una disolución de concentración desconocida se deben preparar disoluciones patrón, elegir una banda adecuada, medir la absorbancia a esa longitud de onda y dibujar una recta de calibrado. La concentración de la muestra problema se hallará en esta recta de calibrado a partir del dato experimental de absorbancia medido en el aparato. Algunos matices importantes a esta situación son necesarios: respecto a la preparación de disoluciones de concentración conocida, deben tener valores de Absorbancia adecuados, ni demasiado débiles ni demasiado intensos; hay que elegir cuidadosamente el pico de absorción entre los más intensos que no presenten solapamiento (el estiramiento *stretching* del grupo carbonilo C=O es muy utilizado); cuando aparecen picos asimétricos (frecuente en muestras sólidas) se debe utilizar el área bajo las bandas en lugar de la altura máxima. [23]

Determinación de la absorbancia

Frente a la determinación del área total bajo una banda, se suele preferir la medida de la intensidad en el máximo de un pico A_{\max} en la posición de número de ondas correspondiente. Para ello se registra el fondo (*background*) colocando la

celda con el disolvente puro, que debe tener un índice de refracción similar al del material utilizado en la ventana. Luego se pone la muestra en la celda y se registra el espectro, a partir del cual se calcula la intensidad. Para ello se traza una línea perpendicular en el máximo de absorción y su transmitancia se mide en el eje Y. El valor de la línea de base en este eje se toma como I_0 de modo que el cálculo de A es inmediato. Actualmente los aparatos van acompañados de un software que permite realizar estas medidas de forma sencilla y automatizada, y la presentación en absorbancia es una opción disponible. [23]

Los avances de la tecnología de los computadores asociados a la espectroscopía ha permitido la expansión del IR cuantitativo. La aplicación de métodos estadísticos al análisis de datos experimentales se conoce como quimiometría, y hoy en día se considera el último paso en la determinación de la composición de una muestra: el cálculo y la evaluación de los resultados analíticos. Los métodos más frecuentes en la espectroscopia infrarroja son los mínimos cuadrados clásicos (CLS), inverso (ILS) o parcial (PLS) o la regresión de componentes principales (PCR). Cuando no es necesario conocer la concentración específica de las especies, sino conocer cuáles de ellas están presentes en una mezcla compleja. Estos métodos pueden comparar muchas variables dentro de un juego de datos, como intensidad, frecuencia y anchura de banda. [23]

3.4. Aplicaciones MIR en la industria.

Industria farmacéutica: La espectroscopia IR es un complemento ideal a la Resonancia magnética Nuclear y la Espectrometría de masas, y se ha utilizado ampliamente tanto en la evaluación de materiales crudos como en la producción de los compuestos activos y excipientes. La caracterización de los diferentes polimorfos de una droga se puede llevar a cabo por IR y cobra especial relevancia porque la actividad de una de las formas puede ser muy superior a las demás.

Industria alimentaria: Tanto el IR-medio como el cercano (NIR) se han utilizado para obtener información cualitativa y cuantitativa de muestras de alimentos. Éstos

son mezclas complejas que contienen agua, proteínas, grasas y carbohidratos como componentes mayoritarios.

Control de la contaminación: El control rutinario de los niveles de sustancias tóxicas en el medioambiente (aire, agua y suelo), ha impulsado el desarrollo de técnicas para análisis cuantitativo automático.

Otros usos: Esta técnica se ha empleado con éxito en el estudio de combustibles fósiles, por ejemplo determinando su contenido de agua. El análisis multicomponente se ha aplicado al estudio de minerales,. Por último, el IR se ha utilizado en catálisis para identificar las especies adsorbidas en la superficie y el modo en que tiene lugar esta unión. [23]

4. Quimiometría

Las raíces de la quimiometría se remontan al año 1969 cuando Kowalski, Jurs e Isenhour publicaron una serie de trabajos sobre la aplicación de máquinas de aprendizaje lineal para clasificar espectros de masa de baja resolución. Siguiendo estas primeras iniciativas, otros grupos empezaron a trabajar en problemas similares de clasificación. Grupos como el liderado por Wold que trabajaron con algoritmos de clasificación como SIMCA, o Massart en el campo de la optimización de métodos cromatográficos. En el año 1972 aparece por primera vez el nombre de quimiometría en un trabajo de Svante Wold. Paralelamente, Kowalski usó el nombre de “Laboratory of Chemometrics” para su grupo de investigación. [16]

Las técnicas instrumentales, y especialmente las espectroscópicas, generan una gran cantidad de datos relativos a las muestras analizadas en breves intervalos de tiempo. [17]

Pero ello, no quiere decir que cuantos más datos se obtengan, más información se tiene del sistema. Tal y como dijeron Beebe y Kowalski en 1987, sólo cuando los datos son interpretados y utilizables se convierten en valiosos para los químicos y para la sociedad en general; entonces los datos se convierten en información. En

este punto es donde la quimiometría juega un papel decisivo, la cual puede ser definida como la parte de la química que, utilizando métodos matemáticos, estadísticos y de lógica formal a) diseña o selecciona procedimientos de medida óptimos y b) proporciona la máxima información relevante de los datos analíticos. [16]

La quimiometría abarca diversos objetivos como el filtrado de señales (pretratamientos aplicados a los datos experimentales para mejorar la calidad de la señal), métodos de reconocimiento de pautas (técnicas multivariadas mediante las que se pueden establecer agrupaciones de muestras en función de su similitud y métodos de clasificación de nuevas muestras) y métodos de calibración (técnicas multivariadas mediante las cuales se busca una relación cuantitativa entre la señal analítica y alguna propiedad de la muestra). Son muchas las técnicas quimiométricas que se pueden utilizar para llevar a cabo estos objetivos. [19]

4.1. Etapas del proceso de modelado.

Se define como modelo multivariable a la relación matemática que se establece entre las variables analíticas (por ejemplo, un espectro MIR) con las propiedades físicas o químicas (presión, tamaño de partícula, concentración, etc.) de uno o varios analitos de una muestra. Los modelos multivariados se diferencian de los univariados en que estos últimos, relacionan una única variable con la propiedad a determinar, mientras que los multivariados relacionan varias variables X con una o varias variables Y . [17,19]

El principal objetivo de los métodos multivariados es establecer modelos, de clasificación o de calibración, los cuales sean capaces de predecir las propiedades modeladas de muestras desconocidas.

Para la construcción de un modelo de calibración es conveniente seguir estos pasos:

1. Selección de un conjunto de calibración o entrenamiento.

Obtención de un número de muestras suficientes para la creación del modelo las cuales se conoce la propiedad a determinar. El conjunto debe ser representativo de toda la variabilidad química y física de la muestra con la finalidad de obtener métodos analíticos robustos. En modelos cualitativos deberán recoger variabilidad del tipo: tamaño de partícula, densidad, proveedor, etc.; en cambio, para modelos cuantitativos además de la variabilidad mencionada deberán cubrir el intervalo del parámetro a determinar, como por ejemplo, la concentración de analito. La construcción o selección de un adecuado conjunto de calibración, es quizá, el paso más crítico de la construcción de un modelo de calibración, ya que de ello dependerán los resultados de predicción. [17,19]

2. Métodos de referencia.

El desarrollo de modelos cuantitativos requiere el conocimiento previo de las variables que van a ser determinadas. Para ello se utilizan los métodos de referencia que deben proporcionar valores precisos y exactos, ya que de ellos dependerá la calidad del modelo a desarrollar [17,19].

3. Registro de la información analítica.

Registro de información analítica primaria que se va a utilizar en la construcción del modelo de calibración En esta tesis la información química se extraerá de los espectros MIR. Los espectros MIR se caracterizan por tener bandas anchas y solapadas, es por ello, que es necesario un posterior tratamiento matemático de los datos para obtener la información de interés.

4. Pretratamiento de los datos.

Los pretratamientos espectrales son correcciones del espectro basado en tratamientos matemáticos. [16, 17, 19]

Una vez obtenidos los espectros MIR de las muestras seleccionadas, puede ser necesario aplicar un pretratamiento espectral que permita aumentar la relación señal/ruido y por ende acrecentar la señal correspondiente al analito

de interés. No todos los pretratamientos consiguen ambos objetivos simultáneamente, por lo que la selección del más apropiado es puramente experimental.

Los pretratamientos espectrales más utilizados son:

- *Promedio de espectros*: el cálculo del espectro promedio de una muestra reduce el ruido espectral, ya que éste es considerado aleatorio.
- *Centrado de los datos*: se calcula el valor medio de cada variable de la matriz y se resta en cada punto de la columna. El valor medio corresponde al centro del modelo, y los valores de todas las variables se encuentran ahora referidos a este centro.

$$x'_{i,m} = x_{i,m} - x_m \quad (4.1.1)$$

Donde $x'_{i,m}$ es el dato centrado, $x_{i,m}$ es el dato de la fila i (o espectro i) y la columna m (o la variable m) antes del centrado y x_m es la media de la columna m .

- *Autoescalado de los datos*: posteriormente al centrado de cada columna, se divide el resultado por la desviación estándar de la columna.

$$x'_{i,m} = \frac{x_{i,m} - x_m}{s_m} \quad (4.1.2)$$

Donde $x'_{i,m}$ es el dato autoescalado, $x_{i,m}$ es el dato de la fila i (o espectro i) y la columna m (o la variable m) antes del autoescalado, x_m es la media de la columna m y s_m es la desviación estándar de la columna.

- *Suavizado*: existen filtros que permiten minimizar el ruido espectral mediante cálculos polinómicos de convolución (Savitzky-Golay) o por Transformada de Fourier
- *Derivadas*: la baja diferenciación que normalmente presentan los espectros MIR puede ser mejorada derivando los espectros, lo cual

permite aumentar las diferencias entre las bandas anchas y solapadas del espectro. La primera derivada elimina los desplazamientos de línea base, mientras que la segunda derivada elimina los términos que varían linealmente con la longitud de onda.

- *Variable normal estándar (SNV, Standard Normal Variable)*: se utiliza principalmente para corregir el efecto de dispersión (scattering) producido por ejemplo, por las diferencias en el tamaño de partícula de muestras sólidas.

$$x_{i,m}^{SNV} = \frac{x_{i,m} - \bar{x}_i}{s_i} \quad (4.1.3)$$

Donde $x_{i,m}^{SNV}$ es el valor de la absorbancia de la fila i (o espectro i) y la columna m (o la variable m) una vez aplicado el pretratamiento, $x_{i,m}$ es el valor de la absorbancia original de la fila i (espectro i) y la columna m (variable m), \bar{x}_i es la absorbancia media del espectro i y s_i es la desviación estándar de la fila i (espectro i).

- *Corrección del efecto multiplicativo de dispersión (MSC, Multiplicative Scattering Correction)*: tiene la misma utilidad que el SNV; sin embargo, el pretratamiento espectral depende del conjunto de muestras al que se aplica.
- *Corrección de la señal ortogonal (OSC, Orthogonal Signal Correction)*: permite eliminar toda aquella información contenida en los espectros que no está correlacionada con la propiedad a determinar. Su aplicación permite obtener modelos de calibración más simples.

5. Construcción del modelo quimiométrico.

El cálculo del modelo quimiométrico seleccionado (cualitativo o cuantitativo) se realiza con un conjunto de muestras llamadas de calibración. Durante el desarrollo del modelo se evalúan distintos parámetros implicados en el

cálculo (pretratamiento, intervalo espectral, umbral de identificación, número de factores, errores de calibración, entre otros). [16]

6. Evaluación del modelo quimiométrico.

La evaluación del modelo se lleva a cabo mediante la aplicación de éste a un conjunto de muestras conocidas (para modelos cualitativos se conoce su identidad y para cuantitativos se conoce el valor de la propiedad a determinar). Este nuevo conjunto de muestras debe ser independiente al anterior. Si los resultados de predicción no son satisfactorios, el modelo debe ser recalculado. [16, 17, 19]

4.2. Diseño de experimentos.

El objetivo clásico del diseño de experimentos (DoE, Design of Experiments) es la obtención de modelos estadísticos para evaluar si determinados factores influyen en la variable de interés. El diseño de experimentos se usa por ejemplo para la optimización.

4.3. Análisis cualitativo.

Los métodos de reconocimiento de pautas (PRM, Pattern Recognition Methods) son un conjunto de técnicas quimiométricas que permiten realizar análisis cualitativos de un modo rápido y simple. [16, 17, 19]

4.3.1. Análisis en componentes principales (PCA).

No existe unanimidad en considerar el PCA como un método de clasificación, por el hecho de que no establece fronteras entre las diferentes clases ni aplica ningún criterio estadístico que permita discernir las clases. No obstante, es una técnica de reducción de variables que permite visualizar en un espacio de 2 ó 3 dimensiones, cuan similares o diferentes son un grupo de muestras entre sí.

La interpretación de los resultados obtenidos con el PCA para una clasificación es puramente subjetiva y se lleva a cabo a partir de la representación de los scores de las muestras de un componente principal frente a los scores de otro(s) componente(s). Si existe una relación entre las muestras, en el gráfico de los scores, los puntos aparecerán agrupados; mientras que si las muestras no se asemejan entre sí, los puntos aparecerán dispersos entre sí. [16, 17, 19]

4.3.2. Análisis de agrupamientos (clusters).

Bajo el nombre de análisis de agrupamientos se engloban las técnicas de análisis de datos cuya finalidad es descubrir los agrupamientos naturales existentes en una tabla de datos experimentales. Este tipo de análisis constituye el nivel cero de los PRM's y dado su carácter no supervisado es difícil evaluar su rendimiento. Por el contrario, el análisis por agrupamientos es muy eficaz en la investigación científica por la capacidad de generar hipótesis de trabajo. Desde este punto de vista conviene recordar que un algoritmo es inmune a los prejuicios del investigador que examina los datos experimentales y es capaz de manejar las tablas ingentes de datos que genera la actual instrumentación química.

4.4. Análisis cuantitativo.

El proceso de calibración permite establecer la relación entre la respuesta instrumental y la propiedad a determinar, utilizando a tal efecto un conjunto de muestras representativas. La espectroscopia MIR proporciona un gran número de variables respuesta para cada muestra, variables que en general no pueden ser asignadas a un sólo analito. Esto ha propiciado el desarrollo de métodos de calibración capaces de relacionar múltiples variables con la propiedad a determinar. Estos métodos son conocidos como Métodos de Calibración Multivariantes. En la Figura 4.4.1 se muestra una clasificación general de los mismos.

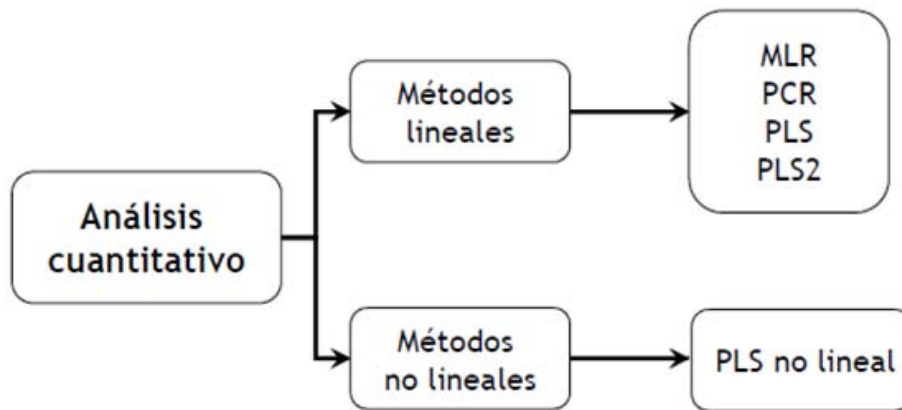


FIGURA 4.4.1 Clasificación general de los métodos de calibración multivariables.

4.4.1. Regresión lineal múltiple (MLR).

Es un método de análisis cuantitativo que requiere de una selección previa de las variables significativas a partir de las cuales se construye la ecuación de regresión. La regresión lineal múltiple (MLR, Multiple Linear Regression) establece una relación lineal entre la señal (longitudes de onda discretas) y la propiedad a determinar mediante un ajuste de mínimos cuadrados. [16, 17, 19]

En dicha regresión se asume una relación entre la absorbancia y la concentración que es inversa a la ley de Lambert-Beer. La concentración a determinar es función de la absorbancia a cada longitud de onda; la concentración se calcula multiplicando los valores de absorbancia por unos coeficientes de proporcionalidad obtenidos durante la etapa de calibrado.

El desarrollo de modelos MLR requiere una adecuada selección de las longitudes de onda que son utilizadas para su cálculo. Dicha tarea es compleja ya que en muchas ocasiones la variación de la concentración a determinar, no puede ser asignada a unas longitudes de onda discretas y es por ello que su uso en espectroscopia MIR es reducido. Además, la selección de un excesivo número de longitudes de onda puede acarrear problemas de colinealidad, al existir diferentes

variables independientes altamente correlacionadas que aportan la misma información.

4.4.2. Regresión en componentes principales (PCR).

Es un método cuantitativo en el cual previamente se ha realizado una reducción de variables basándose en un PCA. De este modo, se consigue condensar la información inicial en un número de variables inferior al original. Este método es un caso particular de la regresión lineal múltiple (MLR) en el cual se utilizan los scores obtenidos de un PCA como variables independientes. [16]

4.4.3. Regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS).

La información espectroscópica puede correlacionarse con magnitudes físicas o químicas, obteniéndose ecuaciones o modelos de calibración. El fundamento de cualquier calibración es establecer una relación entre la señal instrumental y la propiedad a determinar, y posteriormente predecir esta propiedad a partir de la señal medida en una muestra desconocida. Es posible utilizar calibraciones univariadas cuando la señal es selectiva a la propiedad estudiada. Sin embargo, en espectroscopia MIR no siempre es posible y hay que recurrir a calibraciones multivariadas. [17]

El método de regresión PLS (Partial Least Squares) se basa también en una reducción de variables. Sin embargo, a diferencia del PCR, la descomposición de la matriz espectral se realiza simultáneamente con la matriz de la propiedad a determinar descomponiéndose según:

$$X = TP^T + E \quad (4.4.3.1)$$

$$Y = UQ^T + F \quad (4.4.3.2)$$

Donde X es la matriz de datos espectrales e Y la matriz de la propiedad a determinar, T y U son las matrices de scores, P y Q las matrices de loadings y E y F las matrices de residuales.

La descomposición de ambas matrices no es independiente, sino que se realiza de forma simultánea, estableciéndose una relación interna entre los scores de los bloques X e Y:

$$U = bT \quad (4.4.3.3)$$

Donde b es el coeficiente de regresión para cada uno de los factores del modelo.

El cálculo del valor Y de una muestra desconocida se realiza utilizando la relación interna:

$$Y = T^* \hat{B} Q^T + F \quad (4.4.3.4)$$

Donde T^* es la matriz de scores de la muestra analizada obtenida del modelo calculado, \hat{B} es el coeficiente de regresión de cada factor, Q^T la matriz de loadings del modelo y F el residual de la predicción.

4.4.4. Elección del número de componentes principales.

El desarrollo de cualquier modelo de calibración necesita de algún sistema que, aparte de saber si una calibración proporciona una capacidad predictiva apropiada, permita evaluar la conveniencia de utilizar más o menos componentes principales en una determinada calibración.

La metodología más utilizada para construir el modelo de calibración es la validación cruzada (*Cross validation*). Ésta utiliza muestras del bloque de calibración para comprobar el modelo. Mediante este método el conjunto de muestras se divide en varios segmentos. El modelo se construye tantas veces como número de segmentos se ha elegido, utilizando un segmento como bloque

de datos para comprobar los resultados y el resto para construir el modelo, de forma que cada vez se deja un segmento fuera. Esto se realiza para cada factor, calculando el MSECv para cada segmento y acumulándolo de forma que se consiga una buena estimación del poder predictivo de las muestras de calibrado. Cuando el número de segmentos es igual al número de muestras de calibrado, es decir, cuando cada segmento tiene una sola muestra. A este procedimiento se le suele llamar leave-one-out.

$$\text{MSECv} = \frac{\sum_{i=1}^{I_c} (\hat{y}_i - y_i^{\text{REF}})^2}{m_c} \quad (4.4.4.1)$$

Donde m_c es el número de muestras de calibración, \hat{y}_i es el valor calculado por el modelo e y_i^{REF} el valor de referencia.

Cuanto mayor sea el número de factores, el porcentaje de información incluida en el modelo es mayor y los errores de calibración disminuyen, sin embargo la complejidad del modelo aumenta. Es por ello, que se debe llegar a una solución de compromiso tratando de obtener el modelo más simple con la mejor capacidad predictiva. Uno de los criterios establecidos para esta selección es la elección del número de factores que suministre el menor error de predicción. La determinación del número de componentes en esta tesis se llevó a cabo utilizando como criterios de decisión el análisis de la ganancia en varianza explicada al añadir un nuevo componente al modelo y a través de la comparación de la representación gráfica del RMSE, error cuadrático medio (Root Mean Square Error), (Ecuación 4.4.4.2) o bien el RSE (Relative Standard Error) (Ecuación 4.4.4.3) frente al número de componentes tanto para calibración (RMSEC o RSEC), como para validación (RMSEP o RSEP). El RMSEC o el RSEC disminuye paulatinamente al aumentar el número de componentes, en cambio, el RMSEP o RSEP presenta un mínimo o bien una disminución relativa significativamente menor a partir del número óptimo de componentes.

$$\text{RMSE} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^m (y_i^{\text{NIR}} - y_i^{\text{REF}})^2}{m}} \quad (4.4.4.2)$$

Siendo m el número de muestras, Y^{REF} los valores de referencia e Y^{NIR} los valores predichos por el modelo. El RMSE puede ser considerado como el error medio obtenido en el proceso de modelado y está expresado en las mismas unidades que los datos de referencia.

$$\text{RSE} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^m (Y_i^{\text{NIR}} - Y_i^{\text{REF}})^2}{\sum_{i=1}^m Y_i^{\text{REF}^2}}} \times 100 \quad (4.4.4.3)$$

Donde Y^{REF} son los valores de referencia e Y^{NIR} son los valores predichos por el modelo.

5. Desarrollo experimental

5.1. Material y reactivos

5.1.1. Equipo

Se utilizó un Espectrofotómetro Frontier FT-IR MIR Perkin Elmer, con ATR de diamante en un intervalo de 400 a 4,000 cm^{-1} . La Figura 7.1.1.1 muestra el equipo.



FIGURA 5.1.1.1 Espectrofotómetro Frontier FT-IR MIR Perkin Elmer

En la Figura 5.1.1.2 se observa el ATR con la cantidad de muestra a analizar:



FIGURA 5.1.1.2 ATR de diamante y una pequeña gota de muestra

5.1.2. Reactivos

En las siguientes tablas se indican las características de los compuestos utilizados para el desarrollo experimental.

TABLA 5.1.2.1. Características del compuesto utilizado para la solución etanol-agua

Compuesto	Fórmula	Pureza	Peso molecular	Densidad g/mL	Punto ebullición	Marca
Etanol absoluto	C ₂ H ₅ OH	99.6	46.07	0.790	78.3°C	J.T.Baker

TABLA 5.1.2.2. Características del compuesto utilizado para la preparación de los estándares

Compuesto	Fórmula	Pureza	Peso molecular	Densidad g/mL	Punto ebullición	Marca
Acetato de etilo	C ₄ H ₈ O ₂	99.7	88.1	0.900	77.0 °C	Riedel-de Haen
Metanol	CH ₃ OH	99.9	32.04	0.791	64.7 °C	J.T.Baker
n-propanol	C ₃ H ₈ O	99.8	60.09	0.8	97.0 °C	Fluka
3-metil-1-butanol	C ₅ H ₁₂ O	98.0	88.15	0.809	121-132 °C	Sigma-Aldrich
2-metil-1-propanol	C ₄ H ₁₀ O	99.5	74.12	0.801	107-108 °C	Fluka

5.1.3. Material

- Matraz volumétrico: 25 mL, 100 mL, 2 L
- Micro pipeta de 5-25 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL, 1-5 mL
- Vaso de precipitado de 5 mL, 100 mL
- Probeta 1 L
- Agua destilada
- Envases de plástico
- Puntas para micro pipeta

5.1.4. Tequilas analizados

Los tequilas analizados fueron los siguientes:

TABLA 5.1.4 Tequilas analizados

Nombre	Clase
Coa de Azul	AÑEJO
Don Agustín	AÑEJO
Campo Azul	AÑEJO
Herradura	AÑEJO
Sauza 3 Generaciones	AÑEJO
100 Años	BLANCO
Jimador	BLANCO
Amo	BLANCO
Orendain	BLANCO
Viuda de Romero	BLANCO
Herradura	BLANCO
Puerto Vallarta	BLANCO
Casco Viejo	BLANCO
Alamo	BLANCO
Corralejo	REPOSADO
Sauza Hornitos	REPOSADO
José Cuervo	REPOSADO
Don Ramón	REPOSADO
100 Años	REPOSADO
Olmecca Supremo	REPOSADO
1800	REPOSADO
Herradura	REPOSADO
Cabrero	REPOSADO
Sierra	REPOSADO

En la figura 5.1.4 se muestran algunos tequilas analizados



Figura 5.1.4 Algunos tequilas analizados

5.2. Procedimiento experimental

5.2.1. Preparación de solución etanol-agua

Se prepararon 4 L de una solución al 38% de etanol: agua. En un matraz volumétrico de 2 L, se midieron 760 mL de etanol con una probeta de 1 L, posteriormente se agregaron 1240 mL de agua destilada. Se trasvasaron a un garrafón de plástico previamente enjuagado y secado con un poco de solución para evitar contaminaciones, con el fin de poder mezclar para completar los 4 L deseados para la preparación de los sistemas y el enjuague de la celda.

5.2.2. Preparación de soluciones madre

Se prepararon soluciones madre de los siguientes estándares como se muestra en la tabla 7.2.2.1 aforando con la solución de etanol-agua.

TABLA 5.2.2.1 Soluciones madre de los estándares

Reactivo	mL del reactivo	Volumen de aforo mL	Concentración real mg/ L
Metanol	1	25	31,636.84
Acetato de Etilo	0.3	100	2,691.90
N-propanol	1	25	31,936.00
2-metil-1-propanol	1	25	31,879.80
3-metil-1-butanol	1	25	31,874.60

5.2.3. Preparación de estándares

Se realizaron estándares a partir de las soluciones madre como se muestra en la tabla 5.2.3. Localizada en el anexo. Para tal efecto se tomaron en cuenta los intervalos de concentración permitidos por la NOM-006-SCFI-2012.

Tabla 5.2.3 Intervalos de concentración de compuestos permitidos por la Norma

Compuesto	Concentración Mínima (mg/L)	Concentración Máximo (mg/L)
Acetato de etilo	5.11	815.65
3-metil-1-butanol	60.56	2039.97
Metanol	101.24	1186.38
2-metil-1-propanol	60.57	2040.31
N-propanol	60.68	2043.90

5.2.4. Preparación de los sistemas

Se realizaron soluciones muestra a partir de soluciones madre como se muestra en la tabla 5.2.4.

TABLA 5.2.4 Preparación de los sistemas con sus concentraciones reales

Sistema	µL tomados de la solución madre					Concentraciones reales (mg/ L)				
	Metanol	Acetato de etilo	N-propanol	2-metil-1-propanol	3-metil-1-butanol	Metanol	Acetato de etilo	N-propanol	2-metil-1-propanol	3-metil-1-butanol
1	183	355	88	88	88	578.95	95.56	281.04	280.54	280.50
2	70	685	157	157	157	221.45	184.40	501.40	500.51	500.43
3	335	2360	500	500	500	1059.83	635.29	1596.80	1593.99	1593.73
4	260	1360	295	295	295	822.56	366.10	942.11	940.45	940.30
5	107	1690	365	365	365	338.51	454.93	1165.66	1163.61	1163.42
6	220	2020	430	435	435	696.01	543.76	1373.25	1386.77	1386.55
7	145	2690	570	570	570	458.73	724.12	1820.35	1817.15	1816.85
8	375	3030	640	640	640	1186.38	815.65	2043.90	2040.31	2039.97
9	295	1020	157	295	640	933.29	274.57	501.40	940.45	2039.97

5.2.5. Medición de espectros

Se midieron los tequilas y sistemas en un espectrofotómetro Frontier FT-IR MIR Perkin Elmer, con el software Perkin Elmer Spectrum, de 4000 a 400 nm, con 16 barridos, realizando un fondo entre cada muestra.

El procedimiento fue el siguiente:

- 1.- Encender el equipo
- 2.- Encender la computadora
- 3.- Limpiar el ATR con solución de Etanol-Agua
- 4.- Secar la solución Etanol-Agua con un pañuelo desechable
- 5.- Limpiar el ATR con papel óptico
- 6.- Hacer un fondo
- 7.- Colocar la solución estándar preparada
- 8.- Hacer un barrido para obtener su espectro
- 9.- Limpiar la solución anterior con un papel desechable
- 10.- Repetir los pasos 3 al 9

5.2.6. Software

- PerkinElmer Spectrum
- Spectrum Quant+

5.3. Pretratamiento de espectros

Previamente a la optimización de los modelos de PLS para la cuantificación de los analitos de tequilas, se realizaron las operaciones siguientes: corrección ATR, corrección línea base, corrección a cero.

5.4. Construcción de los modelos óptimos

Esta parte es la más laboriosa debido a todas las variables que se consideran.

Para lograr la obtención de los modelos óptimos se fueron variando diferentes pre-tratamientos espectrales inherentes al programa Spectrum Quant+, a saber:

- Intervalos de número de onda del blanco.
- Intervalos del número de onda del espectro.
- Tipo de escalado: media y autoescalado.
- Normalización: ninguna, *pathlength*, MSC y SNV.
- Corrección de línea base: ninguna, offset, primera y segunda derivada.
- Eliminación de anómalos.

Se aceptará que un modelo es óptimo cuando el error de calibrado (SEC) y predicción sean mínimos (SEP).

Una vez obtenidos los modelos de PLS óptimos, se analizaron soluciones preparadas independientes a fin de evaluar la capacidad predicción del modelo, para posteriormente realizar la cuantificación de tequilas. Estos resultados se compararon con las concentraciones obtenidas previamente por cromatografía de gases realizado en una tesis anterior, utilizando las mismas muestras de

tequila. [21]. Cabe hacer notar que esta comparación sólo tiene un carácter meramente semi-cuantitativo, ya que la determinación cromatográfica se llevó a cabo dos años antes del presente trabajo con lo cual las muestras de tequila pudieron modificar su composición, en especial, en compuestos volátiles.

5.5. interpretación de pruebas estadísticas.

5.5.1 Estándar de apalancamiento (*Standard Leverage*): indica los estándares con posible comportamiento anómalo. Éstos se encuentran ubicados en la parte superior de la línea de corte establecida por el programa. En la Figura 5.5.1 se pueden apreciar algunos datos anómalos.

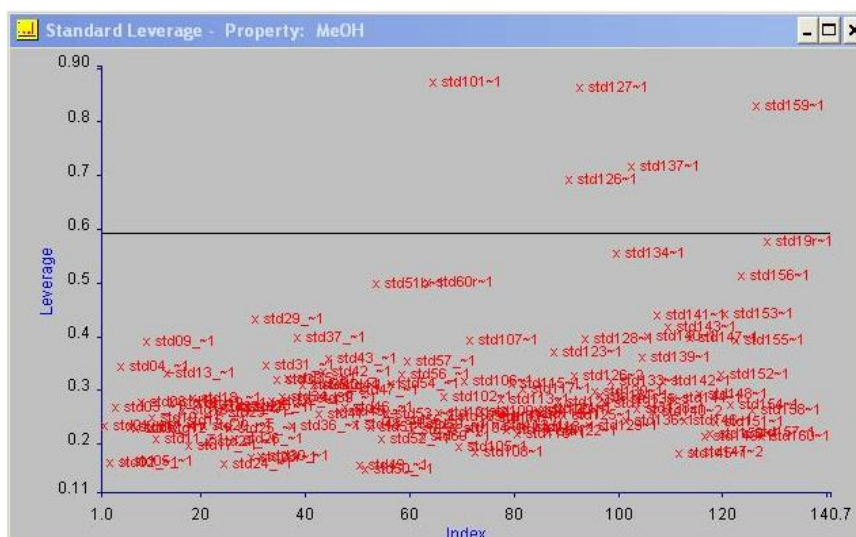


FIGURA 5.5.1 Estándar de apalancamiento (*Standard leverage*)

5.5.2 Puntuación vs puntuación (*score vs score*): muestra agrupaciones entre todos los datos. En el gráfico de la Figura 5.5.2, se percibe una sola agrupación y no varias; lo cual se indica la similitud que existe entre cada estándar.

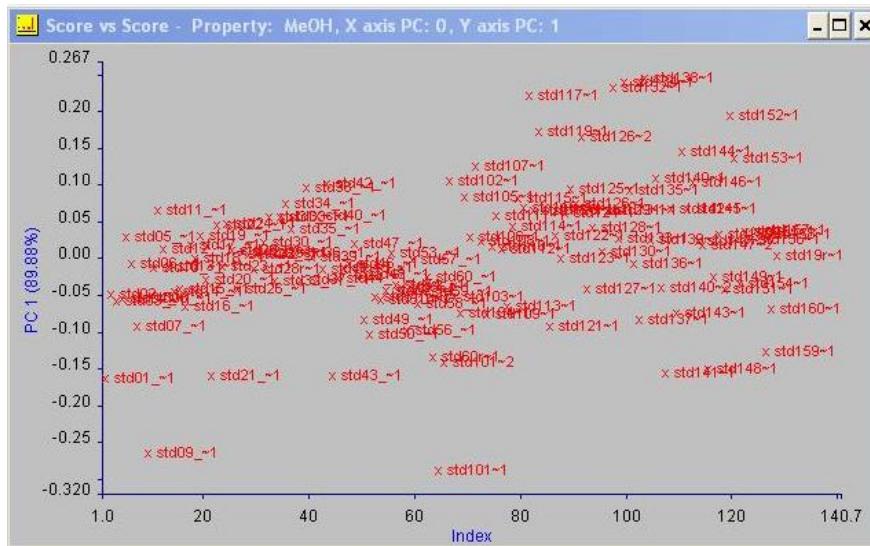


FIGURA 5.5.2 Puntuación vs puntuación (Score vs Score)

5.5.3 Error estándar de predicción (SEP): especifica el error estándar de predicción en función del número de componentes principales para la calibración del modelo. En la Figura 5.5.3 se observa que el SEP disminuye a medida que el número de componentes aumenta. Sin embargo, este número no debe ser innecesariamente alto ya que podría originar sobreestimación del modelo lo que suele a su vez dar un error de predicción grande.

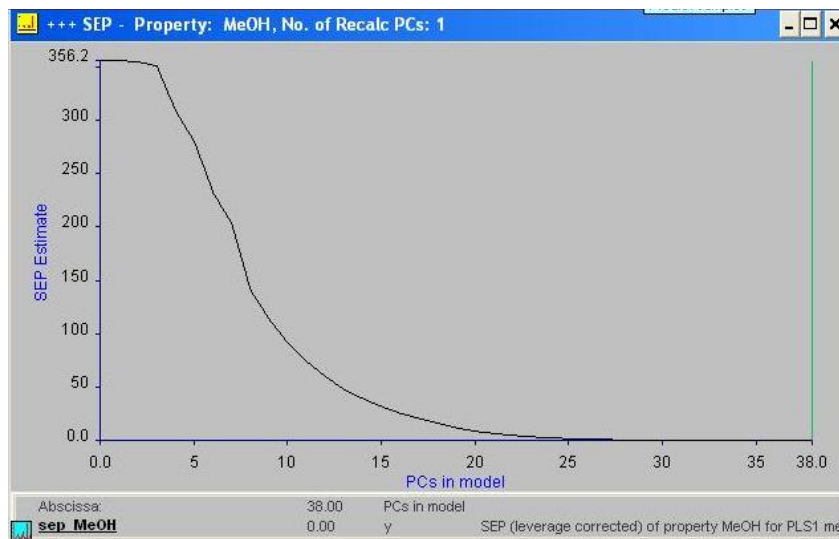


FIGURA 5.5.3 Error Estándar de predicción (SEP)

5.5.4 Factor vs Factor: indica las bandas significativas para la construcción del modelo. En la Figura 5.5.4.1 se observan las regiones con bandas con absorbancia negativa que no son muy importantes para el modelo.

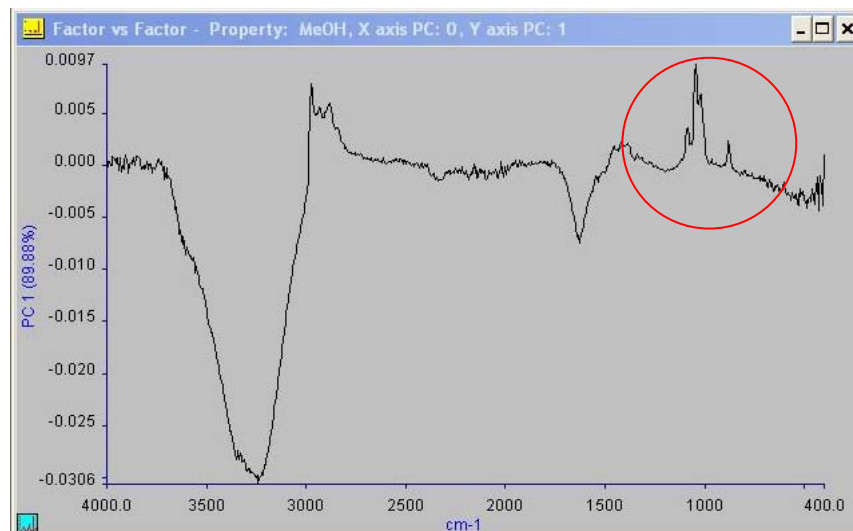


FIGURA 5.5.4.1 Factor vs factor

En la figura 5.5.4.2 se muestra la zona circulada en la Figura anterior, en forma ampliada. Cabe hacer notar que las señales son diferentes para cada analito.

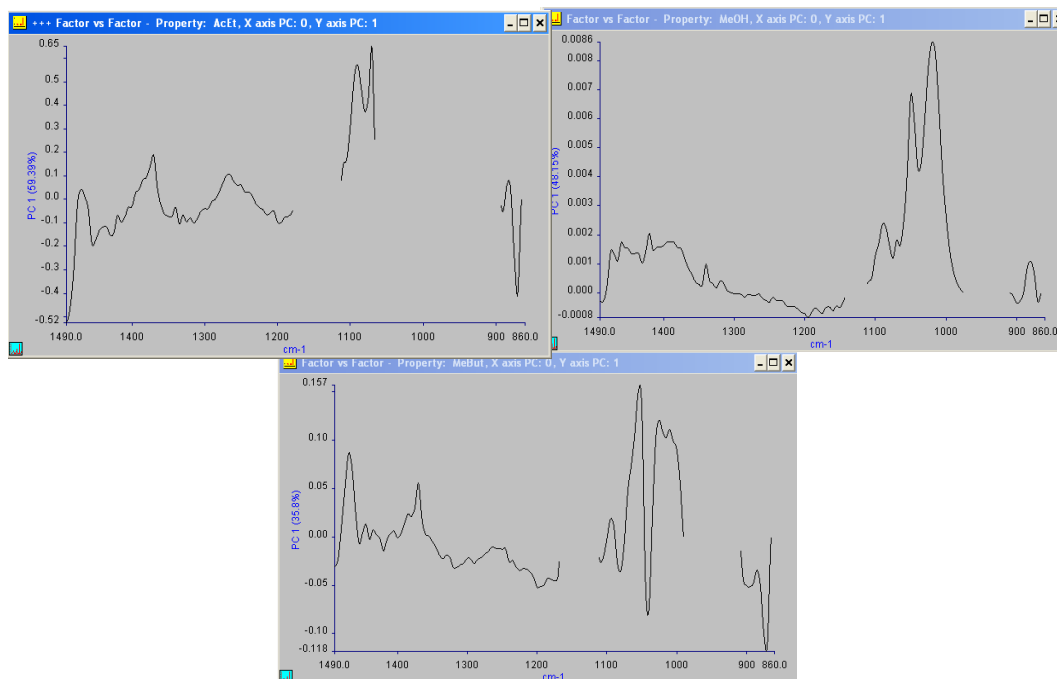


FIGURA 5.5.4.2 Intervalos ampliados de los espectros factor vs factor utilizados para cada analito

5.5.5 Estimado vs especificado (*Estimated vs Specified*): muestra la regresión lineal de concentración dada en relación a la concentración predicha por el programa. Para que sea un modelo aceptable los datos tienen que mostrar pendiente diferente de cero. En la Figura 5.5.5 se ve que no hay regresión alguna.

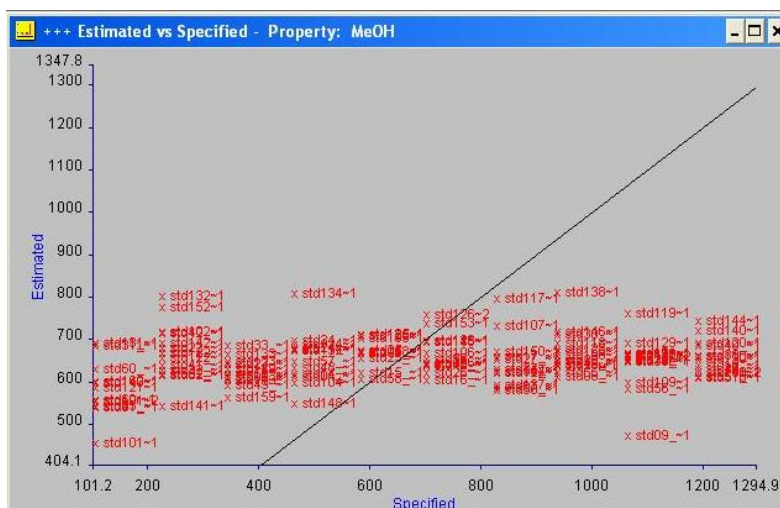


FIGURA 5.5.5 Valor estimado vs especificado (Estimated vs Specified)

5.5.6 Valores anómalos (*outliers*): indica los espectros que son mal comportados, estos son los que se encuentran en la parte superior de la línea horizontal y en la parte derecha de la línea de corte. En la Figura 5.5.6 se ven varios posibles anómalos.

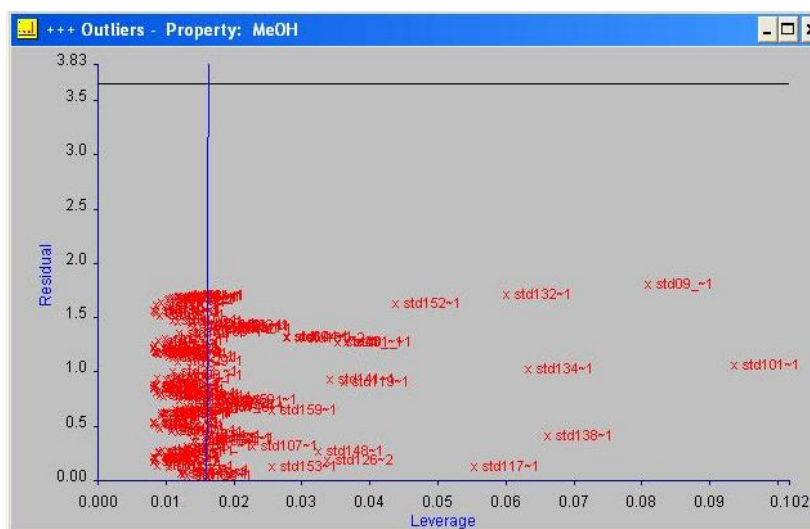


FIGURA 5.5.6 Anomalos (Outliers)

5.5.7 Residuales (*Residuals*): muestra la distribución de los residuales. Para que sea un modelo sea satisfactorio, los residuales deben tener una distribución aleatoria. En Figura 5.5.7 se observa que el modelo es inadecuado.

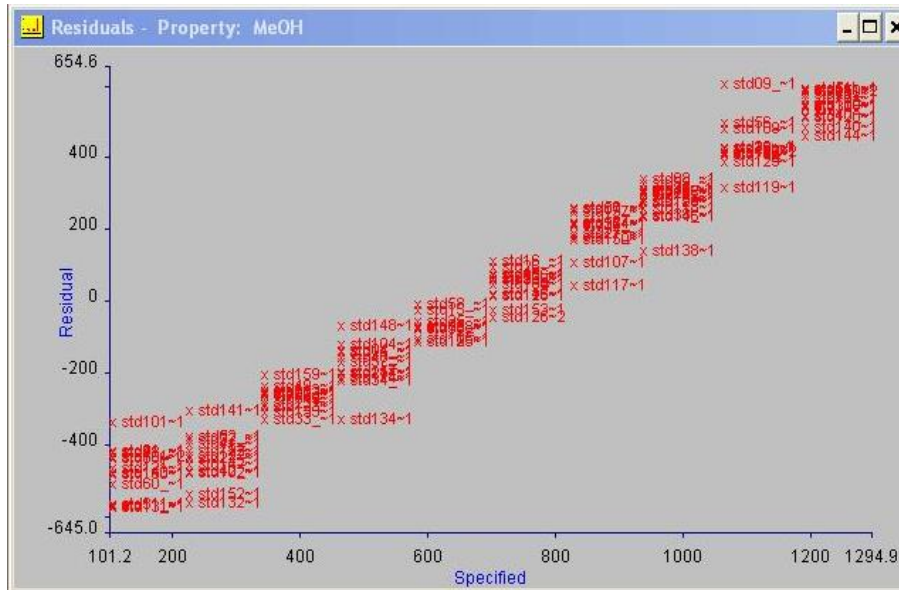


FIGURA 5.5.7 Residuales (*Residuals*)

5.5.8 Influencia (*Influence*): indica que los estándares superiores a un punto de corte pueden ser considerados como muy influyentes para el modelo. (Figura 5.5.8).

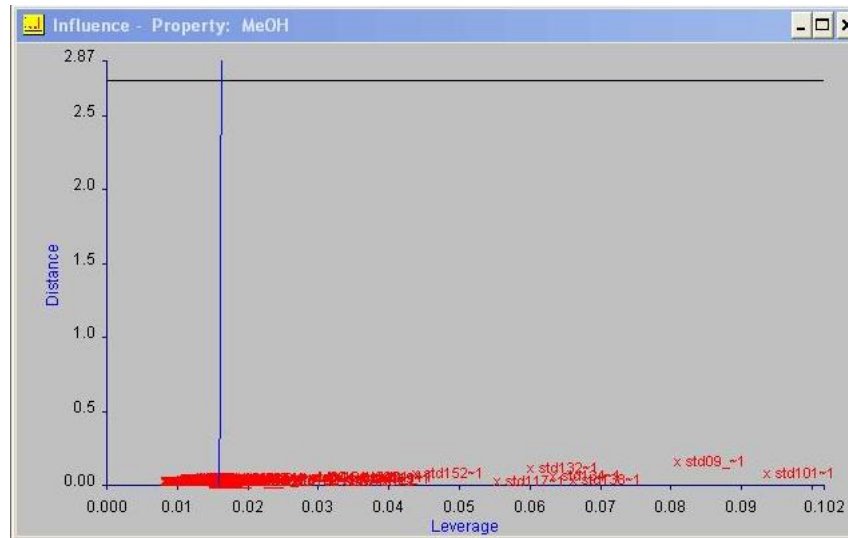


FIGURA 5.5.8 Influencia (*Influence*)

5.5.9 Espectro de Regresión (*Regression Spectrum*): muestra los coeficientes de regresión para la propiedad seleccionada (Figura 5.5.9).

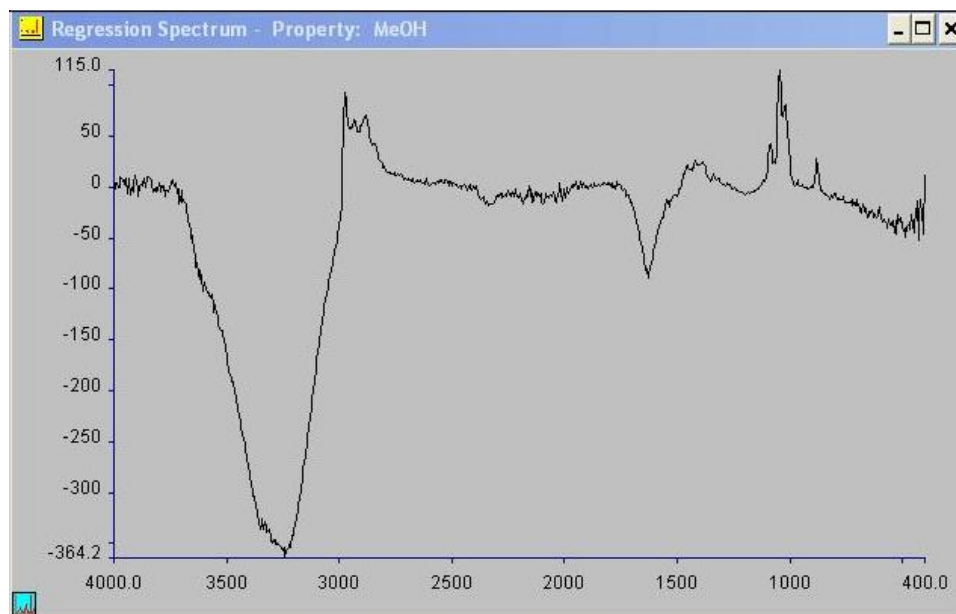


FIGURA 5.5.9 Espectro de Regresión (*Regression Spectrum*)

La información de cada uno de los gráficos anteriores, constituye un gran apoyo para ir construyendo los modelos y así llegar al modelo óptimo.

6. Resultados y análisis de resultados

6.1. Características espectrales

La Figura 6.1.1 exhibe los espectros de 120 sistemas en % Transmitancia obtenidos con una gota de muestra de los estándares, usando un ATR de diamante de una sola reflexión y sin pretratamiento alguno.

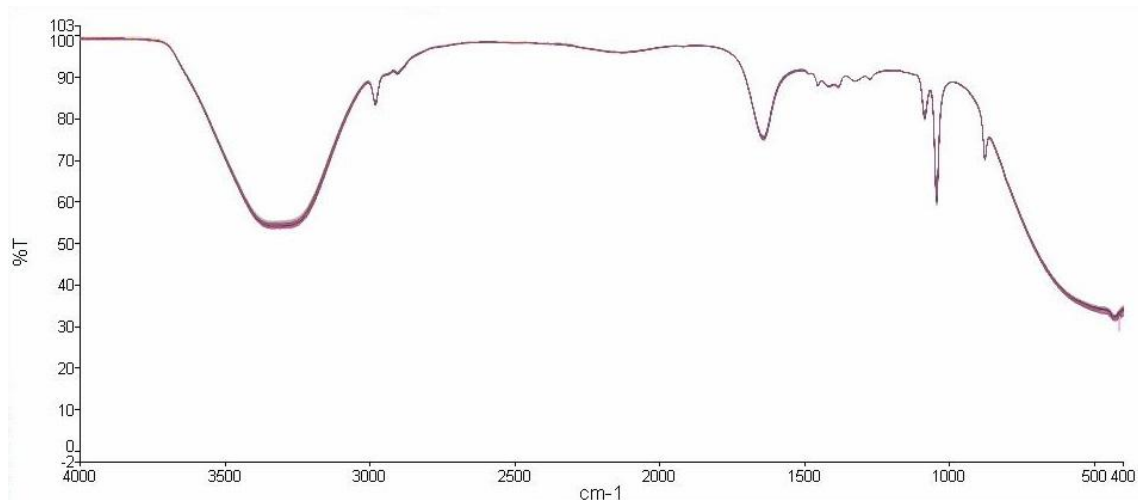


FIGURA 6.1.1 Espectros MIR de sistemas preparados sin tratamientos

La Figura 6.1.2 muestra el mismo conjunto de espectros, con el pretratamiento ya mencionado, llevado a cabo con el software Perkin Elmer Spectrum.

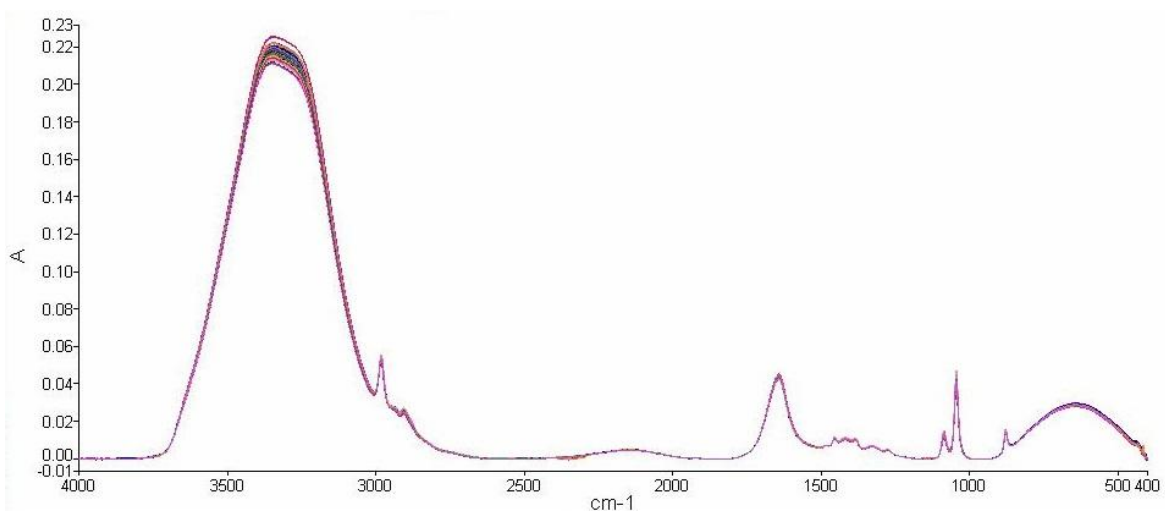


FIGURA 6.1.2 Espectros MIR de sistemas preparados con corrección ATR, corrección de línea base y corrección a cero

La Figura 6.1.3 muestra la comparación de un espectro de tequila y el estándar preparado de etanol agua (38:62). Como se observa ambos espectros se encuentran completamente traslapados, debido a similitud entre las matrices del tequila y el estándar.

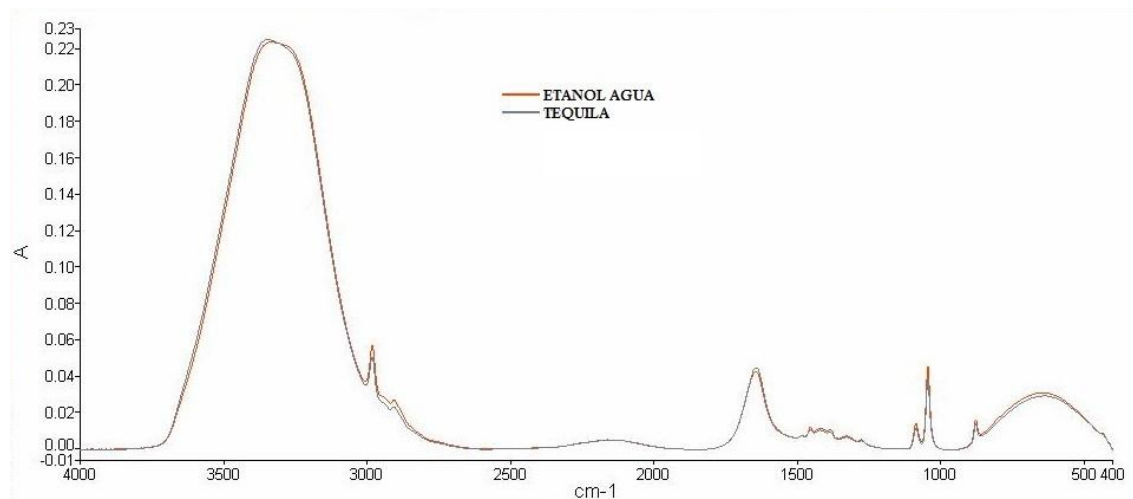


FIGURA 6.1.3 Espectros MIR de un tequila y de el estándar de etanol agua (38:62) con tratamiento

Cabe mencionar que al comparar las tres clases de tequilas y un estándar preparado (Figura 6.1.4), los espectros se traslapan completamente por lo que el modelo se puede utilizar para cualquiera de las tres clases de tequilas.

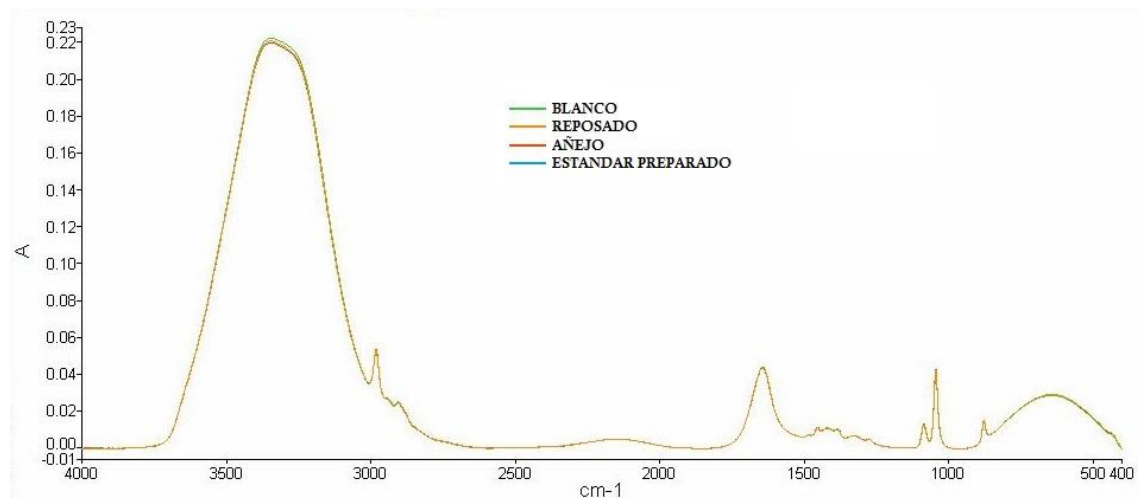


FIGURA 6.1.4 Espectros MIR de tequilas blanco, reposado, añejo y estándar preparado con corrección ATR, corrección de línea base y corrección a cero

6.2. Análisis de Mínimos Cuadrados Parciales a partir de datos de FT-MIR

6.2.1. Análisis de Mínimos Cuadrados Parciales (PLS) con el software QUANT+.

Debido a que los espectros MIR de los estándares preparados con las tres clases de tequilas son muy similares, se utiliza un método quimiométrico (PLS) con el software QUANT+.

Para construir un modelo se introducen los datos de cada uno de los espectros de los sistemas preparados, con las respectivas concentraciones como se muestra en la tabla 5.2.3 ubicada en el anexo

Los modelos fueron realizados por cada analito a cuantificar (metanol, acetato de etilo, n-propanol, 2-metil-1-propanol, 3-metil-1-butanol). Con el fin de obtener el mejor modelo, en cada caso, como ya se mencionó, se tomó en cuenta la información que sobre tratamientos espectrales del programa QUANT+ revisados en el apartado previo.

A continuación se muestran los mejores modelos para los analitos de acetato de etilo, metanol y 3-metil-1-butanol. Para los demás analitos, no fue posible obtener algo satisfactorio. Vale la pena hacer notar, que si bien la técnica MIR, es excelente para la construcción de modelos PLS, no es lo suficientemente sensible en comparación con otras técnicas.

6.2.2. Modelo óptimo para la cuantificación de Acetato de Etilo

Las características del mejor modelo para la cuantificación de acetato de etilo se muestran en la Tabla 6.2.2.1

TABLA 6.2.2.1 Características del modelo para la cuantificación de acetato de etilo

Calculation Parameters:			
Algorithm:	PLS1		
Range:	1490 to 860 cm ⁻¹		
Interval:	5 cm ⁻¹		
Analysis Type:	Absorbance		
Scaling (Spectra):	Mean		
Scaling (Property):	Mean		
Smooth:	Yes		
Smooth width:	5		
Baseline correction:	None		
Normalization:	SNV (without de-trending)		
Ordinate threshold:			
Upper threshold:	1.5 A		
Lower threshold:	None		
Number of factors:			
Minimum:	1		
Maximum:	100		
Blank regions:	1179.00 to 1113.00	1067.00 to 894.00	cm ⁻¹
	865.00 to 860.00	cm ⁻¹	

Al correr el programa con estas características, se obtiene un porcentaje de varianza de 75% con un error de estimación de 133.7 y un error de predicción de 137.9.

La Figura 6.2.2.1 muestra el gráfico de estándar de apalancamiento (Standar leverage). En este modelo no localizó ningún dato anómalo, lo que indica que los datos tienen buen comportamiento y que todos los datos aportan una información importante para la calibración del modelo.

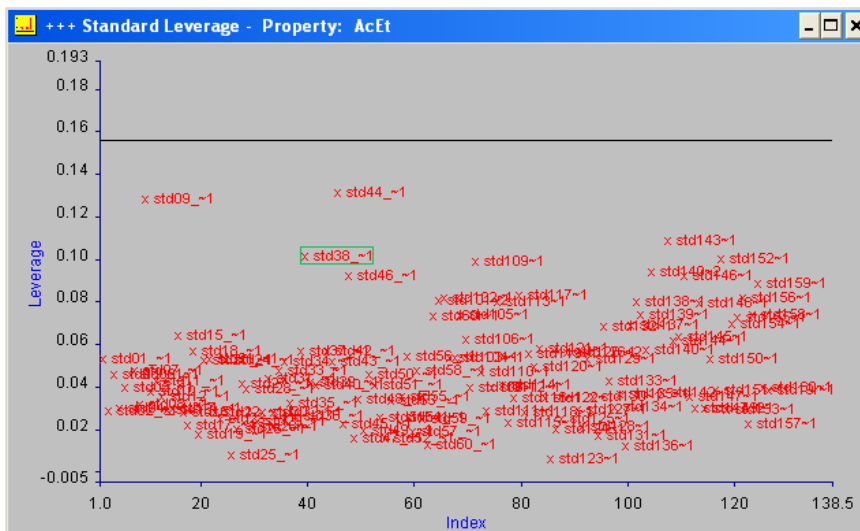


FIGURA 6.2.2.1. Estándar de apalancamiento para acetato de etilo

La Figura 6.2.2.2 presenta una sola agrupación y no grupos separados, con lo cual se corrobora la similitud entre cada estándar.

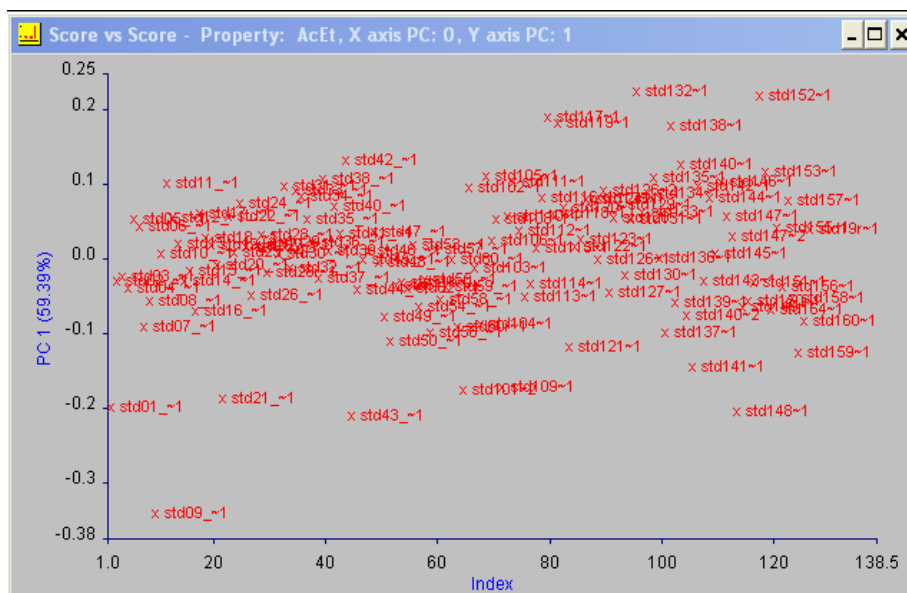


FIGURA 6.2.2.2 Puntuación vs puntuación para acetato de etilo

En la Figura 6.2.2.3 se observa un valor mínimo de componentes principales de 6 con un error de predicción de 137, lo cual indica un valor aceptable de componentes principales, ya que un valor mayor podría sobreestimar el modelo.

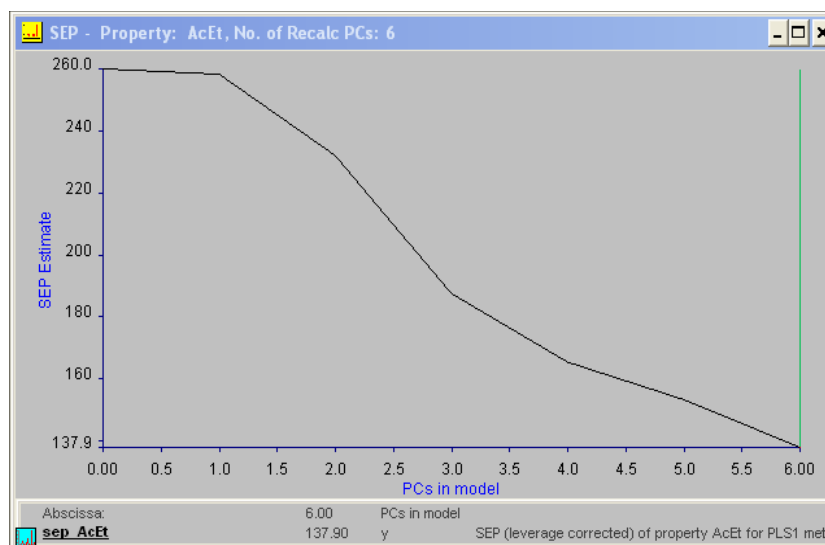


FIGURA 6.2.2.3 Error estándar de predicción para acetato de etilo

En la Figura 6.2.2.4 se observa una banda de 1113 a 1067, la cual es significativa en el modelo de acetato de etilo, ya que es donde se localiza la mayor variabilidad.

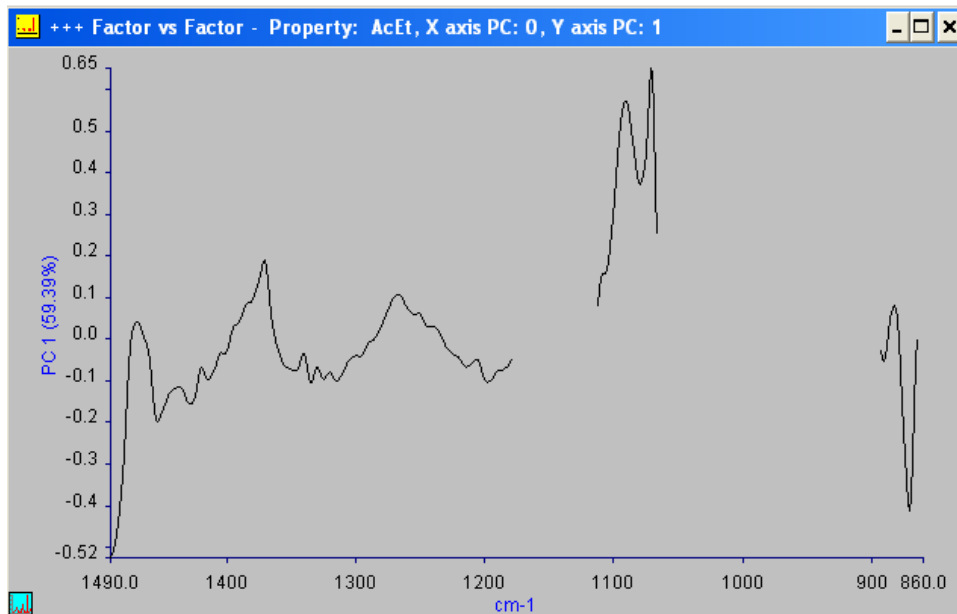


FIGURA 6.2.2.4 Factor vs factor para acetato de etilo

En la Figura 6.2.2.5 se advierte una pendiente distinta a cero, la cual indica que el valor dado y el predicho por el modelo son similares.

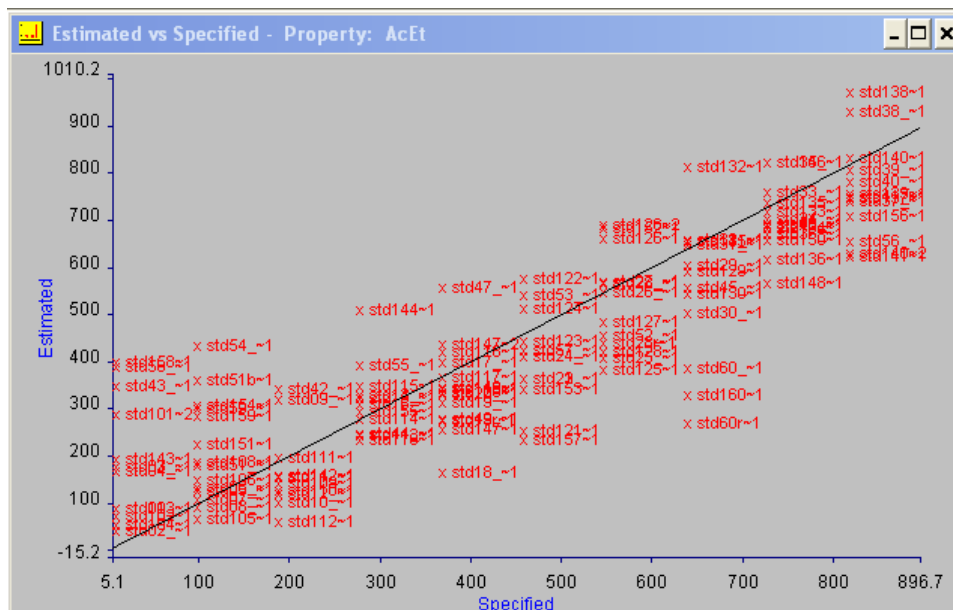


FIGURA 6.2.2.5 Valor estimado vs especificado de acetato de etilo

En la Figura 6.2.2.6 no se observan datos anómalos, por lo que se corrobora que se tiene un buen modelo.

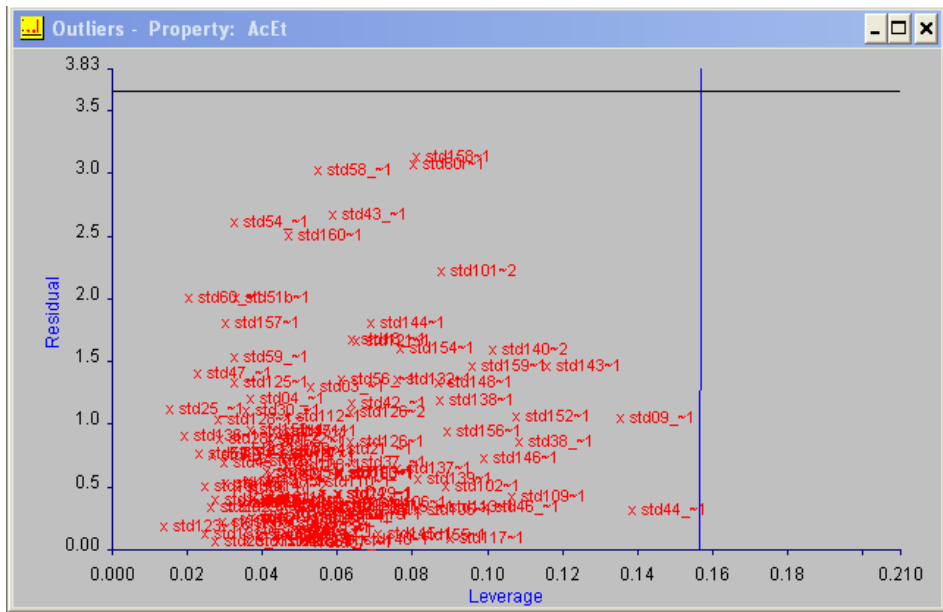


FIGURA 6.2.2.6 Anómalos para acetato de etilo

En a Figura 6.2.2.7 se observa una distribución aleatoria de los residuales. Esto indica un buen comportamiento de los sistemas preparados.

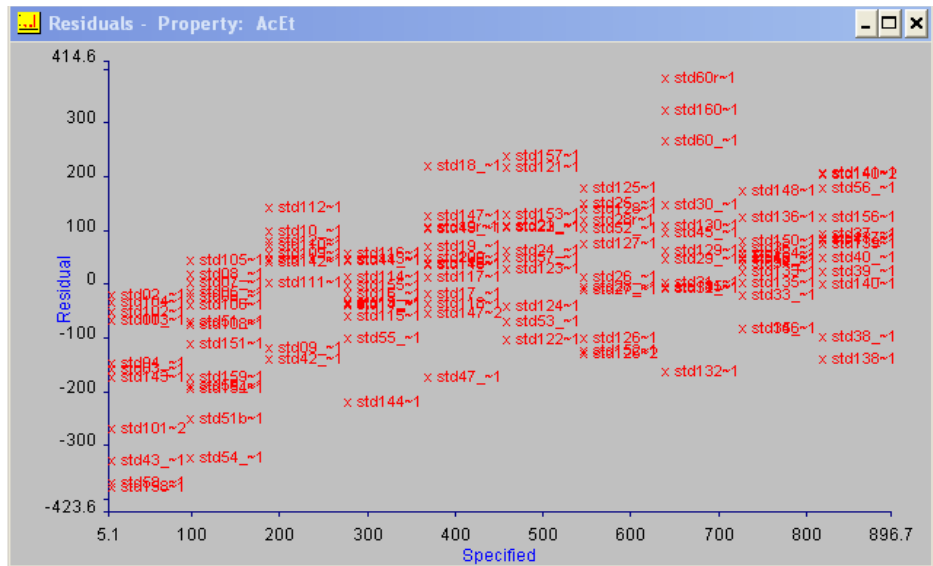


FIGURA 6.2.2.7 Residuales para acetato de etilo

La Figura 6.2.2.8 Indica que los estándares ubicados en la parte superior del punto de corte pueden ser considerados como no importantes para la regresión. Como en el gráfico sólo muestra datos en la parte inferior, lo que significa que estos datos son influyentes para el modelo.

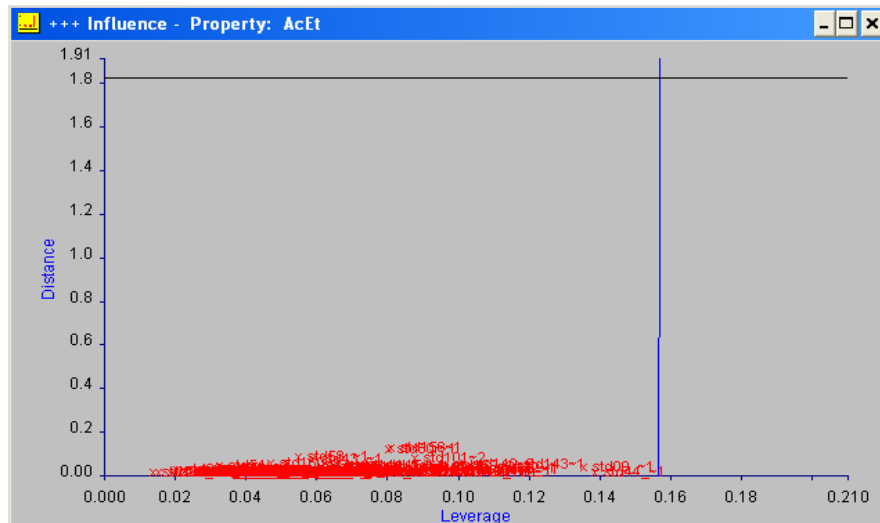


FIGURA 6.2.2.8 Influencia para acetato de etilo

La Figura 6.2.2.9 muestra los coeficientes de regresión para la propiedad seleccionada. El gráfico permite identificar las señales de los datos que contribuyen al modelo.

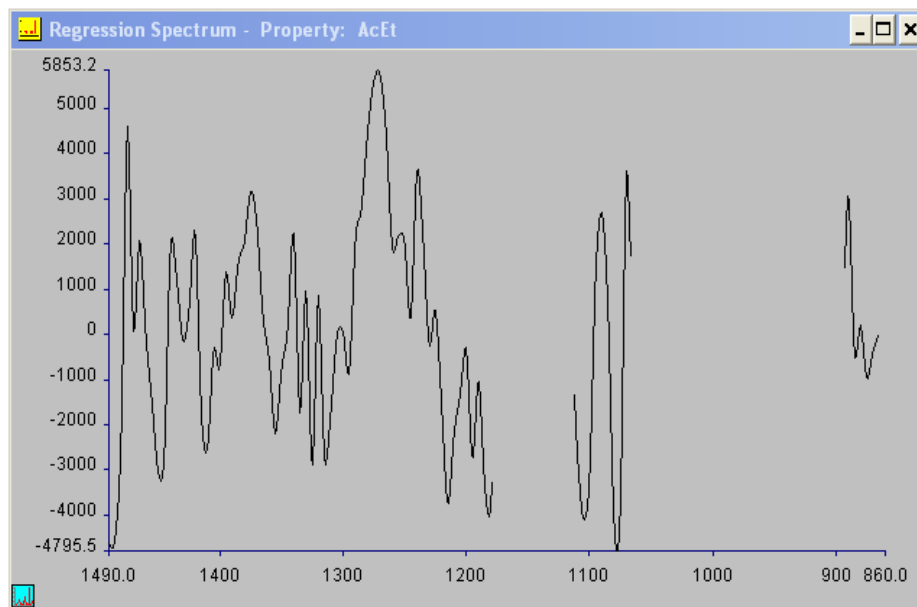


FIGURA 6.2.2.9 Espectro de regresión para acetato de etilo

A fin de evaluar el modelo PLS óptimo de acetato de etilo, se realizó la predicción de unos sistemas de prueba preparados en el laboratorio de concentración conocida. La Tabla 6.2.2.2 muestra esta predicción y su comparación con la concentración real.

Tabla 6.2.2.2 Predicción de sistemas de prueba por el modelo PLS

Muestra	Acetato de etilo prueba (mg/ L)	Acetato de etilo Predicha (mg/ L)	% error
1	95.56	149.75	56.70
2	184.40	115.73	37.24
3	635.29	593.94	6.51
4	366.10	315.26	13.89
5	454.93	447.08	1.73
6	543.76	677.53	24.60
7	724.12	659.89	8.87
8	815.65	815.59	0.01
9	274.57	312.65	13.87

La Tabla 6.2.2.3 muestra la comparación de las concentraciones de acetato de etilo en tequilas determinadas por cromatografía de gases y su comparación con las predichas por el modelo. Por lo que se ve es un buen modelo, ya que el porcentaje de error de la mayoría es menor al 30% y para ser un modelo realizado con un método secundario es muy aceptable errores menores del 30%

Tabla 6.2.2.3 Concentraciones de acetato de etilo en Tequilas obtenidas por el modelo PLS y su comparación de algunos por cromatografía de gases

Nombre Tequila	Clase	Acetato de etilo PLS (mg/ L)	Acetato de etilo CG* (mg/ L)	% error
Coa de Azul	AÑEJO	167.47	175.76	4.72
Don Agustín	AÑEJO	650.21		
Campo Azul	AÑEJO	292.74		
Herradura	AÑEJO	818.50		
Sauza 3 Generaciones	AÑEJO	289.66		
100 Años	BLANCO	159.79	161.57	1.10
Jimador	BLANCO	218.15	234.80	7.09
Amo	BLANCO	227.50	220.75	3.06
Orendain	BLANCO	251.40		
Viuda de Romero	BLANCO	229.57		
Herradura	BLANCO	282.05	265.82	6.11
Puerto Vallarta	BLANCO	142.25		
Casco Viejo	BLANCO	580.23		
Alamo	BLANCO	271.28	269.90	0.51
Corralejo	REPOSADO	120.83	100.68	20.01
Sauza Hornitos	REPOSADO	142.83	144.90	1.43
José Cuervo	REPOSADO	307.09		
Don Ramón	REPOSADO	473.84		
100 Años	REPOSADO	147.73	144.90	1.96
Olmecca Supremo	REPOSADO	103.81	98.64	5.24
1800	REPOSADO	175.11	147.28	18.90
Herradura	REPOSADO	432.08		
Cabrito	REPOSADO	184.58	199.15	7.32
Sierra	REPOSADO	139.79		

* No se cuentan con resultados de CG de todos los tequilas

En la Tabla 6.2.2.3 se puede constatar que las concentraciones de acetato de etilo predichas por el modelo PLS caen dentro de los intervalos de concentración esperados en los tequilas. Por otra parte, al comparar estas concentraciones con

las obtenidas por cromatografía de gases, vemos coincidencia, con un porcentaje de diferencia, en la mayoría de los casos, menor al 10 %.

6.2.3. Cuantificación de metanol.

La Tabla 6.2.3.1 muestra las características del modelo para la cuantificación de metanol en tequilas.

Tabla 6.2.3.1 Características del modelo para la cuantificación de Metanol

Calculation Parameters:			
Algorithm:	PLS1		
Range:	1490 to 860 cm ⁻¹		
Interval:	5 cm ⁻¹		
Analysis Type:	Absorbance		
Scaling (Spectra):	Mean		
Scaling (Property):	Mean		
Smooth:	Yes		
Smooth width:	5		
Baseline correction:	None		
Normalization:	None		
Ordinate threshold:			
Upper threshold:	1.5 Å		
Lower threshold:	None		
Number of factors:			
Minimum:	1		
Maximum:	100		
Blank regions:	1143.00 to 1112.00	975.00 to 910.00	cm ⁻¹
	865.00 to 860.00	cm ⁻¹	

Al correr el programa para la cuantificación de metanol en tequilas con las características anteriores, considerando 6 variables latentes se obtuvo un 92.47 % de varianza con un error de predicción de 103.6.

La Figura 6.2.3.1 muestra como en el caso anterior no se encuentran datos mal comportados ya que todos se encuentran en la parte inferior de la línea de corte.

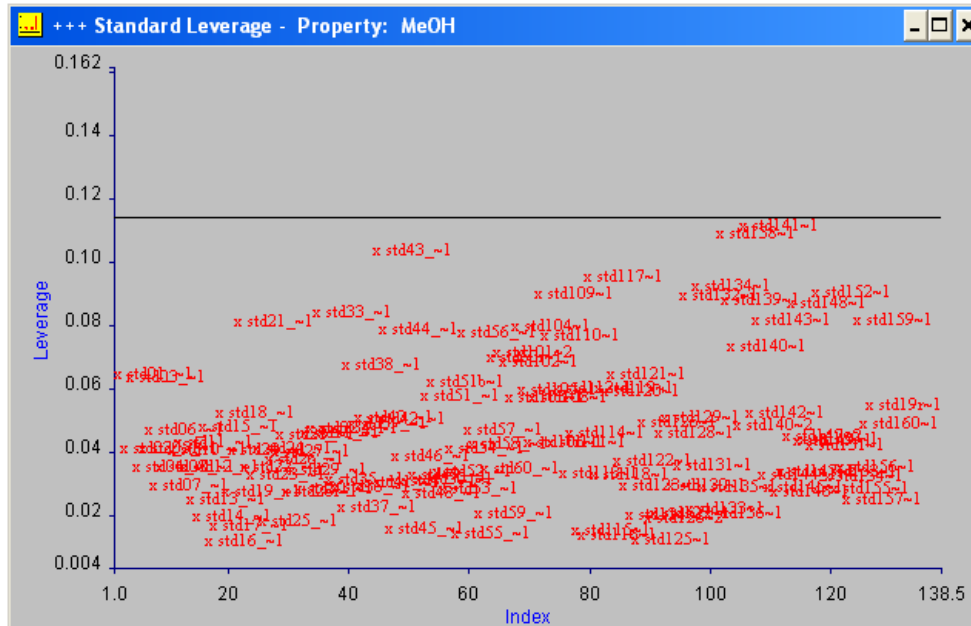


FIGURA 6.2.3.1 Estándar de apalancamiento para Metanol

La Figura 6.2.3.2 muestra una sola agrupación lo cual indica la similitud entre cada uno de los espectros_ por lo que el modelo es satisfactorio.

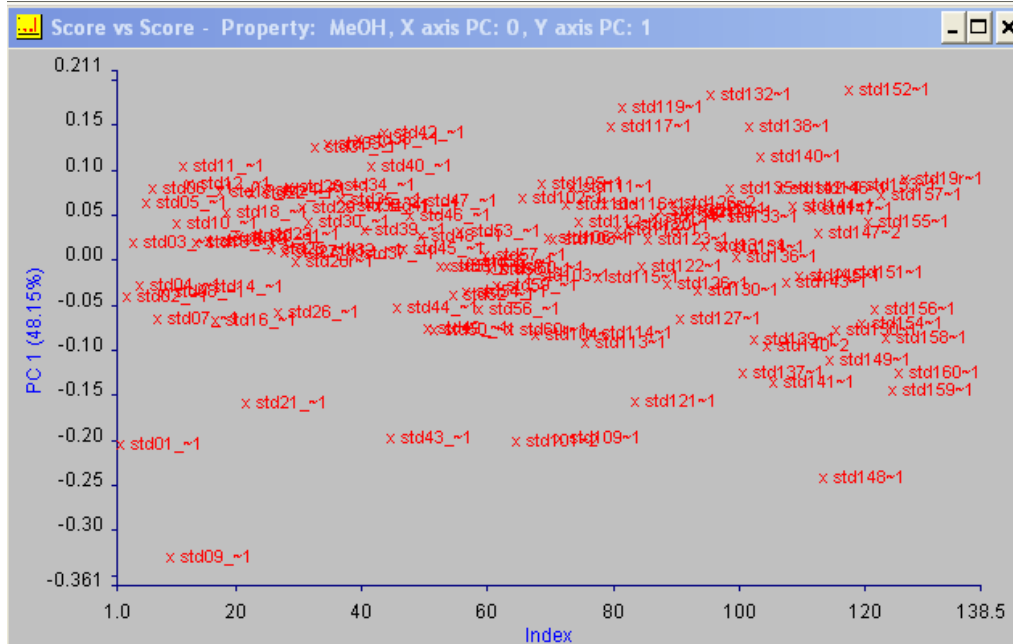


FIGURA 6.2.3.2 Puntuación vs puntuación para metanol

La Figura 6.2.3.3 muestra un número de variables latentes de 6 y un error de predicción de 103.6.

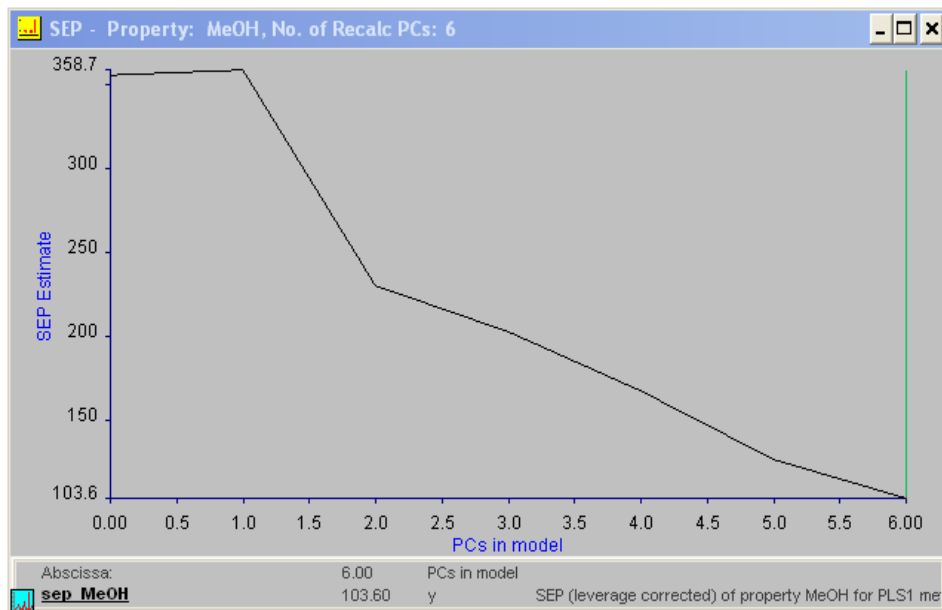


FIGURA 6.2.3.3 Error estándar de predicción para metanol

La Figura 6.2.3.4 indica el intervalo en el cual hay una mayor variabilidad para la construcción del modelo, la cual tiene un banda de 1034 a 975 cm^{-1} .

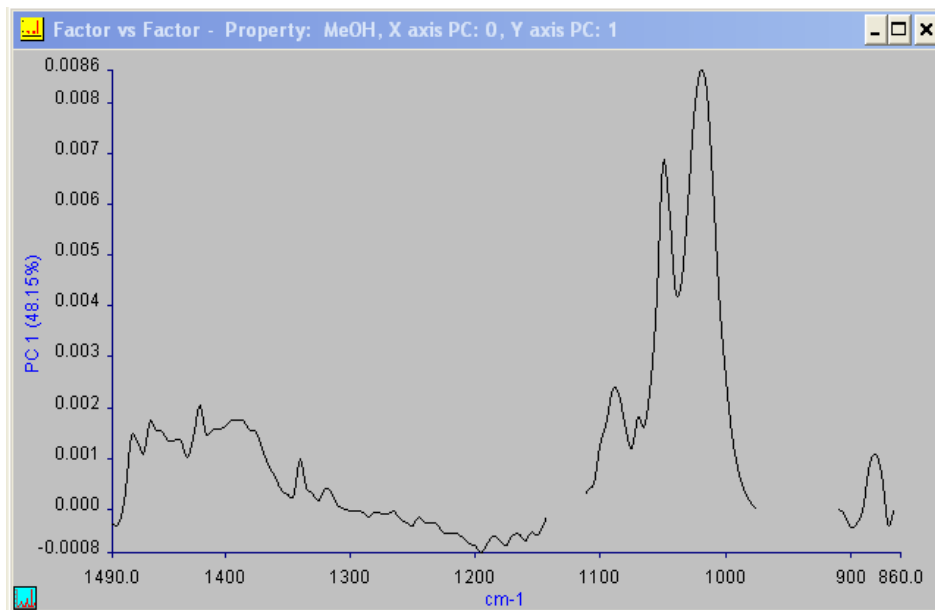


FIGURA 6.2.3.4 Factor vs factor para Metanol

La Figura 6.2.3.5 muestra la concentración especificada con la predicha. Lo cual indica una tendencia lineal.

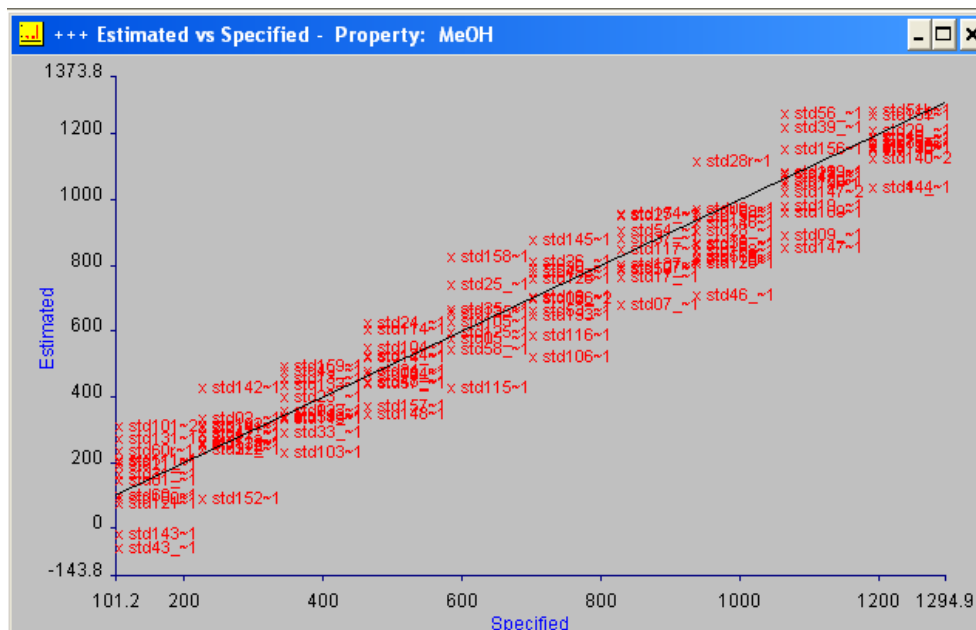


FIGURA 6.2.3.5 Valor estimado vs especificado para metanol

La Figura 6.2.3.6 no muestra algún dato anómalo, lo cual indica que todos los datos influyen en el modelo.

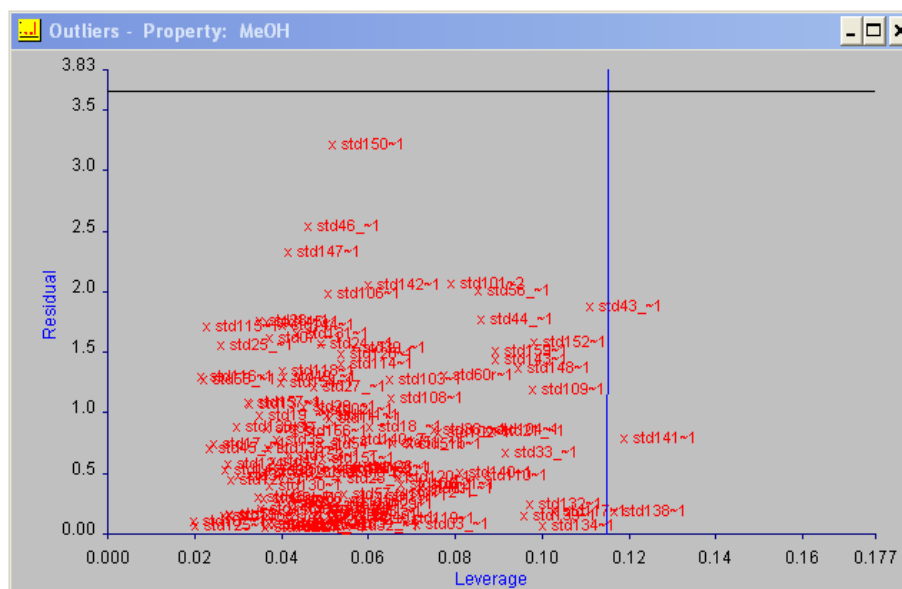


FIGURA 6.2.3.6 Anómalos para metanol

La Figura 6.2.3.7 muestra una distribución aleatoria y no hay tendencia alguna. Con esto se corrobora que el modelo es aceptable.

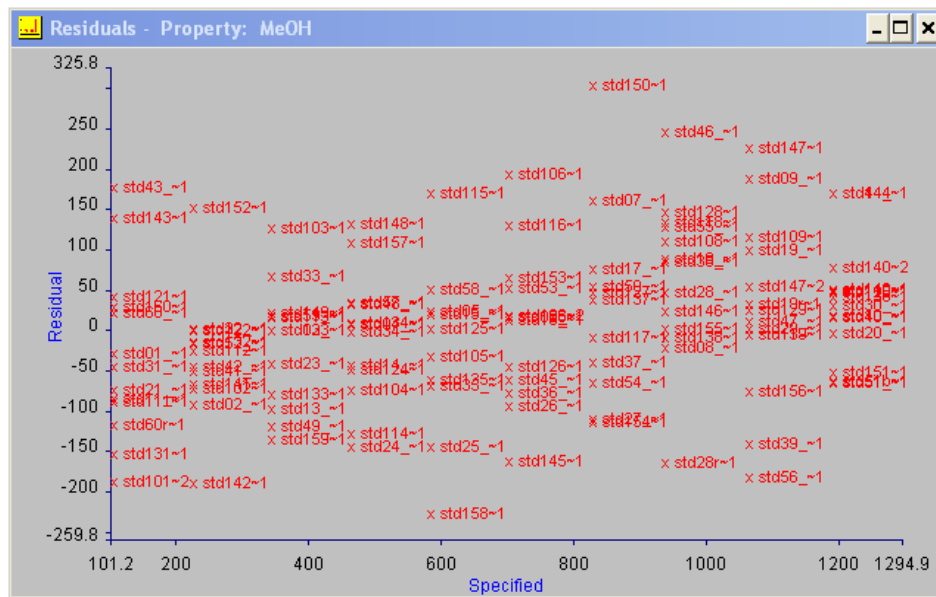


FIGURA 6.2.3.7 Residuales para metanol

La Figura 6.2.3.8 revela que cada sistema tiene la misma influencia para la realización del modelo, por lo que se corrobora un buen modelo.

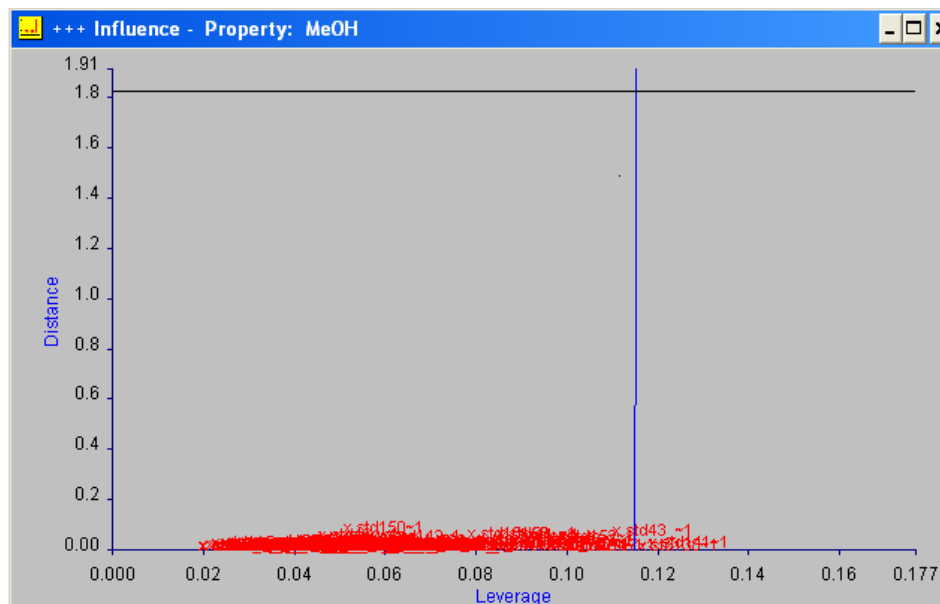


FIGURA 6.2.3.8 Influencia para metanol

La Figura 6.2.3.9 presenta el espectro con todos los tratamientos para la realización del modelo para la cuantificación de metanol.

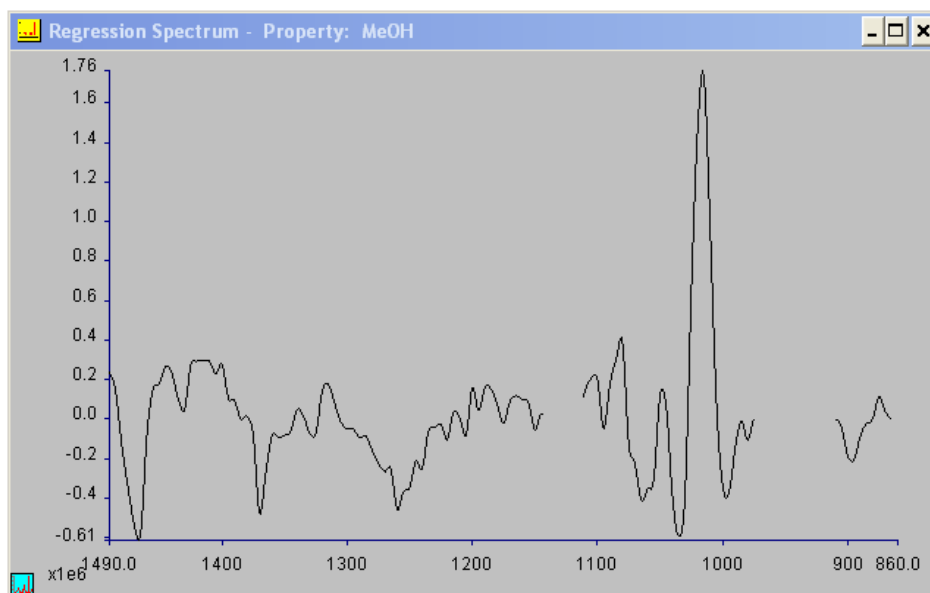


FIGURA 6.2.3.9 Espectro de regresión para metanol

A fin de evaluar el modelo PLS óptimo de Metanol, se realizó la predicción de unos sistemas de prueba preparados en el laboratorio de concentración conocida. La Tabla 6.2.3.2 muestra esta predicción y su comparación con la concentración real.

Tabla 6.2.3.2 Predicción de sistemas de prueba por el modelo PLS

Muestra	Metanol Sistema de prueba (mg/ L)	Metanol Predicha (mg/ L)	% error
1	578.95	559.27	3.40
2	221.46	247.11	11.58
3	1059.83	1064.50	0.44
4	822.56	761.93	7.37
5	338.51	339.25	0.22
6	696.01	746.46	7.25
7	458.73	462.25	0.77
8	1186.38	1138.70	4.02
9	933.29	944.09	1.16

En la Tabla 6.2.3.3 se verifica que las concentraciones del metanol predichas por el modelo PLS, coinciden con los intervalos de concentración típicos en tequilas. Al comparar estas concentraciones con las obtenidas por CG, se observa una coincidencia satisfactoria, en la mayoría de los casos menor al 10% de diferencia.

Tabla 6.2.3.3 Concentraciones de metanol en Tequilas obtenidas por el modelo PLS y su comparación por cromatografía de gases

Nombre Tequila	Clase	Metanol PLS (mg/ L)	Metanol CG (mg/ L)	% error
Coa de Azul	AÑEJO	871.19	898.50	3.04
Don Agustín	AÑEJO	812.57	833.41	2.50
Campo Azul	AÑEJO	671.74	684.67	1.89
Herradura	AÑEJO	833.34	722.29	15.37
Sauza 3 Generaciones	AÑEJO	632.40	592.30	6.77
100 Años	BLANCO	803.31	893.61	10.11
Jimador	BLANCO	688.17	744.50	7.57
Amo	BLANCO	811.42	828.50	2.06
Orendain	BLANCO	291.60	322.74	9.65
Viuda de Romero	BLANCO	380.61	383.80	0.83
Herradura	BLANCO	1114.10	922.47	20.77
Puerto Vallarta	BLANCO	747.46	838.01	10.81
Casco Viejo	BLANCO	818.84	858.17	4.58
Alamo	BLANCO	889.62	854.48	4.11
Corralejo	REPOSADO	1037.00	803.17	29.11
Sauza Hornitos	REPOSADO	744.15	649.34	14.60
José Cuervo	REPOSADO	1013.30	856.33	18.33
Don Ramón	REPOSADO	742.92	700.79	6.01
100 Años	REPOSADO	876.16	810.50	8.10
Olmecca Supremo	REPOSADO	601.97	516.40	16.57
1800	REPOSADO	802.66	723.37	10.96
Herradura	REPOSADO	623.09	628.33	0.83
Cabrito	REPOSADO	753.06	651.43	15.60
Sierra	REPOSADO	715.54	667.69	7.17

6.2.4. Cuantificación de 3-metil-1-Butanol.

La Tabla 6.2.4.1 muestra las características del modelo para la cuantificación de 3-metil-1-butanol en tequilas.

Tabla 6.2.4.1 Características del modelo para la cuantificación de 3-metil-1-butanol

Calculation Parameters:			
Algorithm:	PLS1		
Range:	1490 to 860 cm ⁻¹		
Interval:	5 cm ⁻¹		
Analysis Type:	Absorbance		
Scaling (Spectra):	Mean		
Scaling (Property):	Mean		
Smooth:	Yes		
Smooth width:	5		
Baseline correction:	None		
Normalization:	SNV (with de-trending)		
Ordinate threshold:			
Upper threshold:	1.5 A		
Lower threshold:	None		
Number of factors:			
Minimum:	1		
Maximum:	100		
Blank regions:	1168.00 to 1112.00	990.00 to 909.00	cm ⁻¹
	865.00 to 860.00	cm ⁻¹	

Al correr el programa para la cuantificación de 3-metil-1-butanol en tequilas con las características anteriores, considerando 9 variables latentes se obtuvo un 93.61% de varianza con un error de predicción de 173.5.

En la Figura 6.2.4.1 no se encuentran datos mal comportados, ya que todos se encuentran en la parte inferior de la línea de corte. Como se muestra en los casos anteriores.

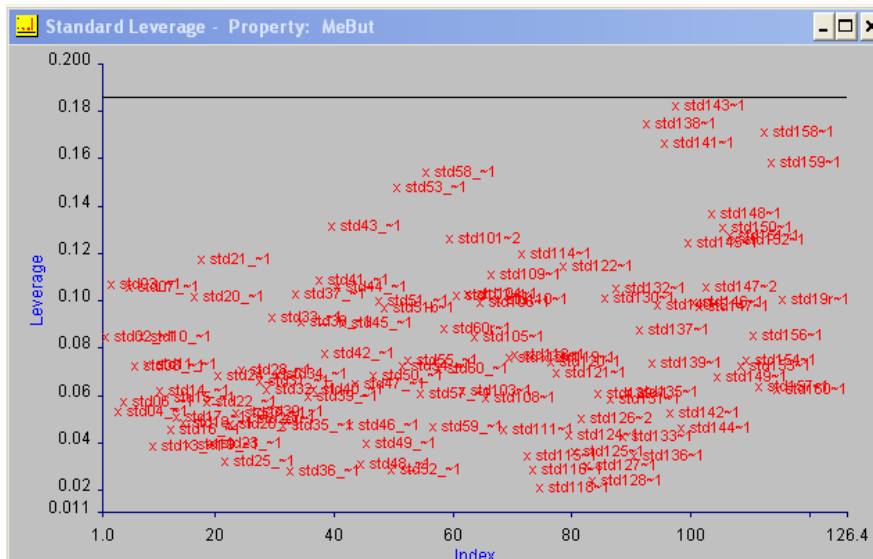


FIGURA 6.2.4.1 Estándar de apalancamiento para 3-Metil-1-Butanol

La Figura 6.2.3.2 muestra una sola agrupación lo cual indica la similitud entre cada uno de los espectros por lo que el modelo es satisfactorio.

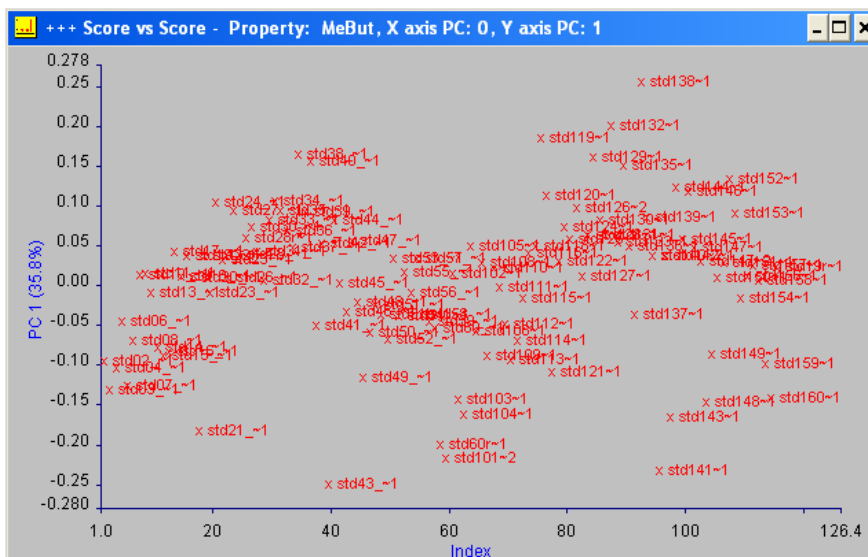


FIGURA 6.2.4.2 Puntuación vs puntuación para 3-Metil-1-Butanol

La Figura 6.2.4.3 muestra un número de variables latentes de 9 y un error de predicción de 173.5.

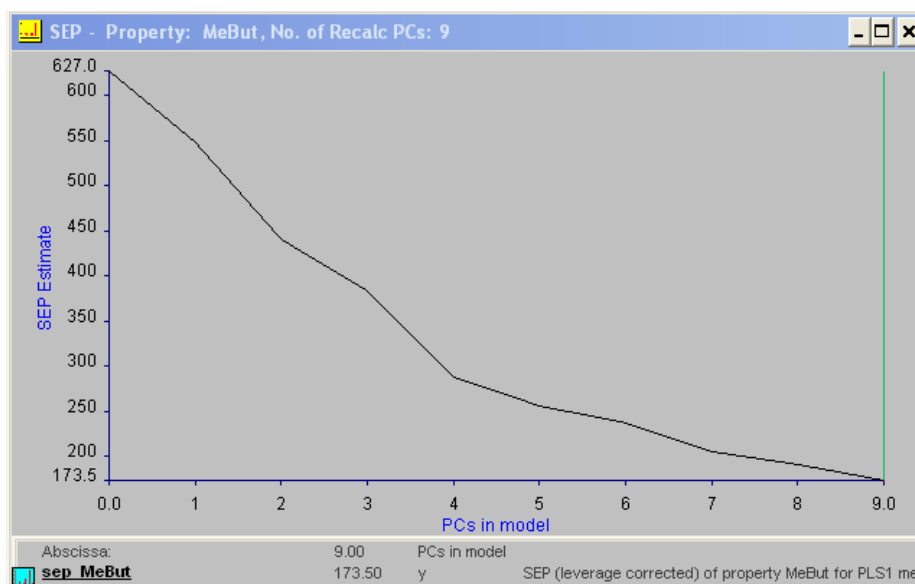


FIGURA 6.2.4.3 Error estándar de predicción para 3-Metil-1-Butanol

La Figura 6.2.4.4 indica el intervalo en el cual hay una mayor variabilidad para la construcción del modelo, la cual tiene un banda de 1080 a 1040 cm^{-1} .

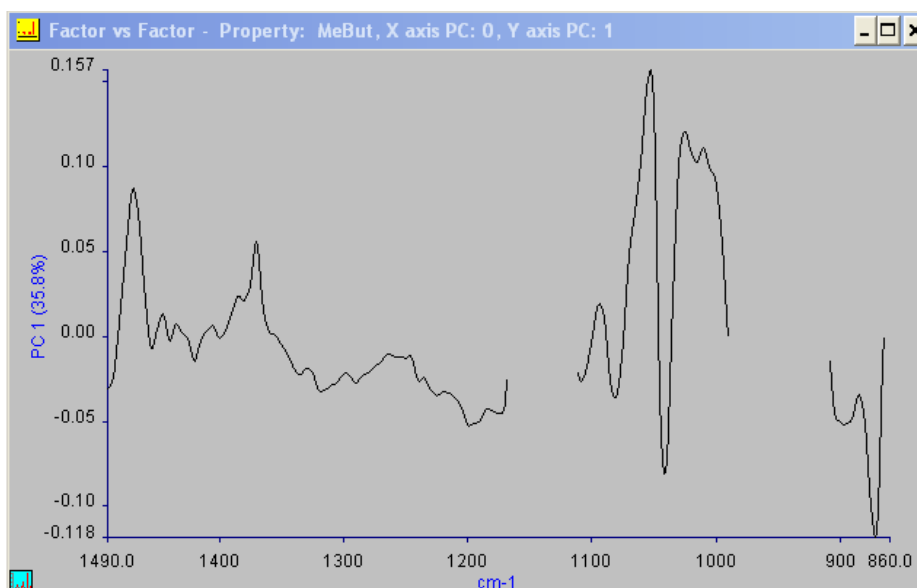


FIGURA 6.2.4.4 Factor vs factor para 3-Metil-1-Butanol

La Figura 6.2.4.5 muestra la concentración especificada con la predicha. La cual indica una tendencia lineal.

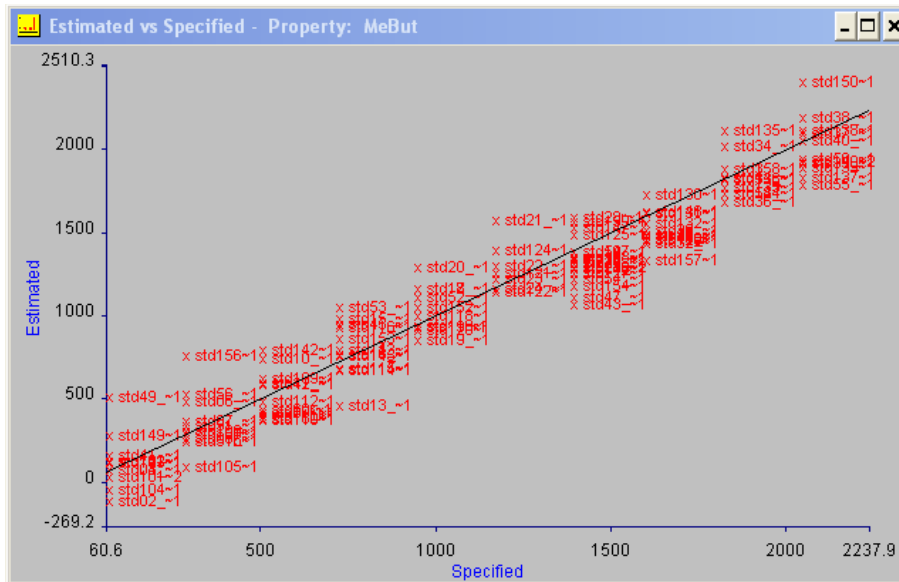


FIGURA 6.2.4.5 Valor estimado vs especificado para 3-metil-1-butanol

La Figura 6.2.4.6 no muestra algún dato anómalo, lo cual indica que todos los datos influyen en el modelo.

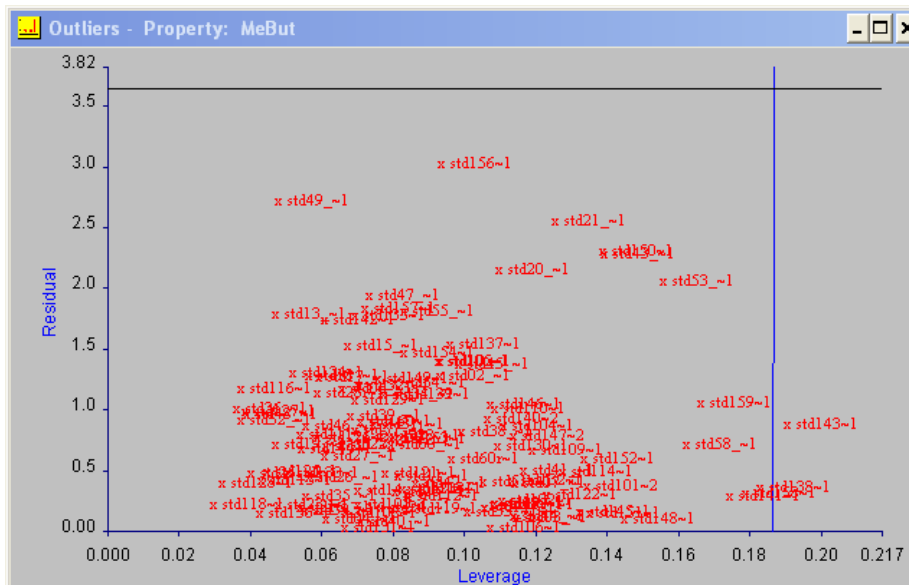


FIGURA 6.2.4.6 Anómalos para 3-Metil-1-Butanol

La Figura 6.2.4.7 muestra una distribución aleatoria y no hay tendencia alguna, con esto se corrobora que el modelo es aceptable.

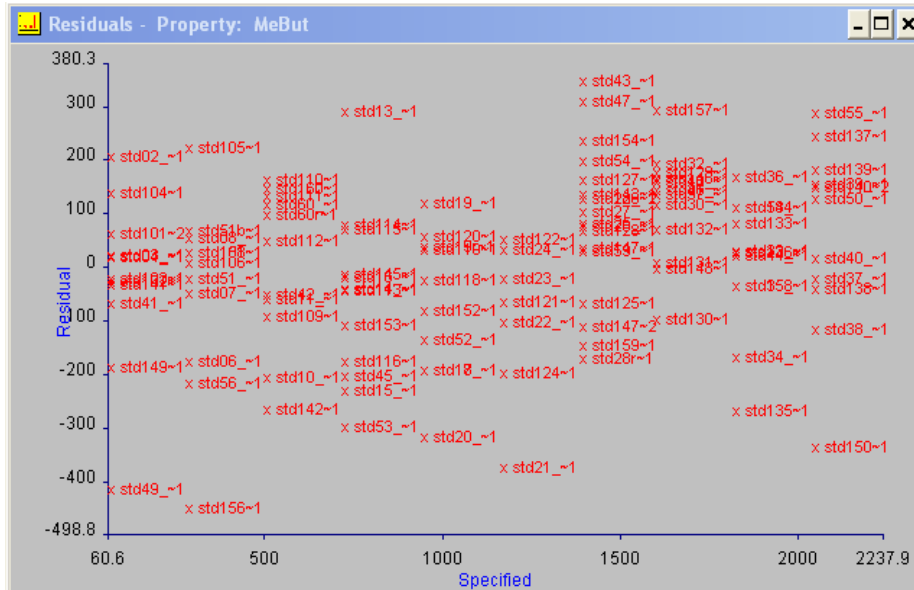


FIGURA 6.2.4.7 Residuales para 3-Metil-1-Butanol

La Figura 6.2.4.8 revela que cada sistema tiene la misma influencia para la realización del modelo, por lo que se corrobora un buen modelo.

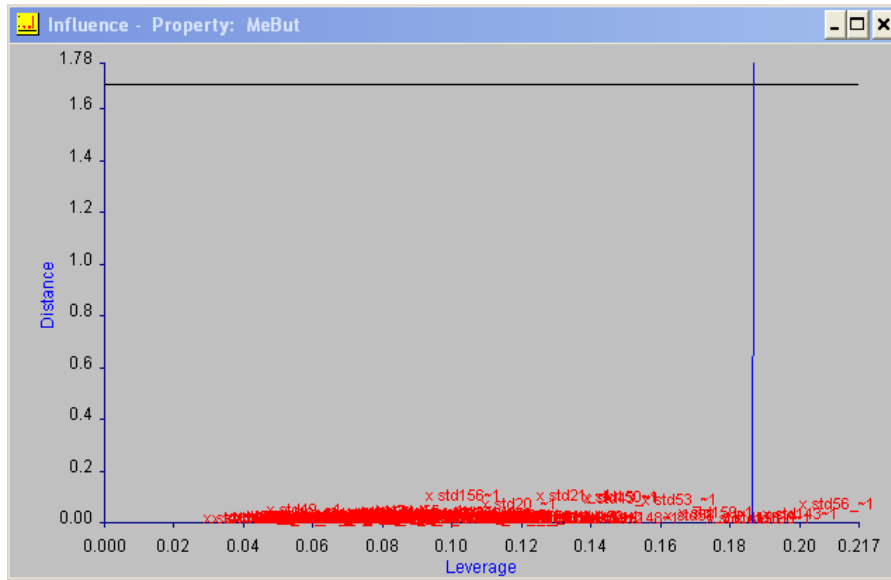


FIGURA 6.2.4.8 Influencia para 3-Metil-1-Butanol

La Figura 6.2.4.9 presenta el espectro con todos los tratamientos para la realización del modelo para la cuantificación de metanol.

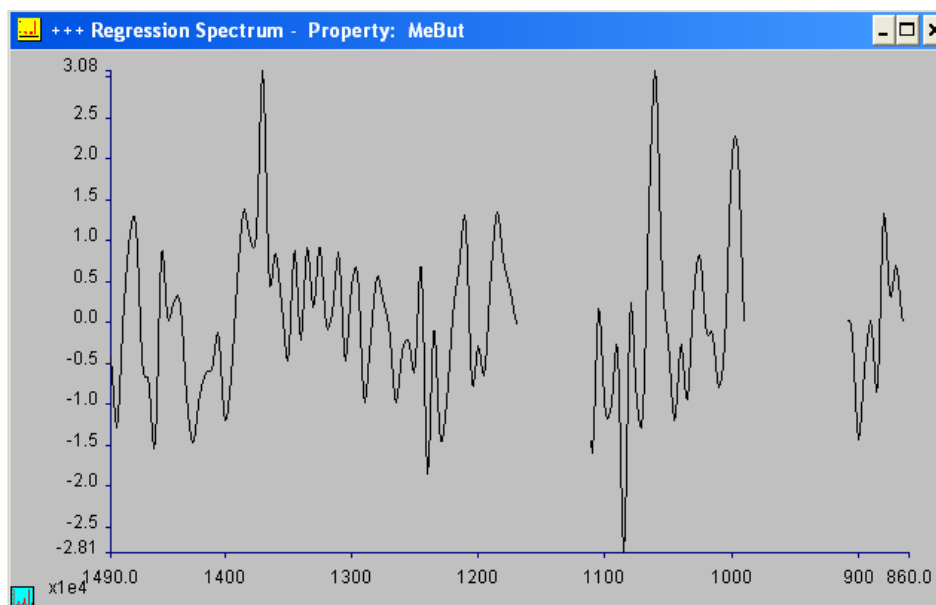


FIGURA 6.2.4.9 Espectro de regresión para 3-Metil-1-Butanol

A fin de evaluar el modelo PLS óptimo de 3-metil-1-butanol, se realizó la predicción de sistemas de prueba preparados en el laboratorio de concentración conocida. La Tabla 6.2.4.2 muestra esta predicción y su comparación con la concentración real.

Tabla 6.2.4.2 Predicción de sistemas de prueba por el modelo PLS

Muestra	3-metil-1-butanol prueba (mg/ L)	3-metil-1-butanol Predicha (mg/ L)	% error
1	280.50	223.88	20.19
2	500.43	587.35	17.37
3	1593.73	1829.70	14.81
4	940.30	899.97	4.29
5	1163.42	1065.00	8.46
6	1386.55	1269.00	8.48
7	1816.85	1844.90	1.54
8	2039.97	2157.70	5.77
9	2039.97	1579.30	22.58

En la Tabla 6.2.4.3 se puede verificar que las concentraciones del 3-metil-1-butanol predichas por el modelo PLS óptimo, coinciden con los intervalos de

concentración típicos en los tequilas. Por otra parte, al comparar estas concentraciones con las obtenidas por cromatografía de gases, se observa una coincidencia satisfactoria, en la mayoría de los casos con una diferencia menor al 15 %.

Tabla 6.2.4.3 Concentraciones de metanol en Tequilas obtenidas por el modelo PLS y su comparación por cromatografía de gases

Nombre Tequila	Clase	3-metil-1-butanol PLS (mg/ L)	3-metil-1-butanol CG (mg/ L)	% error
Coa de Azul	AÑEJO	475.09	487.22	2.49
Don Agustín	AÑEJO	1068.30	936.82	14.04
Campo Azul	AÑEJO	822.46	835.49	1.56
Herradura	AÑEJO	1248.00	1022.83	22.02
Sauza 3 Generaciones	AÑEJO	848.38	742.26	14.30
100 Años	BLANCO	883.44	932.77	5.29
Jimador	BLANCO	953.68	764.21	24.79
Amo	BLANCO	1066.60	914.23	16.67
Orendain	BLANCO	682.73	561.31	21.63
Viuda de Romero	BLANCO	633.95	703.97	9.95
Herradura	BLANCO	1486.50	1537.04	3.29
Puerto Vallarta	BLANCO	876.09	732.14	19.66
Casco Viejo	BLANCO	1057.40	961.85	9.94
Alamo	BLANCO	856.34	808.87	5.87
Corralejo	REPOSADO	1143.10	1214.27	5.86
Sauza Hornitos	REPOSADO	763.28	764.76	0.19
José Cuervo	REPOSADO	1063.70	1096.36	2.98
Don Ramón	REPOSADO	948.90	1127.13	15.81
100 Años	REPOSADO	1008.50	917.40	9.93
Olmecca Supremo	REPOSADO	488.36	523.97	6.80
1800	REPOSADO	1014.10	1062.36	4.54
Herradura	REPOSADO	859.91	1042.35	17.50
Cabrito	REPOSADO	811.60	982.72	17.41
Sierra	REPOSADO	666.34	789.75	15.63

7. Conclusiones

- La combinación de la espectroscopia FT-MIR con la técnica multivariante por mínimos cuadrados parciales (PLS) permitió la construcción de 3 modelos por mínimos cuadrados parciales (PLS), útiles para predecir, adecuadamente, las concentraciones de metanol, acetato de etilo y 3-metil-1-butanol, en muestras de prueba de concentración conocida y en tequilas.
- La predicción de las concentraciones de metanol, acetato de etilo y 3-metil-1-butanol por los modelos, coincidieron satisfactoriamente con las determinadas en un trabajo previamente realizado por cromatografía de gases, tomando en cuenta la sensibilidad de la técnica FT-MIR.
- Los presentes modelos permitirán de manera rápida y sencilla cuantificar, de una manera aproximada, si el acetato de etilo, el metanol y el 3-metil-1-butanol, presentes en tequilas, se encuentran en los intervalos establecidos por la NOM-006-SCFI-12.
- Dicho método podría ser utilizado por las diferentes instancias relacionadas con la elaboración y regulación del Tequila y organismos de protección al consumidor.

Referencias.

- [01] Norma Oficial Mexicana NOM-006-SCFI-2012, bebidas Alcohólicas-Tequila-especificaciones.
- [02] 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 pág.26-34.
- [03] Covarrubias Cervantes M., Santiago Capella V.-- Correlación de Compuestos Volátiles del Tequila con su Origen. División de Estudios de Posgrado, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Enero 2007.
- [04] López, J.H.-- La Industria del Mezcal y el aprovechamiento del Maguey. Agricultura 10 (61)6.
- [05] Guzmán, P.M. Aguardientes de México; Tequila, Mezcal, charanda, Bacanora, sotol. Bebidas Mexicanas 6(4). Pág.37-40.
- [06] Peña-Álvarez A., Santiago Capella V., Juárez R., Labastida C.-Determination of terpenes in tequila by solid phase microextraction-gas chromatography–mass spectrometry.--- Journal of Chromatography A, 1134 291–297(2006).
- [07] Rico, B. F."El Tequila, es una Bebida Mexicana de la Fama Internacional". Bebidas mexicanas 1995.
- [08] Mercedes G., Guevara S.-Tequila, Mezcal y Sotol: Volátiles marcadores de Origen y Planta (Especie de Agave). —Investigación y Ciencia.
- [09] <http://www.crt.org.mx>.
- [10] García-Galindo, J. Ecofisiología de Plantas Jóvenes del Agave Azul (**Agave tequilana**) Weber. Tesis de Maestría, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara 2004.
- [11] Hernández V. Daniela.--- Identificación y cuantificación de los principales compuestos de diferentes tipos de whiskys a partir de un análisis por cromatografía de gases capilar.--- Tesis Fes-Cuautitlán UNAM 2008.
- [12] Sarah Bowen A, Valenzuela Zapata A., Geographical indications, terror, and socioeconomic and ecological sustainability: The case of tequila. Journal of Rural Studies 25 108–119 2009.

- [13] Norma Oficial Mexicana NOM-142-SSA1-1995.-- Bienes y servicios. Bebidas alcohólicas. Especificaciones sanitarias. Etiquetado sanitario y comercial.
- [14] Skoog A. Douglas.--- Fundamentos de Química Analítica.---8^{va} Edición México.--Thompson. — pág. 959, 961: 2005.
- [15] 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.
- [16] Andrade Garda J.M. Análisis Exploratorio de datos y Calibración Multivariante. Curso impartido en la FESC-Cuautitlán, UNAM 2010.
- [17] Miguel Castillo Martínez. Aplicación de la espectroscopia NIR al control analítico de procesos de la industria química. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona.
- [18] <http://www.arrogante.com.mx/tequilas>
- [19] Peguero Gutiérrez Anna. La espectroscopia NIR en la determinación de propiedades físicas y composición química de intermedios de producción y productos acabados. Tesis (Doctoral). Universidad Autónoma De Barcelona.
- [20] Manual Spectrum QUANT+ User's Reference FT-IR Spectroscopy, Perkin-Elmer. 1997.
- [21] Cruz, R. E. (2012). Identificación y cuantificación de los principales compuestos presentes en diferentes tipos de tequilas por cromatografía de gases capilar y técnicas quimiométricas. Tesis de Licenciatura. UNAM, FESC-Cuautitlán.
- [22] Serrano Martínez J.L. Curso instrumentación y métodos de análisis químico.
- [23] Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications B. Stuart John Wiley & Sons, (2004).

ANEXO

TABLA 5.2.3 Preparación de estándares con sus respectivas concentraciones reales

Solución	µL reales de solución madre					Concentraciones reales				
	Metanol	Acetato de etilo	N-Propanol	2-metil-1-propanol	3-metil-1-butanol	Metanol	Acetato de etilo	N-Propanol	2-metil-1-propanol	3-metil-1-butanol
STD 01	32	19	19	19	19	101.24	5.11	60.68	60.57	60.56
STD 02	70	19	19	19	19	221.46	5.11	60.68	60.57	60.56
STD 03	107	19	19	19	19	338.51	5.11	60.68	60.57	60.56
STD 04	145	19	19	19	19	458.73	5.11	60.68	60.57	60.56
STD 05	183	355	88	88	88	578.95	95.56	281.04	280.54	280.50
STD 06	220	355	88	88	88	696.01	95.56	281.04	280.54	280.50
STD 07	260	355	88	88	88	822.56	95.56	281.04	280.54	280.50
STD 08	295	355	88	88	88	933.29	95.56	281.04	280.54	280.50
STD 09	335	685	157	157	157	1059.83	184.40	501.40	500.51	500.43
STD 10	375	685	157	157	157	1186.38	184.40	501.40	500.51	500.43
STD 11	32	685	157	157	157	101.24	184.40	501.40	500.51	500.43
STD 12	70	685	157	157	157	221.46	184.40	501.40	500.51	500.43
STD 13	107	1020	225	225	225	338.51	274.57	718.56	717.30	717.18
STD 14	145	1020	225	225	225	458.73	274.57	718.56	717.30	717.18
STD 15	183	1020	225	225	225	578.95	274.57	718.56	717.30	717.18
STD 16	220	1020	225	225	225	696.01	274.57	718.56	717.30	717.18
STD 17	260	1360	295	295	295	822.56	366.10	942.11	940.45	940.30
STD 18	295	1360	295	295	295	933.29	366.10	942.11	940.45	940.30
STD 19	335	1360	295	295	295	1059.83	366.10	942.11	940.45	940.30
STD 20	375	1360	295	295	295	1186.38	366.10	942.11	940.45	940.30
STD 21	32	1690	365	365	365	101.24	454.93	1165.66	1163.61	1163.42
STD 22	70	1690	365	365	365	221.46	454.93	1165.66	1163.61	1163.42
STD 23	107	1690	365	365	365	338.51	454.93	1165.66	1163.61	1163.42
STD 24	145	1690	365	365	365	458.73	454.93	1165.66	1163.61	1163.42
STD 25	183	2020	430	435	435	578.95	543.76	1373.25	1386.77	1386.55
STD 26	220	2020	430	435	435	696.01	543.76	1373.25	1386.77	1386.55
STD 27	260	2020	430	435	435	822.56	543.76	1373.25	1386.77	1386.55
STD 28	295	2020	430	435	435	933.29	543.76	1373.25	1386.77	1386.55
STD 29	335	2360	500	500	500	1059.83	635.29	1596.80	1593.99	1593.73

STD 30	375	2360	500	500	500	1186.38	635.29	1596.80	1593.99	1593.73
STD 31	32	2360	500	500	500	101.24	635.29	1596.80	1593.99	1593.73
STD 32	70	2360	500	500	500	221.46	635.29	1596.80	1593.99	1593.73
STD 33	107	2690	570	570	570	338.51	724.12	1820.35	1817.15	1816.85
STD 34	145	2690	570	570	570	458.73	724.12	1820.35	1817.15	1816.85
STD 35	183	2690	570	570	570	578.95	724.12	1820.35	1817.15	1816.85
STD 36	220	2690	570	570	570	696.01	724.12	1820.35	1817.15	1816.85
STD 37	260	3030	640	640	640	822.56	815.65	2043.90	2040.31	2039.97
STD 38	295	3030	640	640	640	933.29	815.65	2043.90	2040.31	2039.97
STD 39	335	3030	640	640	640	1059.83	815.65	2043.90	2040.31	2039.97
STD 40	375	3030	640	640	640	1186.38	815.65	2043.90	2040.31	2039.97
STD 41	70	3030	88	225	19	221.46	815.65	281.04	717.30	60.56
STD 42	70	685	430	295	157	221.46	184.40	1373.25	940.45	500.43
STD 43	32	19	157	19	435	101.24	5.11	501.40	60.57	1386.55
STD 44	375	1020	500	365	570	1186.38	274.57	1596.80	1163.61	1816.85
STD 45	220	2360	225	640	225	696.01	635.29	718.56	2040.31	717.18
STD 46	295	2690	430	88	500	933.29	724.12	1373.25	280.54	1593.73
STD 47	335	1360	19	500	435	1059.83	366.10	60.68	1593.99	1386.55
STD 48	145	2690	500	295	500	458.73	724.12	1596.80	940.45	1593.73
STD 49	107	1360	295	157	19	338.51	366.10	942.11	500.51	60.56
STD 50	260	2690	365	570	640	822.56	724.12	1165.66	1817.15	2039.97
STD 51	375	355	640	225	88	1186.38	95.56	2043.90	717.30	280.50
STD 52	70	2020	88	435	295	221.46	543.76	281.04	1386.77	940.30
STD 53	220	1690	430	19	225	696.01	454.93	1373.25	60.57	717.18
STD 54	260	355	500	570	435	822.56	95.56	1596.80	1817.15	1386.55
STD 55	295	1020	157	295	640	933.29	274.57	501.40	940.45	2039.97
STD 56	335	3030	430	640	88	1059.83	815.65	1373.25	2040.31	280.50
STD 57	145	1690	365	157	500	458.73	454.93	1165.66	500.51	1593.73
STD 58	183	19	19	500	570	578.95	5.11	60.68	1593.99	1816.85
STD 59	107	355	225	365	435	338.51	95.56	718.56	1163.61	1386.55
STD 60	32	2360	295	88	157	101.24	635.29	942.11	280.54	500.43
STD 101	32	19	19	19	19	101.24	5.11	60.68	60.57	60.56
STD 102	70	19	19	19	19	221.46	5.11	60.68	60.57	60.56
STD 103	107	19	19	19	19	338.51	5.11	60.68	60.57	60.56
STD 104	145	19	19	19	19	458.73	5.11	60.68	60.57	60.56
STD 105	183	355	88	88	88	578.95	95.56	281.04	280.54	280.50

STD 106	220	355	88	88	88	696.01	95.56	281.04	280.54	280.50
STD 107	260	355	88	88	88	822.56	95.56	281.04	280.54	280.50
STD 108	295	355	88	88	88	933.29	95.56	281.04	280.54	280.50
STD 109	335	685	157	157	157	1059.83	184.40	501.40	500.51	500.43
STD 110	375	685	157	157	157	1186.38	184.40	501.40	500.51	500.43
STD 111	32	685	157	157	157	101.24	184.40	501.40	500.51	500.43
STD 112	70	685	157	157	157	221.46	184.40	501.40	500.51	500.43
STD 113	107	1020	225	225	225	338.51	274.57	718.56	717.30	717.18
STD 114	145	1020	225	225	225	458.73	274.57	718.56	717.30	717.18
STD 115	183	1020	225	225	225	578.95	274.57	718.56	717.30	717.18
STD 116	220	1020	225	225	225	696.01	274.57	718.56	717.30	717.18
STD 117	260	1360	295	295	295	822.56	366.10	942.11	940.45	940.30
STD 118	295	1360	295	295	295	933.29	366.10	942.11	940.45	940.30
STD 119	335	1360	295	295	295	1059.83	366.10	942.11	940.45	940.30
STD 120	375	1360	295	295	295	1186.38	366.10	942.11	940.45	940.30
STD 121	32	1690	365	365	365	101.24	454.93	1165.66	1163.61	1163.42
STD 122	70	1690	365	365	365	221.46	454.93	1165.66	1163.61	1163.42
STD 123	107	1690	365	365	365	338.51	454.93	1165.66	1163.61	1163.42
STD 124	145	1690	365	365	365	458.73	454.93	1165.66	1163.61	1163.42
STD 125	183	2020	430	435	435	578.95	543.76	1373.25	1386.77	1386.55
STD 126	220	2020	430	435	435	696.01	543.76	1373.25	1386.77	1386.55
STD 127	260	2020	430	435	435	822.56	543.76	1373.25	1386.77	1386.55
STD 128	295	2020	430	435	435	933.29	543.76	1373.25	1386.77	1386.55
STD 129	335	2360	500	500	500	1059.83	635.29	1596.80	1593.99	1593.73
STD 130	375	2360	500	500	500	1186.38	635.29	1596.80	1593.99	1593.73
STD 131	32	2360	500	500	500	101.24	635.29	1596.80	1593.99	1593.73
STD 132	70	2360	500	500	500	221.46	635.29	1596.80	1593.99	1593.73
STD 133	107	2690	570	570	570	338.51	724.12	1820.35	1817.15	1816.85
STD 134	145	2690	570	570	570	458.73	724.12	1820.35	1817.15	1816.85
STD 135	183	2690	570	570	570	578.95	724.12	1820.35	1817.15	1816.85
STD 136	220	2690	570	570	570	696.01	724.12	1820.35	1817.15	1816.85
STD 137	260	3030	640	640	640	822.56	815.65	2043.90	2040.31	2039.97
STD 138	295	3030	640	640	640	933.29	815.65	2043.90	2040.31	2039.97
STD 139	335	3030	640	640	640	1059.83	815.65	2043.90	2040.31	2039.97
STD 140	375	3030	640	640	640	1186.38	815.65	2043.90	2040.31	2039.97
STD 141	70	3030	88	225	19	221.46	815.65	281.04	717.30	60.56

STD 142	70	685	430	295	157	221.46	184.40	1373.25	940.45	500.43
STD 143	32	19	157	19	435	101.24	5.11	501.40	60.57	1386.55
STD 144	375	1020	500	365	570	1186.38	274.57	1596.80	1163.61	1816.85
STD 145	220	2360	225	640	225	696.01	635.29	718.56	2040.31	717.18
STD 146	295	2690	430	88	500	933.29	724.12	1373.25	280.54	1593.73
STD 147	335	1360	19	500	435	1059.83	366.10	60.68	1593.99	1386.55
STD 148	145	2690	500	295	500	458.73	724.12	1596.80	940.45	1593.73
STD 149	107	1360	295	157	19	338.51	366.10	942.11	500.51	60.56
STD 150	260	2690	365	570	640	822.56	724.12	1165.66	1817.15	2039.97
STD 151	375	355	640	225	88	1186.38	95.56	2043.90	717.30	280.50
STD 152	70	2020	88	435	295	221.46	543.76	281.04	1386.77	940.30
STD 153	220	1690	430	19	225	696.01	454.93	1373.25	60.57	717.18
STD 154	260	355	500	570	435	822.56	95.56	1596.80	1817.15	1386.55
STD 155	295	1020	157	295	640	933.29	274.57	501.40	940.45	2039.97
STD 156	335	3030	430	640	88	1059.83	815.65	1373.25	2040.31	280.50
STD 157	145	1690	365	157	500	458.73	454.93	1165.66	500.51	1593.73
STD 158	183	19	19	500	570	578.95	5.11	60.68	1593.99	1816.85
STD 159	107	355	225	365	435	338.51	95.56	718.56	1163.61	1386.55
STD 160	32	2360	295	88	157	101.24	635.29	942.11	280.54	500.43