



UNIVERSIDAD NACIONAL LA PAMPA

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

***“ANÁLISIS QUIMIOMÉTRICO DE WHISKYS
COMERCIALES EMPLEANDO ABSORCIOMETRÍA
MOLECULAR UV-vis”***

TRABAJO DE TESIS DE GRADO
LICENCIATURA EN QUÍMICA

PRESENTADO POR
MARÍA MAGDALENA ALBA

DIRECTOR
Dr. MIGUEL ÁNGEL CANTARELLI

CO-DIRECTOR
Dr. JOSÉ MANUEL CAMIÑA

SANTA ROSA, LA PAMPA

2013

PREFACIO

Esta Tesina es presentada como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Licenciado en Química de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de La Pampa y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad ni en otra Institución Académica. Se llevó a cabo en el Departamento de Química de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, bajo la dirección del Dr. Miguel Ángel CANTARELLI y bajo la co – dirección del Dr. José Manuel CAMIÑA.

Abril de 2013

María Magdalena ALBA

Departamento de Química

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Universidad Nacional de La Pampa

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo es un esfuerzo en el cual, directa o indirectamente, participaron muchas personas.

Agradezco a la Universidad Nacional de La Pampa, institución que me abrió las puertas para formarme como profesional. Al personal docente y técnico del Departamento de Química de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, por su colaboración desinteresada.

A mi director, Dr. Miguel Cantarelli y a mi co- director, Dr. José Camiña, por haber aceptado la dirección de esta tesis, por su buena predisposición, sus sugerencias, su dedicación y su paciencia.

A mis “compañeros de etapa”. A mis amigos de la vida, por sus consejos, su compañía y su amistad incondicional.

A Joaquín, por su paciencia, su contención, por estar siempre.

A mi familia, a quien debo cada uno de mis logros, por su apoyo, sus consejos y su amor.

RESUMEN

El whisky es una bebida alcohólica obtenida por la destilación de un mosto fermentado de cereales como cebada, trigo, malteada, centeno y maíz, y posterior envejecimiento en barriles de madera, tradicionalmente de roble blanco. Esta bebida alcohólica se comercializa con un contenido alcohólico de entre 40 y 62 % en volumen.

En general, un whisky puede ser caracterizado por tres propiedades: el contenido de etanol (de acuerdo a las normas vigentes, un whisky debe adherirse a un contenido mínimo de 40% (v/v)); el congénere (el whisky contiene una serie de congéneres durante los procesos de fermentación y maduración), la consistencia del color (el whisky puede ser alterado con el uso de colorantes específicos).

La cromatografía de gases (GC) puede proporcionar información tanto en el contenido de etanol y el aumento de los perfiles de alcohol en el whisky, diferenciando entre las diferentes bebidas alcohólicas, y distinguir whiskys de malta y de grano en el perfil de congéneres verificándose posibles adulteraciones en la mencionada bebida. Sin embargo, el tiempo de análisis y el costo de equipamiento hacen que esta metodología sea inaccesible a laboratorios de bajo presupuesto. Por otro lado, no existen metodologías analíticas capaces detectar adulteraciones en estas bebidas por espectrofotometría UV-vis.

Por todo ello, esta tesis ha realizado un estudio combinado mediante absorciometría molecular UV-vis y métodos quimiométricos, para la clasificación de diferentes whiskys comerciales a fin de proponer un nuevo método analítico rápido, sencillo y económico para la discriminación e identificación de los mismos, con fines de control de calidad.

SUMMARY

Whisky is an alcoholic beverage obtained by the distillation of a fermented mash of grains such as barley, wheat, malted barley and corn, and further aging in wooden barrels, traditionally white oak. This liquor is sold with an alcohol content of between 40 and 62% by volume.

Different techniques have been used by the whiskey industry since 1900 for authentication and detection of counterfeit samples, ranging from classical chemistry to the use of advanced analytical instrumentation.

In general, a whiskey can be characterized by three properties: the ethanol content (whiskey must adhere to a minimum content of 40% (v/v)); congener (whiskey contains a series of congeners during fermentation processes and maturation), color consistency (whiskey can be altered by the use of specific dyes).

Gas chromatography (GC) can provide information on both the content of ethanol and increased alcohol profiles in whiskey, differentiating between various alcoholic beverages, and distinguish between single malts and grain in verifying congener profile possible adulterations in said beverage. However, time of analysis and cost of equipment is large, which do this method inaccessible for laboratories of low resources. On the other hand, there are no analytical methodologies capable detect tampering in these beverages by UV-vis spectrophotometry.

For this reason, this thesis have consider the combined study using UV-vis molecular absorptiometry and chemometric methods for the classification of different commercial whiskeys to propose a new, fast, simple and inexpensive analytical method for discrimination and identification of these, for purposes of quality control.

INDICE

	Pagina
<u>OBJETIVOS</u>	1
<u>CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN</u>	3
<i>1.1 Historia de las bebidas destiladas</i>	3
<i>1.2 Proceso de destilación</i>	4
<i>1.2.1 Principios de destilación</i>	4
<i>1.3 Bebidas Destiladas</i>	6
<i>1.4 Whisky</i>	7
<i>1.4.1 Tipos de Whisky</i>	9
<i>1.4.2 Proceso de elaboración del whisky</i>	10
<i>1.4.2.1. Malteado</i>	11
<i>1.4.2.2. Fermentación</i>	11
<i>1.4.2.3. Destilación</i>	13
<i>1.2.2.4. Maduración</i>	14
<i>1.4.3 Química del whisky</i>	15
<i>1.5 Autenticidad de las bebidas alcohólicas</i>	16
<i>1.6 Herramientas de calibración multivariadas</i>	18

<i>1.6.1 Fundamentos matemáticos del PCA</i>	22
<i>1.6.2. Estimación de un modelo PCA</i>	26
<i>1.7. Análisis multivariado y autenticidad de las bebidas alcohólicas</i>	27
<u>CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS.</u>	30
<i>2.1 Muestras de whisky</i>	30
<i>2.2 Preparación de las bebidas para la medición</i>	31
<i>2.3 Espectroscopía UV-visible</i>	32
<i>2.4 Análisis multivariado</i>	33
<u>CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	34
<i>3.1 Espectros de Absorción</i>	34
<i>3.2 Análisis Multivariado</i>	41
<i>3.2.1 Análisis por Componentes Principales (PCA)</i>	42
<i>3.2.2 Varianza Explicada</i>	42
<i>3.2.3 Análisis Discriminante Lineal (LDA). Funciones Discriminantes</i>	43
<i>3.2.4 Análisis Discriminante Lineal. Tabla de clasificación cruzada</i>	45
<u>CAPÍTULO 4: CONCLUSIONES</u>	47
<u>CAPÍTULO 5: BIBLIOGRAFÍA</u>	48

OBJETIVOS

El surgimiento de nuevas habilidades para la elaboración de whiskys impone la necesidad de aplicación de sistemas formales que permitan garantizar la calidad de los productos. Los fraudes, falsificaciones y adulteraciones son moneda corriente en esta industria, de manera que es indispensable la evaluación de cada una de las etapas implicadas en la producción de una bebida como así también en el producto final.

La destilación y la fermentación constituyen etapas decisivas, por lo que se pone mucho énfasis en su control. Actualmente se le confiere gran importancia a la buena calidad de las materias primas, que de hecho están reguladas legalmente. También se han comenzado a regular las condiciones en las que se lleva a cabo la maduración de un determinado producto, que en definitiva es el procedimiento que atribuye a la bebida las características deseadas.

La revisión bibliográfica muestra que los sistemas formales empleados para determinar la calidad, generalmente, implican la utilización de técnicas engorrosas y económicamente no accesibles para laboratorios pequeños; como por ejemplo cromatografía gaseosa, espectroscopía infrarroja, microextracción en fase sólida, espectroscopía de plasma acoplado inductivamente, etc.

Por su parte, el uso de herramientas de calibración multivariada, ha crecido notablemente, debido a la necesidad de procesar una gran cantidad de datos obtenidos por el instrumental analítico actual y favorecido por el desarrollo de los nuevos sistemas informáticos de gran capacidad de procesamiento (tanto sea programas como instrumental y sistemas de computación) generando un conjunto de análisis de datos sumamente valioso

para el desarrollo de la Química. Estos sistemas de análisis de datos, han adquirido incluso la categoría de subdisciplina, la cual es conocida en su conjunto con el nombre de Quimiometría. El uso de herramientas de análisis computacionales también se ha aplicado con éxito en otras disciplinas como la Economía, Psicología, Ciencias Sociales, Biología, etc.

A raíz de ello, se plantea la necesidad de contar con métodos analíticos confiables, asequibles, rápidos y de bajo costo, para la discriminación de whiskys, a los fines de una rápida determinación para el control de calidad en el comercio nacional e internacional.

El objetivo del trabajo fue realizar la caracterización y clasificación de whiskys, utilizando absorciometría molecular UV-vis en combinación con herramientas multivariadas, a los fines de desarrollar nuevas metodologías de análisis de mayor rapidez y menores costos.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1 HISTORIA DE LAS BEBIDAS DESTILADAS

La destilación es una de las más tempranas manifestaciones de la tecnología química. El proceso ya se conocía en China muchos años antes del nacimiento de Cristo, y se cree que la primera bebida destilada se elaboró a partir de vino de arroz alrededor de 800 años a.C. El secreto de la destilación permaneció en China hasta los primeros años d.C., cuando el proceso se estudió en Egipto.

Los químicos árabes aprendieron el arte y fueron quienes diseñaron el primer destilador verdaderamente eficaz, el alambique, que todavía se utiliza para la destilación de diversas bebidas espirituosas, incluido el whisky. Los árabes introdujeron la destilación en Europa occidental a partir del norte de África. El nuevo arte interesó mucho a los alquimistas y a los monjes, quienes creyeron que el destilado era un nuevo elemento (“agua de vida”), por lo que se consideró que éstas bebidas poseían propiedades medicinales. La propagación geográfica de los destilados, prosiguió según los pueblos europeos iban estableciendo sus colonias en América. El ron, ya se elaboraba en Barbados en 1630 y la producción de whisky comenzó en Norteamérica a finales del siglo XVII. Entretanto continuaban las mejoras técnicas en el diseño de los alambiques y los grandes avances del siglo XVIII mejoraron en gran medida la eficacia de la destilación.

El desarrollo del destilador continuo por parte de Aenas Coffey en Dublín en 1830 puede considerarse como la última gran innovación tecnológica en el campo de la destilación, aunque tanto el proceso en general como el diseño de la maquinaria siguen en perfeccionamiento continuo. [1]

1.2 PROCESO DE DESTILACIÓN

1.2.1 Principios de destilación

La destilación consiste en un proceso de separación basado en las diferentes volatilidades en un punto de ebullición (punto de destilación) que poseen los componentes presentes en una solución. Ésta consiste en una combinación de agua, etanol y otros compuestos con variadas volatilidades. En la presión total de una atmósfera, puede definirse el punto de ebullición como la temperatura en la que la suma de las presiones parciales efectuadas por cada uno de los componentes es igual a uno. La ecuación 1 ilustra este concepto para un sistema constituido por agua y alcohol.

$$p_{\text{H}_2\text{O}} + p_{\text{etOH}} = 1$$

Ecuación 1. Suma de las presiones parciales de los componentes agua y etanol

En donde $p_{\text{H}_2\text{O}}$ y p_{etOH} constituyen las presiones parciales del agua y etanol, respectivamente. En este sistema, la presión parcial de cada componente se expresa mediante la ecuación 2.

$$p_{\text{etOH}} = \gamma_1 x_1 P_{\text{etOH}}$$

$$p_{\text{H}_2\text{O}} = \gamma_2 x_2 P_{\text{H}_2\text{O}} = \gamma_2 (1 - x_1) P$$

Ecuación 2. Presión parcial de los componentes en función de su coeficiente de actividad y fracción molar.

Donde:

γ_1 = coeficiente de actividad del compuesto más volátil (etanol)

γ_2 = coeficiente de actividad del compuesto menos volátil (agua)

x_1 y x_2 = son las fracciones molares de ambos componentes

P_{etOH} = presión de vapor del etanol

$P_{\text{H}_2\text{O}}$ = presión de vapor del agua

Al mismo tiempo, es posible establecer una relación entre el número de moléculas de cada compuesto con las presiones parciales, mediante la ecuación 3.

$$p_1 / P_T = N_1 / N_T = y_1$$

Ecuación 3. Relación entre número de moléculas y presión parcial de un componente

Donde:

N_T = número total de moles de vapor

P_T = presión total

N_1 = moles del componente 1 en el vapor

p_1 = presión parcial del componente 1

y_1 = fracción molar del componente 1 en el vapor

En el punto de ebullición se establece un equilibrio entre el líquido y el vapor que está constituido por una determinada composición. A medida que se desarrolla el proceso de destilación, aumenta la cantidad de compuesto volátil en el vapor y disminuye en el líquido.

Se puede aumentar la cantidad del compuesto volátil en el vapor mediante la continua condensación del vapor y vaporización del líquido repetidamente. [1]

1.3 BEBIDAS DESTILADAS

Las bebidas alcohólicas pueden dividirse en dos grandes grupos: aquellas que provienen del producto final de una fermentación y cuyo contenido alcohólico es, generalmente, inferior a 15%, tales como la cerveza y el vino; y aquellas que se obtienen luego de un proceso de destilación a partir de un producto de fermentación u otro producto que contenga etanol, lo que aumenta su concentración en alcohol etílico, tales como el whisky, los aguardientes, etc. [2]

Las bebidas destiladas, por su parte, suelen clasificarse de acuerdo a la presencia de aromas propios o no: los del primer tipo o no congénicos*, representado por el vodka y la ginebra, se rectifican y no tienen aroma propio; su materia prima es cualquier solución alcohólica que se puede obtener de varias fuentes. Los del segundo tipo o congénicos poseen aroma propio, están representados por el whisky y el ron; su materia prima, los procesos de fermentación y destilación están determinados. [3] El Código Alimentario Argentino (CAA) define como bebida destilada (a excepción de las fermentadas): “el líquido alcohólico destinado al consumo humano con características organolépticas especiales, con un grado alcohólico mínimo de 0,5 %. y un máximo de 54 % a 20°C, obtenido:

* *Congéneres: son impurezas volátiles como ácidos, ésteres, aldehídos, cetonas y alcoholes que contribuyen a caracterizar los atributos de las bebidas. Algunos congéneres provienen del sustrato o la materia prima inicial y otros son producidos por microorganismos fermentadores.*

-
- a) directamente por destilación en presencia o no de sustancias aromáticas, de productos naturales fermentados, y/o por maceración, infusión, percolación o digestión de sustancias vegetales; y/o por adición de aromas, sabores, colorantes y otros aditivos permitidos, azúcares u otros productos agrícolas al alcohol etílico potable de origen agrícola y/o a un destilado alcohólico simple, conforme a los procesos de elaboración definidos para cada bebida.
- b) por mezcla de una bebida alcohólica con:
- otra u otras bebidas alcohólicas;
 - alcohol etílico potable de origen agrícola y/o destilado alcohólico simple;
 - una o varias bebidas fermentadas y,
 - una o varias bebidas

Las bebidas alcohólicas con graduación alcohólica superior a 15% podrán también ser denominadas "bebidas alcohólicas espirituosas". [4]

1.4 WHISKY.

El C.A.A. define whisky o whiskey como: “el aguardiente obtenido de la destilación especial de mostos fermentados de cereales, añejado (madurado) en recipientes de roble o de otra madera adecuada. Su grado alcohólico no será inferior a 40 % vol. a 20°C; su residuo seco no será mayor de 0,25 g por 100 mL; su acidez máxima será equivalente a 1,0 mL de álcali normal por 100 mL y acusará un mínimo de congéneres de 0,6 g por litro. Para librarse al consumo deberá añejarse como mínimo durante 2 años. Podrá ostentar los calificativos Añejo, Reserva y otros similares.” [4]

A continuación se muestran las definiciones legales de whisky en los principales países productores:

Whisky Escocés: debe elaborarse conforme a los estándares de la Orden del Whisky Escocés de 1990 que ordena que el licor:

- Debe de ser procesado en una destilería escocesa con agua y cebada malteada, a la que se le pueden añadir otros cereales, y hayan sido procesados en la destilería siendo una harina, convertidas en un sustrato fermentable sólo por enzimas endógenas, y ser fermentada sólo por adición de levadura (*Sacharomyces cerevisiae*),
- Sea destilado con un grado de 94,8° de alcohol por volumen, de forma que conserve aún el sabor de los ingredientes de la producción,
- Que envejezca en barricas de roble con una capacidad no superior a 700 litros, en Escocia no menos de tres años, y
- No puede contener otras sustancias añadidas que no sean agua o caramelo como colorante. No pueden ser embotelladas con menos de 40 grados de alcohol por volumen.

No puede elaborarse otro tipo de whisky distinto al escocés en Escocia. [5]

Whisky Irlandés: debe ser destilado en alambiques en Irlanda a partir de una mezcla de granos de cereales, normalmente producidos en el mismo país, y sacrificada mediante una diastasa de cebada malteada. Maduración mínima de 3 años. [1]

Whiskey Norteamericano: « Rye whisky», « Bourbon whisky», « Wheat whisky», « Malt whisky», bebidas destiladas no superior a 160° Prof. USA a partir de una mezcla fermentada que contiene no menos de 51 % de granos de maíz, centeno, trigo o cebada malteada, respectivamente, y que se almacenan en toneles de madera de roble nuevo y quemado.[1]

1.4.1 Tipos de whisky

En la actualidad se elabora whisky en muchos países y las diferencias radican fundamentalmente en la naturaleza y la proporción de las materias primas utilizadas, el tipo de destilador utilizado y el método de maduración.

- Whisky de malta: es elaborado completamente de cebada malteada y destilado en “pot still”, alambique con forma de cebolla
- Whisky de grano: es elaborado a partir de cebada sin maltear, maíz, centeno y otro tipo de cereales, siendo también posible el malteado. Se suele destilar en “Coffey stills”, alambiques de destilación continua. [6]

Los whiskys de malta y de grano se combinan de diversas formas:

- “Blended”: es una mezcla de whiskys de grano y de malta
- “Blended malt”: es una mezcla de maltas de diferentes destilerías.
- “Single malt”: es aquel whisky elaborado en una única destilería pero que contiene mezcla de whiskys de varios barriles.
- “Cask strength”: es aquel que no recibe ninguna dilución antes de su embotellamiento

1.4.2 Proceso de elaboración de whisky

La figura 1 es un esquema del proceso de producción del whisky. [7] A continuación se explican brevemente las etapas de mayor relevancia:

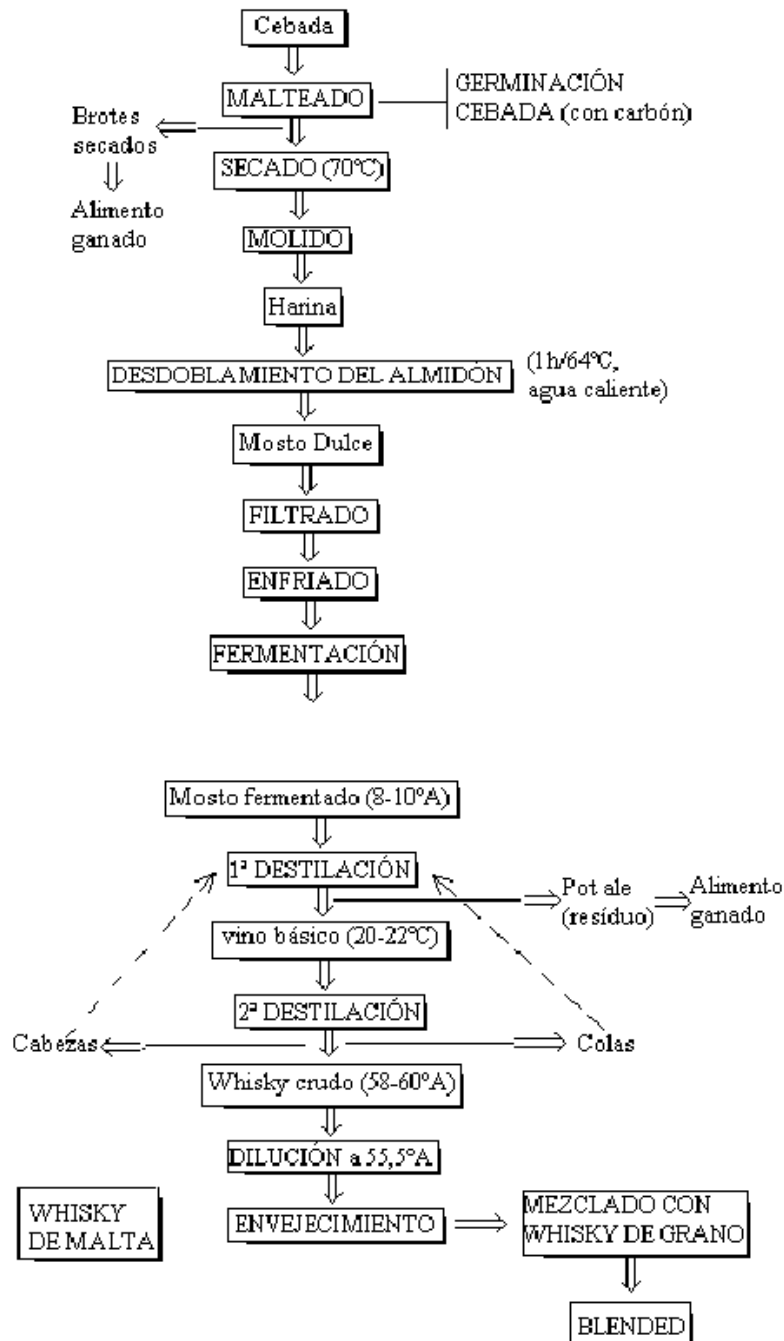


Figura 1. Esquema del proceso de elaboración de whisky.

1.4.2.1. Malteado

Con el objeto de transformar el almidón en azúcares fermentables, la cebada se humedece y se la deja germinar bajo condiciones controladas. Durante el malteado, se producen enzimas (amilasas, β glucanasas, etc.) que hidrolizan materiales de reserva del grano.

Cuando se alcanza el punto de germinación adecuado, se procede al secado. Éste se realizaba tradicionalmente mediante el calor de fuegos de coque y turba, en la actualidad se lleva a cabo de un modo centralizado utilizando hornos de secado. El uso de turba es variable y repercute en el aroma y la calidad del producto final.

1.4.2.2. Fermentación

La fermentación alcohólica constituye un proceso anaeróbico llevado a cabo por levaduras y bacterias que obtienen energía a partir de la metabolización de la glucosa, obteniendo como productos del proceso etanol, dióxido de carbono y otros compuestos, tal como se puede apreciar en la figura 2. [5]

El proceso de fermentación para la obtención de whisky es simple y similar al que se realiza en otras bebidas, aunque cabe destacar algunas características especiales:

- El mosto no se hierve, por lo que la actividad ininterrumpida de las dextrinasas límite hace que aumente la cantidad de azúcares disponibles en la fermentación.
- Las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* que se utilizan en las destilerías se eligen con una alta resistencia al etanol (12- 15%) y con capacidad para hidrolizar oligosacáridos hasta glucosa, consiguiendo una mayor transformación de almidón a etanol.

- Las bacterias ácido lácticas también se encuentran involucradas en las fermentaciones del whisky; no se añaden intencionalmente, sino que proceden del cereal o del ambiente de la destilería. El crecimiento de estas bacterias, que se da en las últimas fases de la fermentación, y se ve favorecido por los compuestos nitrogenados excretados por las levaduras, ocasiona la desaparición de parte de los ácidos cítrico y málico producidos durante el proceso.

Se considera que esta fermentación tardía mejora la calidad del whisky final, aunque los recuentos de bacterias ácido lácticas deben ser cuidadosamente controlados.

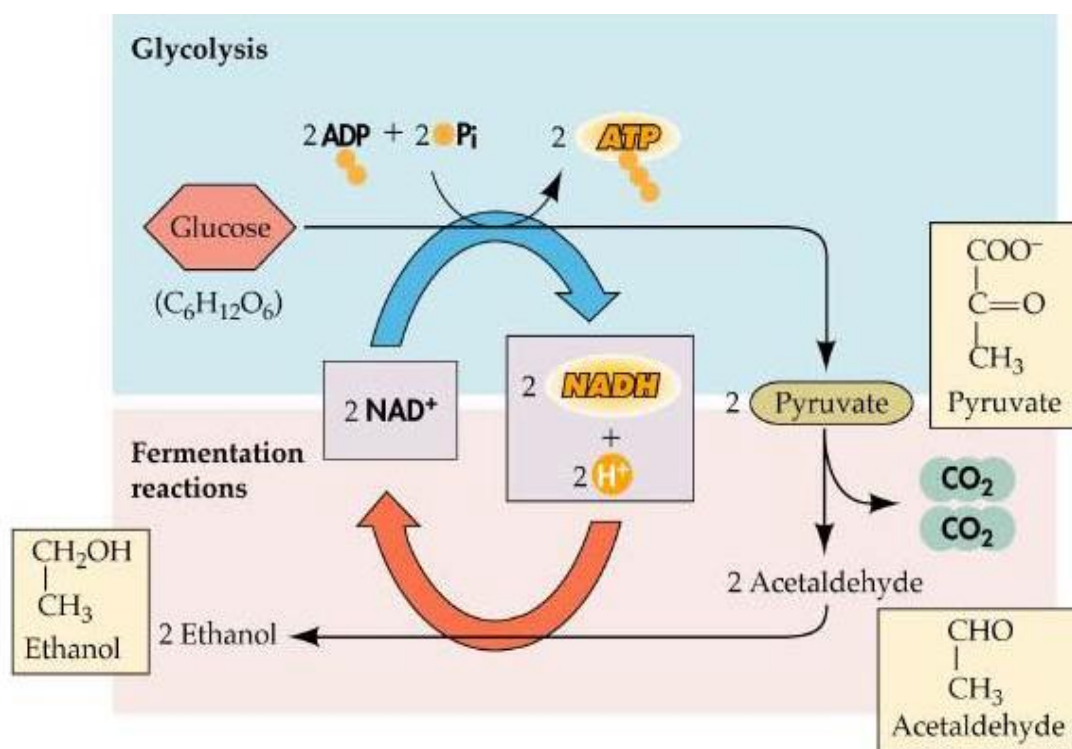


Figura 2. Ciclo de la fermentación alcohólica.

El curso de las fermentaciones es estrictamente controlado con el fin de obtener resultados óptimos en cuanto a homogeneidad, rendimiento alcohólico y disminución de defectos en el whisky final. [1]

1.4.2.3. Destilación

La destilación consiste, en la separación de los componentes de la solución alcohólica obtenida en la etapa de fermentación en función de su volatilidad en el punto de ebullición.

Los whiskys de malta se destilan en los tradicionales alambiques (alambiques con forma de cebolla).

El whisky escocés se destila dos veces, la primera destilación no es selectiva, y en ella se produce una concentración de etanol de tres veces . La segunda destilación requiere alto nivel de control. La primera fracción del destilado son alcoholes de bajo punto de ebullición (alcoholes de cabeza), los cuales se reciclan. En la segunda fracción se comienza a colectar el whisky (60- 65°). Por último se obtienen las llamadas colas de destilación, que también son recicladas.

El whisky de grano se obtiene mediante una destilación en continuo. [1]

1.2.2.4. Maduración

El destilado bruto, se diluye con agua y se trasvasa a toneles para que madure, éstos reposan en almacenes con temperatura y humedades relativas controladas. De acuerdo al tipo de whisky, los toneles pueden ser de roble quemado o no, o haber contenido jerez o Bourbon.

Normalmente, el período de añejamiento* es mas largo del mínimo exigido legalmente de 2 o 3 años.

Durante la maduración tienen lugar una serie de cambios debidos a tres causas:

- Interacciones químicas entre el destilado y la madera,
- Interacción entre constituyentes del destilado,
- Extracción física de compuestos de la madera

** El CAA define Añejamiento/Envejecimiento: Es el proceso en el cual se desarrollan naturalmente, en recipientes de roble u otras maderas apropiadas, de capacidad no superior a 700 litros, ciertas reacciones fisico-químicas que confieren a la bebida alcohólica cualidades organolépticas propias del proceso.*

1.4.3 *Química del whisky*

Como en la mayoría de las bebidas destiladas, son los alcoholes superiores los que revisten mayor importancia en el sabor y el aroma del whisky, existiendo una gran variación cuantitativa dependiendo del tipo de whisky. En general, los niveles aumentan con la maduración. Típicamente, el whisky contiene altos niveles de alcohol isoamílico y alcohol amílico ópticamente activo, acompañados por niveles menores de isobutanol y 1-propanol.

El principal ácido del whisky, es el acético, que supone un 50- 95 %. Éste, se forma principalmente a partir de la oxidación del etanol, en la cual el acetaldehído es un compuesto intermediario. La mayor parte del ácido acético formado se produce en los primeros seis meses de maduración y a partir de ese momento su nivel se reduce debido a que reacciona con el etanol para formar acetato de etilo. Los ácidos grasos minoritarios más importantes son el cáprico, caprílico y láurico.

El acetaldehído, es el compuesto carbonílico presente más importante y también se encuentran otros aldehídos de cadena corta. Entre éstos, el furfural que es un compuesto muy importante en el aroma ya que confiere una característica a cereal o a grano.

Los azúcares, tanto pentosas como hexosas, así como el glicerol tienen un papel de congéneres. Se cree que la arabinosa, galactosa, ramnosa y xilosa se forman a partir de la degradación de la hemicelulosa de la madera.

El glicerol lo producen las levaduras durante la fermentación, pero una fuente mas importante es la regradación de los triglicéridos procedentes de la madera, probablemente durante el quemado. [1]

1.5 AUTENTICIDAD DE BEBIDAS ALCOHÓLICAS

La autenticidad de los alimentos y bebidas es un tema de vital consideración en la actualidad, dado que con frecuencia se dan a conocer noticias relacionadas con fraudes alimentarios.

Las adulteraciones de bebidas alcohólicas ocurren principalmente en fábricas ilegales y establecimientos de ventas como bares y restaurantes, y afectan no solo la credibilidad de los productores, sino también la satisfacción de los clientes y en ocasiones hasta la salud de los mismos. [8]

La falsificación se produce sobre todo en las bebidas de alto valor comercial, como los whiskys importados. Sin embargo, otro tipo de bebidas también son susceptibles, porque a pesar de tener menor valor agregado, su consumo es elevado. [9]

Las estrategias tradicionales se basan generalmente en el análisis químico donde se determinan uno o varios parámetros; como concentración de congéneres, elementos traza, etanol, y se comparan con los valores establecidos de acuerdo con la procedencia y las normas vigente. Sin embargo, estos parámetros de los alimentos pueden ser función de muchos factores, haciendo más difícil evaluar si el alimento es genuino. Es obvio entonces, que estos métodos no resultan suficientes para lograr una identificación segura del producto. [10] Por tanto, la estandarización, el monitoreo de la calidad y el reconocimiento de adulteraciones en bebidas son aspectos de interés tanto para las industrias productoras como para los entes controladores.

Desde hace algunas décadas, se han aplicado numerosas técnicas analíticas para garantizar la calidad y autenticidad en alimentos. A continuación se exponen las principales así como qué parámetros se determinan y en qué tipo de bebidas. [11]

Tipo de Análisis	Técnica Analítica	Tipo de bebida	Parámetro Analizado
Caracterización de bebidas alcohólicas [12- 15]	Espectroscopías Infrarroja Cercana y Raman (No invasivas)	Whiskys, vodkas y bebidas alcohólicas dulces	Porcentaje de etanol
	Espectroscopía Raman	Tequila	Contenido de etanol
	Espectroscopía infrarroja cercana (Reflectancia) y Espectroscopía infrarroja media con transformada de Fourier	Vinos	Monitoreo analítico en fábricas de vinos
Autenticación de bebidas [16- 22]	Cromatografía de gases de espacio de cabeza	Whisky Irlandés	Alcoholes superiores
	Microextracción en fase sólida	Whisky	Crear huella dactilar
	Espectroscopía infrarroja cercana	Whisky, Brandy, Ron, Vodka	Adulteración por adición
	Espectroscopía infrarroja cercana y visible	Tequila	Autenticidad
	Cromatografía de gases y espectrometría de masa por isótopos estables	Tequila	Diferenciación entre tequilas de agave puro de otros
Control de calidad y	Métodos cromatográficos y	Tequila	Detección de tequilas

detección de origen	espectroscópicos		auténticos
[23- 29]			
	Quimiometría	Vinos	Adulteración
	Lengua electrónica multisensor	Vodka, etanol para la producción de vodka	Adulteración
	Efecto Schlieren (índices de refracción)	Bebidas alcohólicas	Adulteración
	Cromatografía de gases y espectrometría de masa , espectrometría ultravioleta	Vodka, Ginebra, Coñac, Whisky	Autenticidad
	Autentificador de marcas basado en espectros de absorbancia	Whisky escocés	Detección de marcas diferentes
	Espectroscopía de plasma acoplado inductivamente (ICP)	Bebida destilada chipriota “Zivania”	Detección de origen mediante análisis de Mg, Zn y Cu

Tabla 1. Principales técnicas analíticas utilizadas en autenticación de bebidas, parámetros que se determinan y bebidas en que se aplican.

1.6 HERRAMIENTAS DE CALIBRACIÓN MULTIVARIADA

El empleo de herramientas multivariadas ha sido, y es, un aspecto de gran importancia y un aporte consecuente en el estudio de la Química Analítica. Los primeros estudios realizados por Bruce Kowalsky y Svant Wold en la década del '80, fueron los precursores y sentaron precedentes en el tema.

A partir de entonces, el desarrollo de nuevas metodologías multivariadas ha tenido un crecimiento relevante, sobre todo a partir de 1990 con el desarrollo de nuevas tecnologías en programas y sistemas de computación. Hoy en día en todo el mundo surgen nuevos trabajos referidos a calibración multivariada para diferentes tipos de muestras y analitos de interés.

En la actualidad, la calibración multivariada es utilizada como herramienta no solo en Química Analítica, sino también su empleo se extiende a otras disciplinas como la economía (econometría), biología (biometría) y diseño de fármacos (QSAR de su sigla en inglés *Quantitative Structure Activity Relation*) [30].

Los métodos de análisis multivariado utilizados como herramientas de clasificación de grupos son:

- Análisis de Componentes Principales (PCA de *Principal Component Analysis*).
- Análisis de Agrupamientos (CA de *Clusters Analysis*)
- Análisis Discriminante Lineal (LDA de *Linear Discriminate Analysis*)

La utilización de Análisis de Componentes Principales (PCA), es una poderosa herramienta que permite evaluar los resultados analíticos, a fin de hallar posibles propiedades ocultas, como así también relaciones entre las variables bajo estudio.

En muchos trabajos recientes, el análisis de datos por PCA fue utilizado de manera exitosa en muestras de mieles, empleando como variables de estudio la concentración de elementos metálicos y parámetros fisicoquímicos. Este aspecto resulta relevante para la posibilidad de clasificar grupos de individuos (muestras) basados en la composición química de las mismas, como así también descifrar fenómenos ocultos en el conjunto de datos de las variables.

El descubrimiento de estas propiedades ocultas, puede permitir la discriminación de subgrupos de muestras, debiendo el analista deducir, a partir de su experiencia y conocimiento del sistema bajo estudio, cual es esa propiedad oculta. Una de las aplicaciones mas importantes del PCA es hallar la clasificación geográfica de una serie de muestras de distinto origen siendo la discriminación geográfica la propiedad oculta.

En PCA, se utilizan los datos de composición analítica de una serie de muestras de interés, para luego clasificarlas de manera multivariada, a fin de poder agruparlas en base a propiedades que se hallan ocultas dentro de los datos analíticos iniciales.

El análisis e interpretación por medio de PCA, involucra la confección de modelos matemáticos basados en los datos analíticos, en los cuales se puede observar si existe discriminación en base a propiedades de las muestras, como así también una interpretación cualitativa de las mismas. Es en este terreno, donde PCA ha adquirido relevancia como herramienta de clasificación aceptada mundialmente. Estos modelos, se obtienen utilizando herramientas computacionales asequibles en el mercado.

Dos herramientas importantes y complementarias a PCA son: el Análisis Discriminante Lineal (LDA) y el Análisis de Agrupamientos o Análisis de Clusters (CA). El primero, obtiene modelos a partir de un sistema de ecuaciones lineales (ecuaciones o funciones discriminantes).

El segundo, es un método que si bien no permite realizar una evaluación detallada del modelo como PCA, puede brindar información tan importante como PCA y ser una herramienta de clasificación complementaria.

El número de posibles aplicaciones de modelado predictivo es virtualmente ilimitado. La mayor aplicación actual se centra en el área de la química analítica, sobre todo en el desarrollo y aplicación de modelos de calibración con fines cualitativos (PCA, CA y LDA) y cuantitativos (MLR, PLS).

En el primer caso, la búsqueda se orienta al hallazgo de propiedades ocultas, mientras que en segundo caso, la aplicación mas importante es la determinación simultánea de la concentración de varios analitos en una mezcla multicomponentes; donde se puede elegir la metodología mas adecuada a partir de un gran arsenal de métodos espectroscópicos como por ejemplo, UV-vis, IR, NIR, XRF, NMR. Por otra parte, el uso de sensores múltiples en línea resulta ser otra posibilidad muy interesante y depende, casi exclusivamente de la aplicabilidad de modelos de calibración multivariada para el monitoreo cuantitativo de los sistemas o procesos de interés.

Por ejemplo, la aplicación de espectroscopía de infrarrojo cercano para analizar pequeñas muestras en sistemas en línea o sistemas discontinuos, ha encontrado un uso extendido en las industrias químicas y en las industrias de alimentos. La metodología es útil para caracterizar e identificar propiedades de productos relacionadas a su composición que por metodologías clásicas puede resultar costoso, por ejemplo determinación del número de octanos en combustibles, valores de yodo y grado de insaturación en grasas y aceites o cristalinidad de polímeros.

Otras aplicaciones por fuera del campo de la química analítica son la predicción de propiedades farmacológicas o bioquímicas desde parámetros estructurales (QSAR), la comprensión de perfiles sensoriales y organolépticos desde datos fisicoquímicos en investigaciones de alimentos y la obtención y uso de modelos a partir de datos ambientales [31].

La calibración multivariada puede estimular el desarrollo de nuevo instrumental analítico, a través de la incorporación adecuadas herramientas computacionales multivariadas a nuevos equipos, como así también incrementar la capacidad analítica y la precisión de los instrumentos tradicionales actuales.

La aplicación de metodologías de calibración multivariada al tratamiento de datos analíticos requiere que el analista conozca de los fundamentos matemáticos, como así también del sistema analítico de estudio, para que en conjunto los resultados sean comparables con otras metodologías.

1.6.1 Fundamentos matemáticos del PCA

El PCA es un procedimiento de modelado que estima simultáneamente los factores subyacentes en una matriz de respuestas inicial, definida por una serie de datos analíticos surgidos en un número determinado de muestras. La examinación minuciosa del espacio fila en una matriz de datos, en donde cada fila representa el conjunto de propiedades de una muestra, es una manera efectiva de investigar la relación entre ellas. Sin embargo, sin un adecuado programa de análisis, esto puede ser factible siempre que el número de variables analizadas (columnas) sea menor que tres (espacio tridimensional).

PCA realiza una manipulación matemática de la matriz de datos, donde la meta es representar la variación presente en algunas variables, utilizando un pequeño número de componentes principales o factores. Se construye un nuevo espacio fila, en los cuales se pueden graficar las muestras, utilizando un nuevo espacio definido por los componentes principales.

Estos nuevos ejes, componentes principales, permiten al analista probar la matriz de datos y poder observar la naturaleza multivariada de los mismos, en un número reducido de dimensiones, correspondientes al espacio de los componentes principales. Con esta nueva visión, el químico analítico puede reconocer el modelo e identificar estructuras en los datos.

El análisis de componentes principales puede ser mejor entendido usando un ejemplo con tres variables. Con solo dos variables es posible graficar el espacio fila sin la necesidad de reducir el número de variables. Esto no es de utilidad en PCA, pero sirve como ejemplo práctico. En un gráfico de tres variables, como el de la figura 2, se representa el funcionamiento del PCA en términos generales para hallar los componentes principales o factores.

En la figura 2, se observa claramente como opera PCA para obtener un modelo a partir de una nube de puntos tridimensional. Se puede observar que el primer componente principal (CP1), tiene la dirección hacia la máxima elongación de la nube de puntos en las tres dimensiones del ejemplo (variables respuesta originales), definida por la matriz de covarianzas del sistema. El segundo componente principal (CP2), tiene la dirección de la segunda mayor elongación de la nube en las tres dimensiones, ortogonal al CP1.

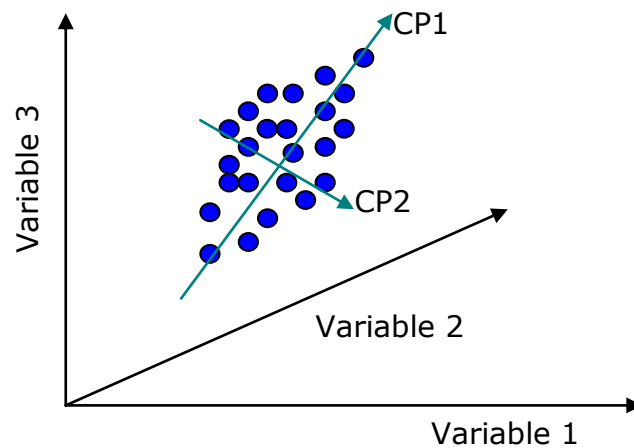


Figura 3. Dirección de los componentes principales a partir de una nube de puntos tridimensional.

Cada componente principal que, subsecuentemente surja en n dimensiones, será ortogonal a los anteriores, por lo que se generará un nuevo sistema de ejes cartesianos que se orientará hacia donde exista la mayor elongación de la nube de puntos y por ende, la mayor información del sistema. Por otra parte, se produce una sustancial reducción de variables ya que, como se aprecia en el gráfico, dos componentes PLS modelan a las tres variables originales y esto se hace más notorio en espacios n dimensionales con n variables con una reducción a unos pocos componentes principales.

La expresión matemática que explica el funcionamiento del PCA se muestra en la ecuación 4

$$\mathbf{R} = \mathbf{U}\mathbf{S}\mathbf{V}^T$$

Ecuación 4. Descomposición matricial en valores singulares

Donde **R** es la llamada matriz de respuestas, que contiene los valores de las variables originales; **U** es la llamada matriz de scores donde están contenidas las coordenadas de las variables originales proyectadas sobre los nuevos componentes principales; **V** se denomina matriz de loadings y contiene la información referida a la vinculación entre las medidas originales con los componentes principales; por último **S** es una matriz diagonal, que posee ceros salvo en la diagonal, brinda información acerca de la varianza de cada componente principal.

En términos descriptivos, el gráfico de scores (o sea, proyección de las variables originales sobre los componentes principales) mostrará el comportamiento de cada muestra respecto a ellos. La ubicación de cada muestra dependerá de sus características. Si existen subgrupos de muestras con diferentes características entre sí, este gráfico permitirá observar dichas diferencias y de esa forma generar una clasificación.

Por otra parte, el gráfico de loadings, describirá el comportamiento de las propias variables originales en los componentes principales. Esto significa que aquellas variables que posean fuerte influencia sobre los PC, se hallaran ubicadas en el gráfico alejadas del cero, mientras que si su influencia es escasa o nula se encontrarán cerca de él.

En último término, la matriz de varianza determinará el grado de dispersión de los datos originales sobre los componentes principales. Esta dispersión, puede deberse tanto a la variabilidad de los datos originales como a una dispersión que puede ser causada por una incorrecta selección de variables y número extremadamente alto de componentes principales.

Existen una serie de algoritmos que pueden ser usados para calcular los loadings y scores en PCA. El mas comúnmente empleado es el llamado *descomposición de valores singulares* [31].

1.6.2 Estimación de un modelo PCA.

Como ya se comentó, en un modelo PCA resulta de interés el estudio de relaciones entre las muestras en el espacio fila; las distancias entre las muestras son usadas para definir similitudes y diferencias. En términos matemáticos, la meta de un modelo PCA es describir la dispersión de la variación usando la menor cantidad de dimensiones que sea posible.

El modelo en PCA es obtenido mediante un adecuado análisis de los datos, incluyendo procesamientos previos al uso de PCA, tales como suavizados de señales por algoritmos de Fourier, Savinsky-Golay, etc.

A fin de estimar el número de componentes principales a utilizar, se puede emplear como herramienta básica un gráfico de porcentaje de varianza explicada, como el que se muestra en la figura 3, donde se observa el porcentaje de varianza explicada acumulativa en función del número de componentes PCA. Se puede apreciar en él que existe una tendencia máxima a partir de la componente número 3 (en el ejemplo hipotético), lo que significa que el modelo está utilizando un alto porcentaje de información de los datos originales a partir de la componente 3 [32-33]. El uso de un mayor número de componentes sería erróneo, ya que la información contenida en ellos puede incorporar errores del sistema en vez información útil. Otros parámetros a evaluar en el modelo son el gráfico de loadings, el gráfico de scores, los resultados de la validación del modelo y los gráficos de residuales.

El modelo es obtenido a partir de un determinado número de muestras, las cuales serán el objeto de estudio. Generalmente, el modelo es obtenido por validación cruzada o cross validación.

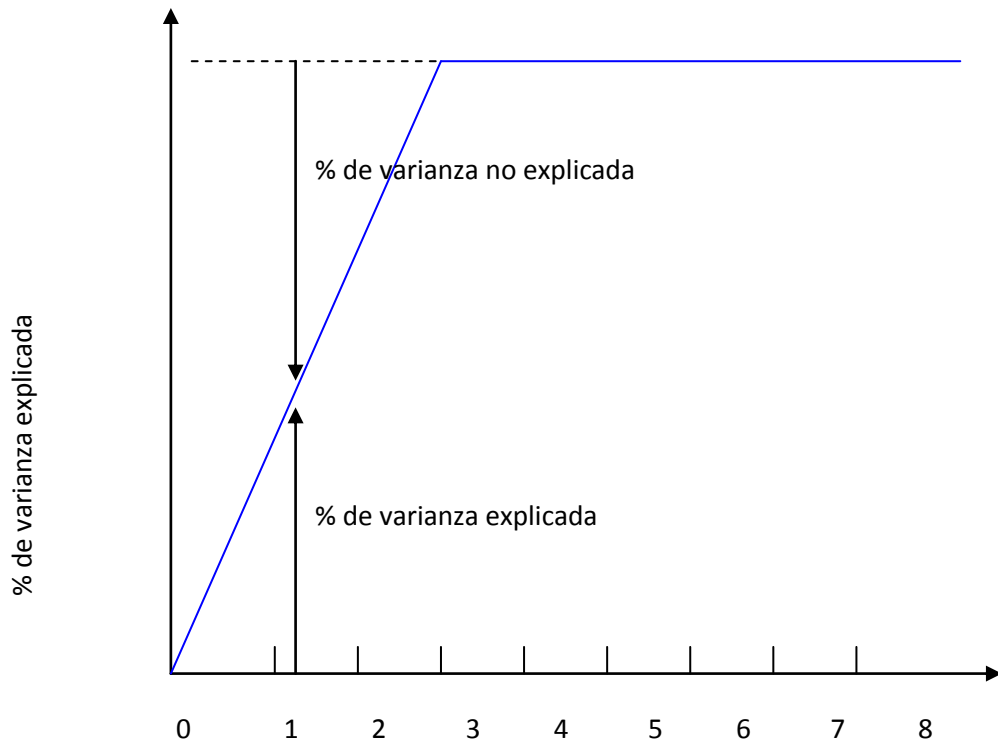


Figura 4. Porcentaje de varianza explicada en función del número de componentes PCA.

1.7 ANÁLISIS MULTIVARIADO Y AUTENTICIDAD DE LAS BEBIDAS ALCOHÓLICAS.

Existen numerosos estudios reportados en la literatura acerca del uso conjunto de técnicas analíticas y herramientas de clasificación multivariada en el análisis de calidad y autenticidad de bebidas.

En 1998, D. González- Arjona et al. [23] utilizaron cromatografía gaseosa de espacio de cabeza para determinar la concentración de cuatro alcoholes superiores en muestras de whiskys escoceses, irlandeses y americanos. La tipificación y diferenciación se realizó a través del análisis de componentes principales, logrando una clasificación del 94 %.

La espectrometría de masas con ionización por electrospray se usó en conjunto con PCA en muestras de whisky escocés, americano y whisky brasilero. El tratamiento permitió la diferenciación de las muestras de acuerdo al origen y la diferenciación parcial de los whiskys escoceses entre malta y grano. [2]

En un trabajo posterior, que utilizó la misma técnica, se consiguió la clasificación de whiskys escoceses de acuerdo a su marca y su edad. [34]

M .J. C. Pontes et al. 2005 [35] lograron clasificar el 100% de las muestras de bebidas destiladas (whisky, brandy, rum y vodka) y determinaron la adulteración mediante el agregado de agua, etanol y metanol utilizando espectrometría de infrarrojo cercano y análisis de componentes principales y SIMCA.

En 2011, Praveen et al. [36] utilizando también espectroscopía de infrarrojo cercano en combinación con PCA y PLS- DA (análisis discriminante por regresión de cuadrados mínimos parciales) lograron clasificar y diferenciar exitosamente whiskys de la misma marca y distinta edad, y whiskys de la misma marca que fueron madurados en barricas de maderas diferentes.

En varios estudios, se emplea la información obtenida de dos o más técnicas, como espectroscopía de infrarrojo, espectroscopía de fluorescencia y de UV-Vis logrando diferenciar y clasificar exitosamente distintas bebidas como ron y whisky. [8,37,38]

En cuanto al uso de espectroscopía UV- vis en conjunto con herramientas de clasificación multivariada, pueden mencionarse las siguientes publicaciones: en 2010 la técnica se utilizó para la discriminación de tequilas, se consiguió distinguir exitosamente los tipos de dicha muestra mediante PCA. Además el uso de PLS-DA muestra que es posible diferenciar perfectamente entre tequilas 100% agave de los tequilas mixtos. El trabajo hace énfasis en las ventajas de usar el método: preparación simple de la muestra, instrumentación poco sofisticada y la toma y análisis de los datos es relativamente sencillo [39].

En otro trabajo, se usó un analizador flow-batch (análisis de flujo detenido) para determinar, mediante espectroscopía UV-visible, la adulteración con agua y metanol en bebidas destiladas como whisky, vodka, ron y brandy. En el artículo se hace hincapié en que, si bien la espectroscopía UV-vis presenta ventajas frente a técnicas más complejas, posee el inconveniente de la manipulación manual de las muestras en la medición espectral. Para poder sortear esta dificultad se propone el uso de un flow-batch (FBAs). Éste es un sistema que combina el flujo, el batch y el uso de componentes de aproximación. El FABs permite la mezcla, dilución y reacción de manera automática, promoviendo de esta manera la reducción de errores. [40]

CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 MUESTRAS DE WHISKY.

Para llevar a cabo el trabajo, se utilizaron 15 marcas de whiskys de distintas características y orígenes obtenidos en comercios. La Tabla 2 detalla la información extraída de cada una de las etiquetas: marca, origen, tipo, años de añejamiento, graduación alcohólica y características especiales.

Marca	Origen	Tipo	% ol(v/v)	Añejamiento	Descripción/ características
<i>Blenders Pride</i>	Argentina	Blended	40%	3-4 años	Maltas escocesas añejadas mezcladas con whiskys de grano nacionales
<i>Criadores</i>	Argentina	Blended	40%	4 años	Ingredientes: malta escocesa y whisky de granos añejados
<i>Jhonny Walker (Etiqueta roja)</i>	Escocia	Blended Scotch Whisky	40%	6 años	
<i>White Horse</i>	Escocia	Blended Scotch Whisky	40%	6 años	Mezcla de más de 40 whiskys de las zonas de Highland, Lowlands, Islay
<i>J & B</i>	Escocia	Blended Scotch Whisky	40%	8 años	
<i>Ballantine´s Finest</i>	Escocia	Blended Scotch Whisky	40%	menos de 12 años	
<i>J & B (12 años)</i>	Escocia	Blended Scotch Whisky	40%	12 años	
<i>Chivas regal</i>	Escocia	Blended Scotch Whisky	40%	12 años	
<i>Grand Old Parr</i>	Escocia	Blended Scotch Whisky	40%	12 años	
<i>Jhonny Walker (Etiqueta negra)</i>	Escocia	Blended Scotch Whisky	40%	12 años	

<i>Glenfiddich</i>	Escocia	SINGLE MALT (pure malt)	40%	12 años	Mezcla de whiskies provenientes de una única destilería
<i>Something Special</i>	Escocia	Blended Scotch Whisky	40%	12 años	
<i>Grant's</i>	Escocia	Blended Scotch Whisky	40%		
<i>Gold Top (Bols)</i>	Argentina		40%		
<i>J & B (15 años)</i>	Escocia	Blended Scotch Whisky	40%	15 años	

Tabla 2. Detalle de las muestras de whiskys analizados.

2.2 PREPARACIÓN DE LAS BEBIDAS PARA LA MEDICIÓN

Con el objeto de obtener la dilución y el pH al cual la absorción en el espectro UV-vis de las bebidas fuese óptimo y se evitasen los errores a la Ley de Lambert-Beer, se realizó un ensayo sobre el whisky “Criadores”. Se determinó la absorción de las diluciones 1/50, 1/25, 1/10, 1/5, 1/2,5, y para whisky puro. Con ello se pudo hallar a la dilución 1/10 como la más adecuada para posteriores ensayos.

Luego, se realizó un ensayo de comportamiento espectral a diferentes pH (1, 3, 5, 7, 9 y 12), utilizando diferentes soluciones reguladoras, elaboradas a partir de la tabla de Clark y Lubs [31] (tabla 3).

Las soluciones fueron preparados en matraces de 50 mL, por el agregado de la bebida (5 mL), el buffer (10 mL) y agua bidestilada (35 mL). Tras la lectura de las absorbancias y análisis de espectro, se resolvió que el pH 12 era el más apropiado.

Se procedió entonces a trabajar con el resto de las bebidas a pH 12 y en una dilución 1/10. Se analizaron seis muestras para cada marca.

pH	Composición	Dilución
1	25 mL KCl 0,2 M + 67 mL HCl 0.2 M	100mL
3	50 mL KH ftalato 0,1 M + 22,3 mL HCl 0,1 M	100mL
5	50 mL KH ftalato 0,1 M + 22,6 mL NaOH 0,1 M	100mL
7	50 mL KH ₂ PO ₄ 0,1 M + 29,1 mL NaOH 0,1 M	100mL
9	50 mL bórax 0,025 M + 2 mL HCl 0,1 M	100mL
12	25 mL KCl 0,2 M + 6 mL NaOH 0,2 M	100mL

Tabla 3. *Composición y valores de pH de soluciones Buffer de Clark y Lubs*

2.3 ESPECTROSCOPIA UV-VISIBLE

El espectro de absorción de cada una de las bebidas fue obtenido con un espectrofotómetro UV-vis de marca Ocean Optics modelo ChemUSB 4000 con detector CDD de arreglo de diodo en línea. Las mediciones se llevaron a cabo entre 178 y 890 nm, obteniéndose una medida cada 0,2 nm. De todo este rango, se consideró únicamente el comprendido entre 200 y 600 nm. Para la medición se usaron aproximadamente 5 mL de la solución preparada, llevándose a cabo en celda de cuarzo y con un camino óptico de 10 mm. En tanto que el blanco para todos los casos fue agua de calidad analítica sin agregado de buffer.

2.4 ANÁLISIS MULTIVARIADO

Los datos obtenidos de las mediciones se colocaron en los programas de análisis correspondientes:

- Programa estadístico multivariado The Unscrambler 6.11 (CAMO AS, Noruega)
- Programa estadístico multivariado InfoStat (Universidad Nacional de Córdoba)
- Programa Multivariado (Universidad Nacional del Sur)

A partir de esto, se logró realizar el análisis de componentes principales (PCA) y el análisis discriminante lineal (LDA).

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 ESPECTROS DE ABSORCIÓN MOLECULAR

Las figuras 5 y 6 muestran los espectros de absorción molecular a diferentes diluciones y diferentes pH para el whisky “Criadores”. Su evaluación permitió seleccionar la dilución 1/10 y pH 12 como adecuados para proceder con el resto de las bebidas, a fin de obtener espectros con valores adecuados de absorbancia.

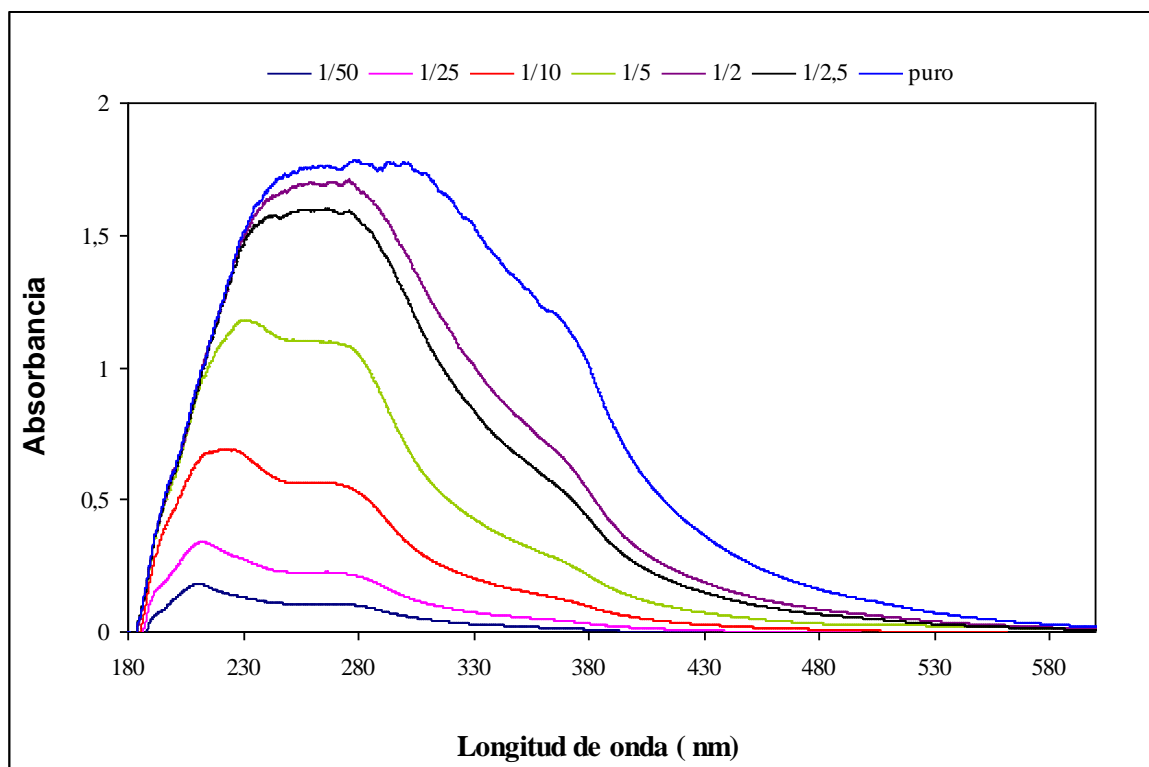


Figura 5. Espectro de absorción a diferentes diluciones. Whisky “Criadores”

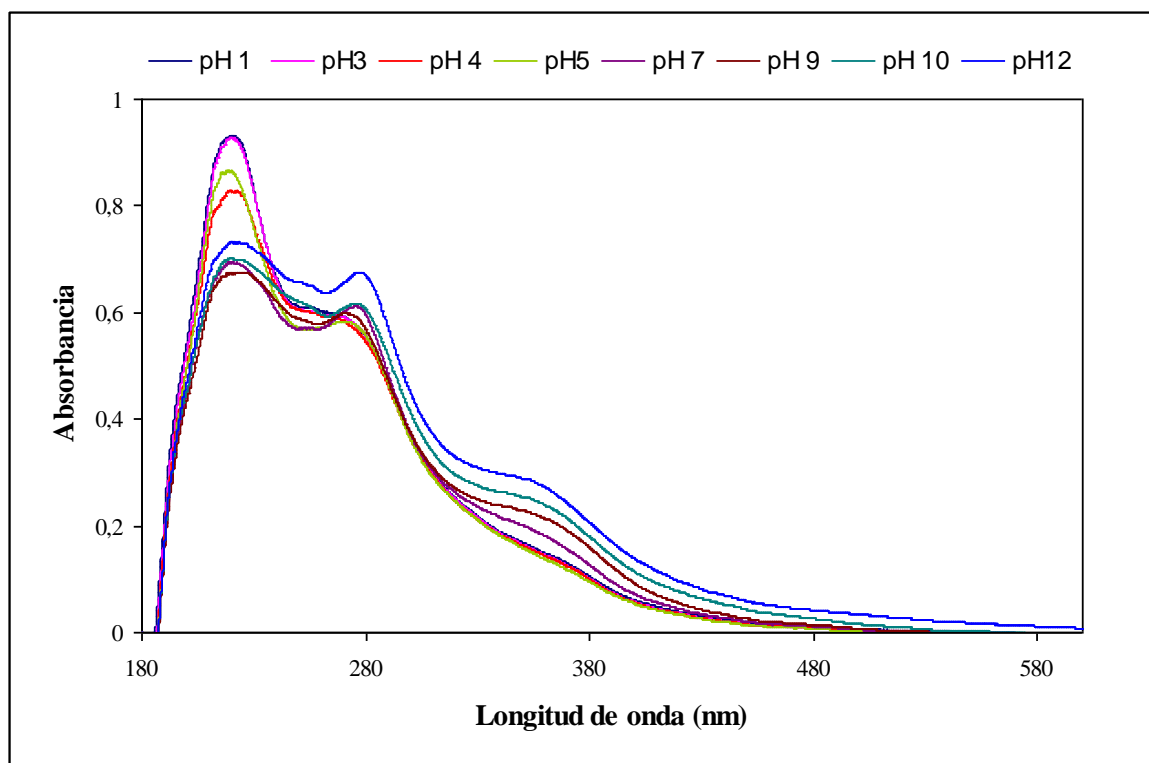


Figura 6. Espectro de absorción a diferentes pH. Whisky "Criadores". Dilución 1/10.

Las figuras 7 y 8 muestran los espectros de absorción molecular para las 6 muestras (en cada caso) de los whiskys "Jhonny Walker" Etiqueta Roja (6 años de edad) y Etiqueta Negra (12 años de edad). Se puede observar que las bebidas presentan máxima absorción alrededor de los 230 y 280 nm, luego ésta comienza a disminuir hasta hacerse nula para longitudes de onda superiores a 600 nm.

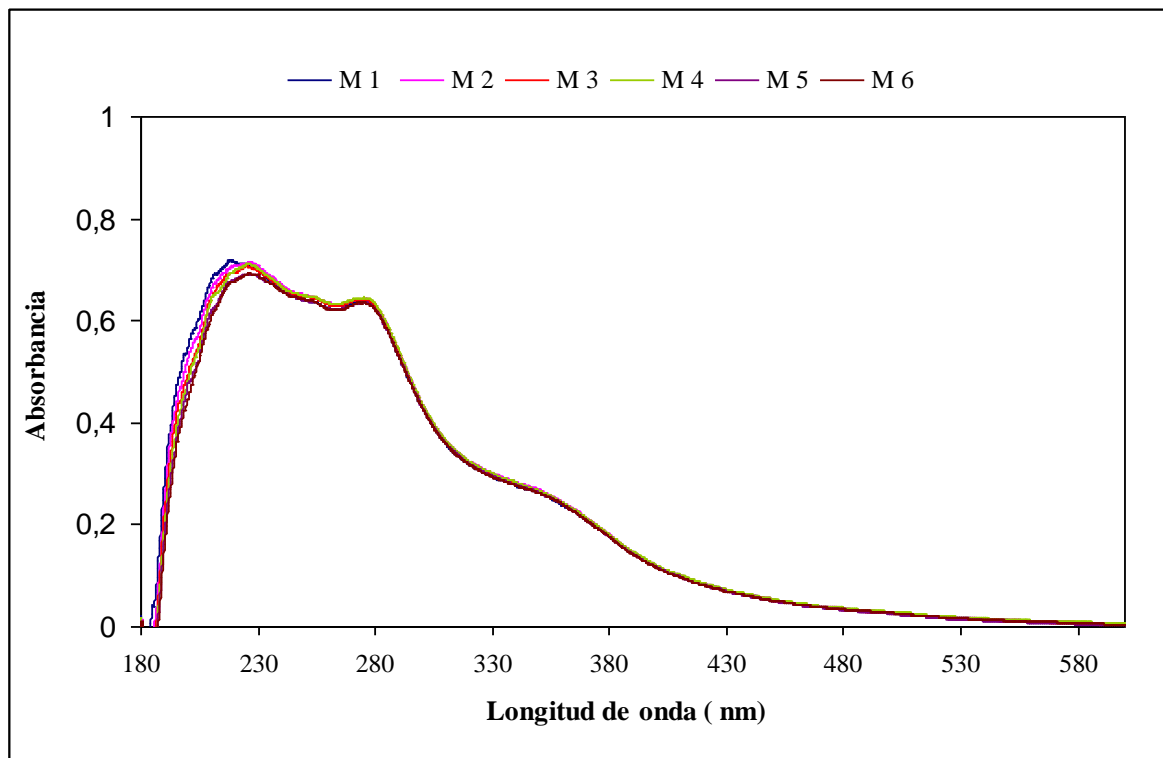


Figura 7. Espectro de absorción. “Jhonny Walker” Etiqueta Roja. pH 12. Dilución 1/10.

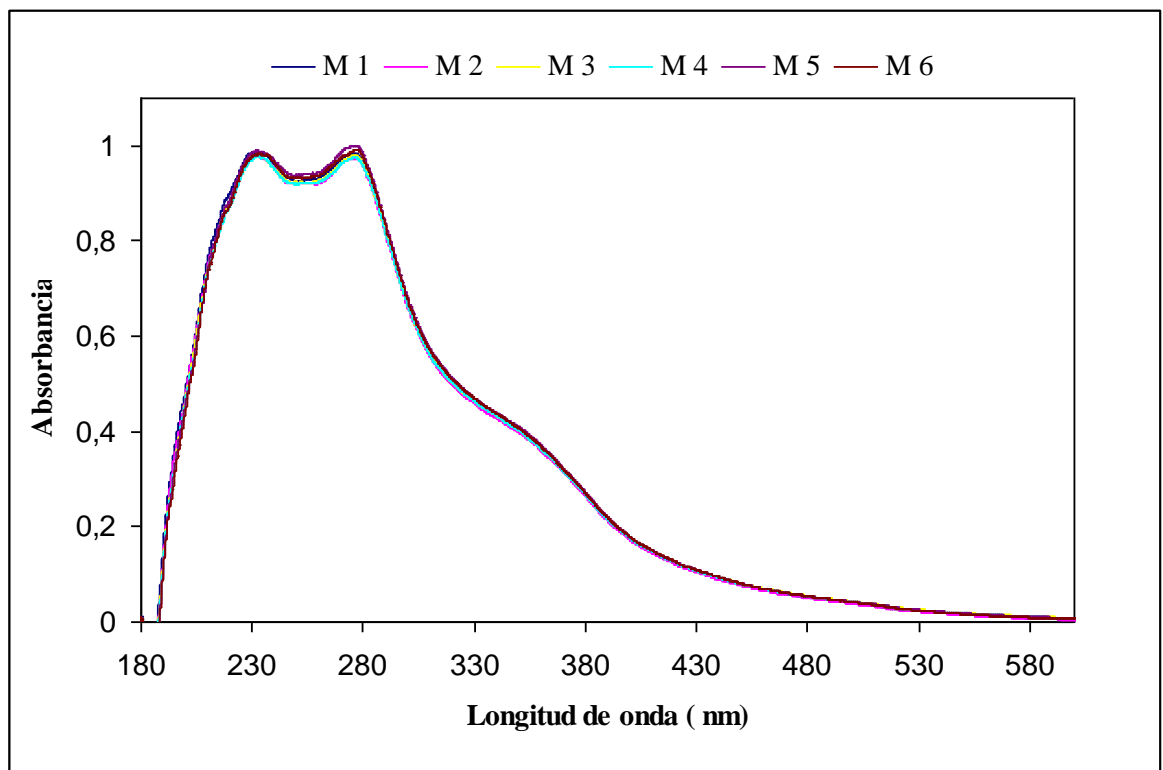


Figura 8. Espectro de absorción. “Jhonny Walker” Etiqueta Negra. pH 12. Dilución 1/10.

En la figura 9 se observan los espectros de absorción superpuestos para las muestras de distinto grado de añejamiento del whisky “Jhonny Walker”, puede notarse que, si bien las bandas siguen la misma forma en ambos casos, existe un claro aumento en la absorbancia de la muestra de 12 años de edad con respecto a la de 6.

Las bandas de absorción presentes en los espectros surgen debido a los componentes de las bebidas (congéneres tales como azúcares, ésteres, alcoholes superiores, aldehídos y cetonas; colorantes; compuestos provenientes de las barricas de guarda). Los componentes mayoritarios del whisky, agua y etanol, no poseen absorción en las longitudes de onda de trabajo, por lo que no se puede determinar la relación agua/etanol a partir de las mediciones llevadas a cabo.

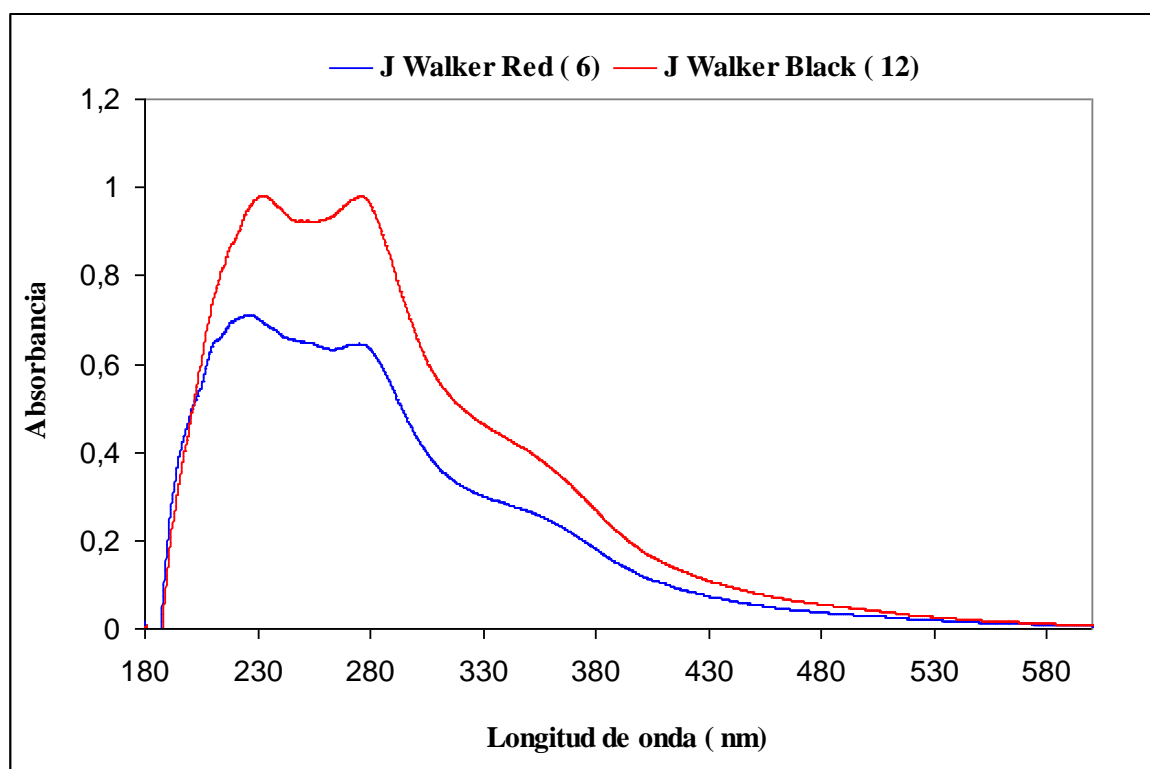


Figura 9. Espectro de absorción. Whiskys Jhonny Walker Etiqueta Roja y Etiqueta Negra.

Las figuras 10, 11 y 12 muestran los espectros de absorción de los whiskys “J & B” de 8, 12 y 15 años de edad, en este caso las bandas también presentan picos de máxima absorción para 210 y 280 nm.

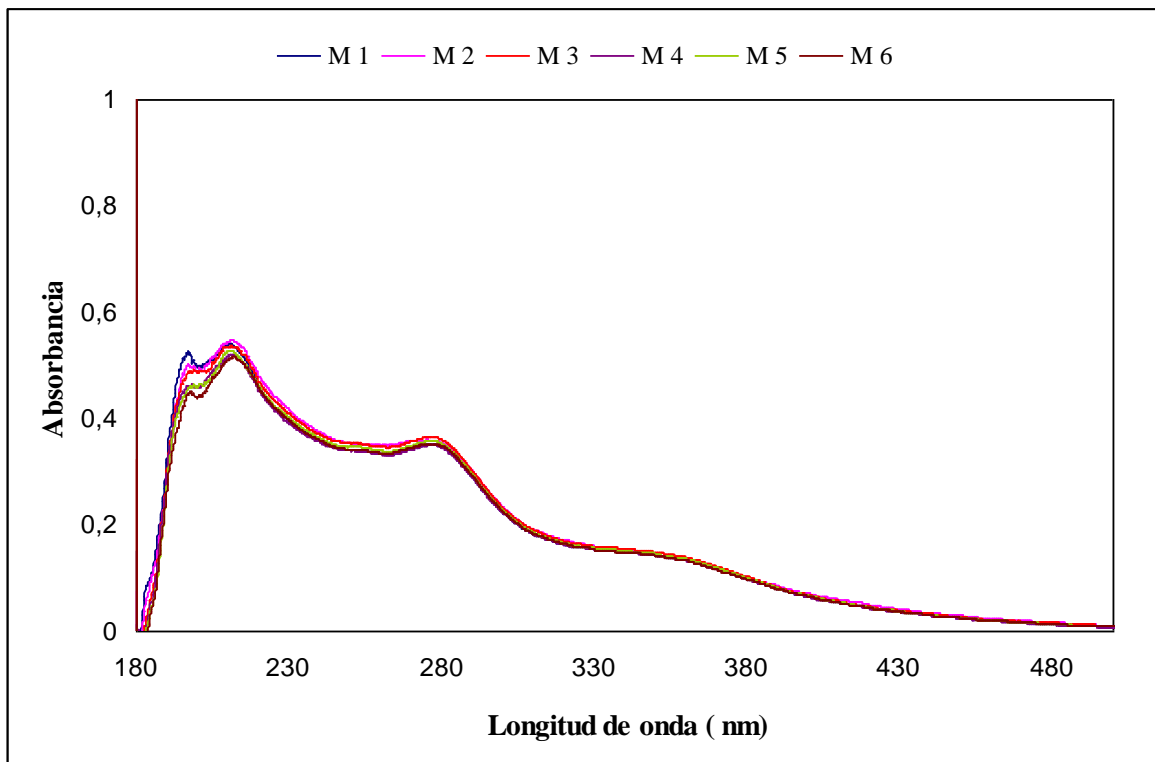


Figura 10. Espectro de absorción. “J & B” 8 años. pH 12. Dilución 1/ 10.

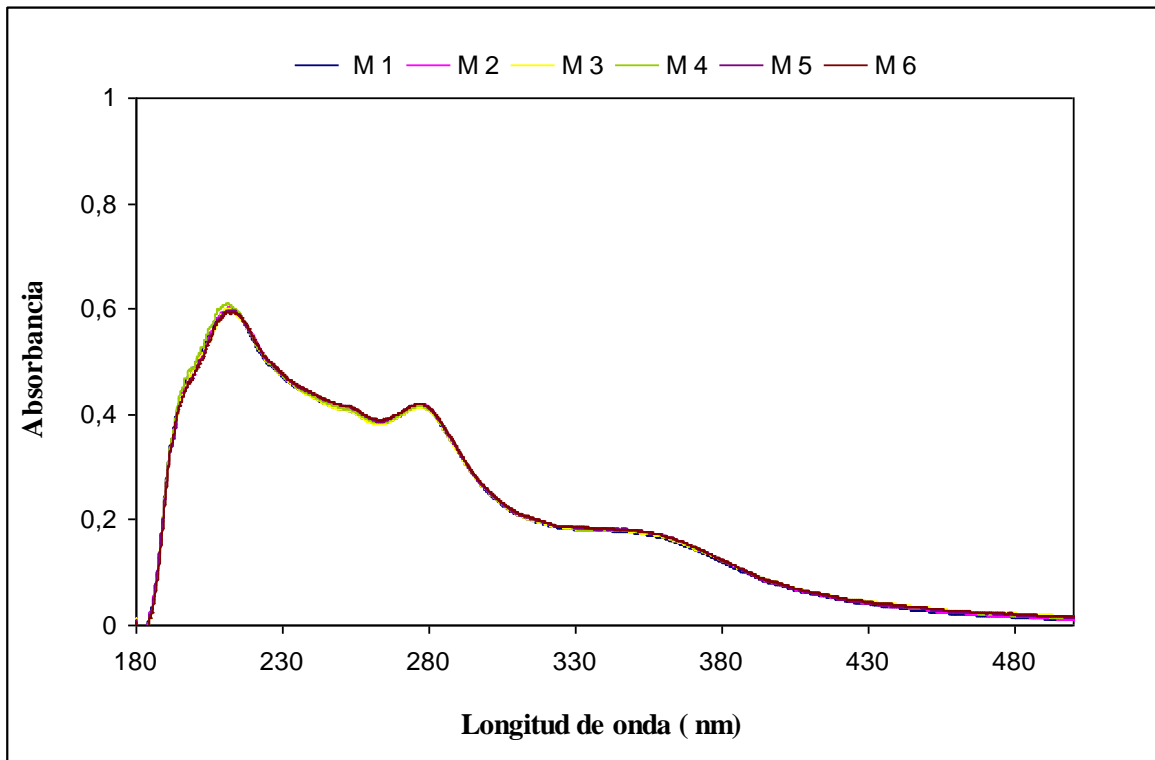


Figura 11. Espectro de absorción. “J & B” 12 años. pH 12. Dilución 1/10.

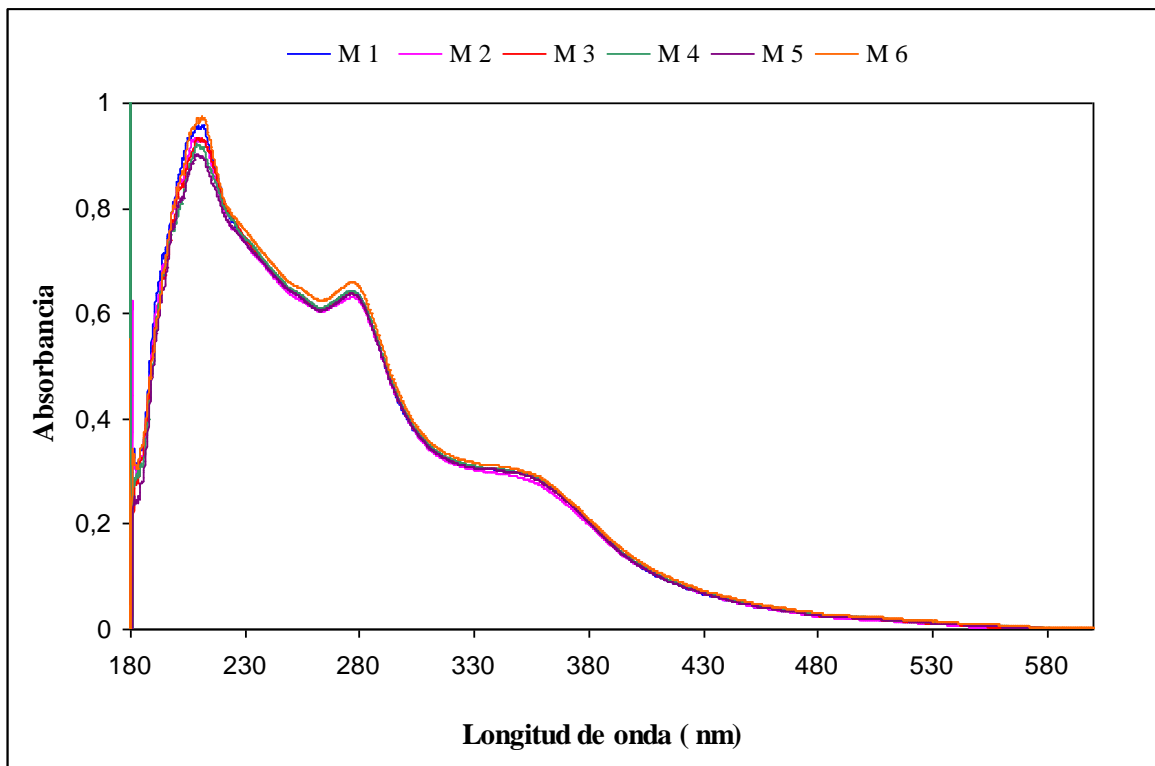


Figura 12. Espectro de absorción. “J & B” 15 años. pH 12. Dilución 1/10.

De forma similar, como se expone en la figura 13 para las muestras de 8, 12 y 15 años de whiskys de marca “J & B” la absorción aumenta a medida que aumentan los años de maduración. Esto puede deberse a que cuanto mayor es el tiempo que la bebida permanece en el barril, mayor va a ser la concentración de los compuestos que se forman durante el proceso de añejamiento.

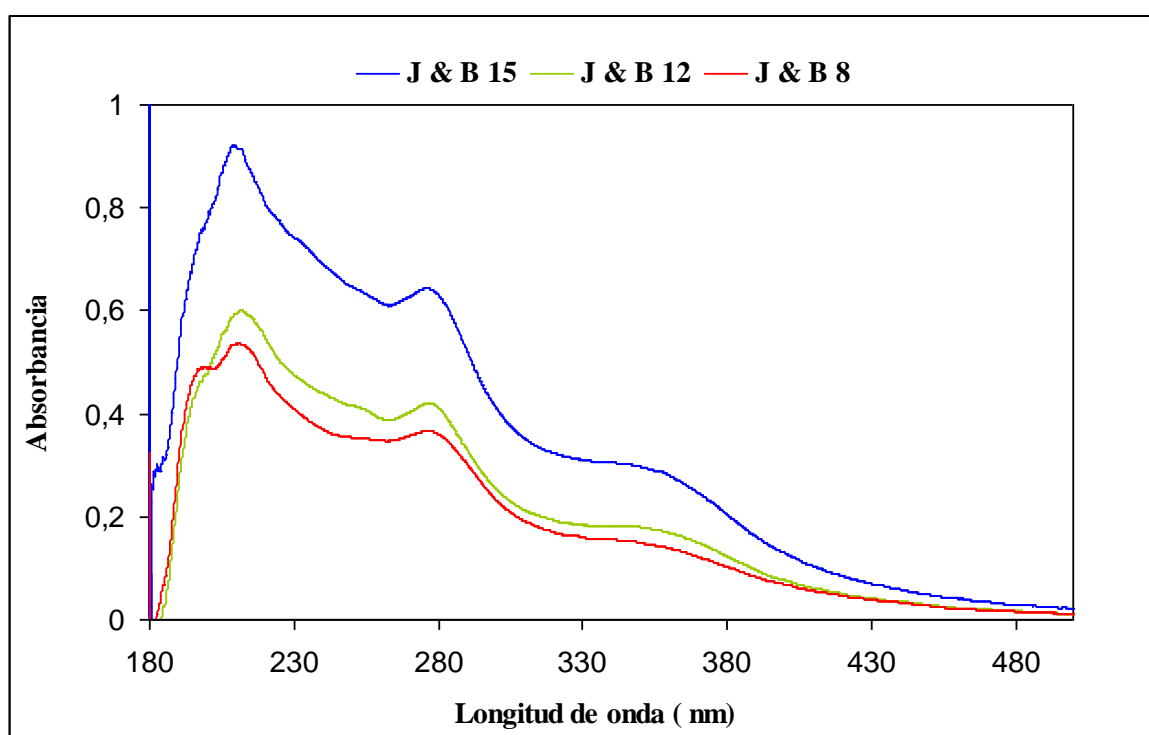


Figura 13. Espectro de absorción. Whiskys “J & B” 8, 12 y 15 años.

Cabe mencionar que si bien se analizaron bebidas del mismo tipo, sus espectros de absorción no son idénticos, debido a la variedad de factores que influyen en el producto final: materia prima, condiciones de elaboración, tiempo de maduración, entre otras.

3.2 ANÁLISIS MULTIVARIADO

3.2.1 *Análisis de componentes principales (PCA)*

El análisis por componentes principales de las muestras, refleja similitud con lo establecido por los espectros obtenidos, siendo esta metodología una técnica no supervisada, ya que no se sabe “a priori”, la formación de posibles grupos, revelando similitudes entre ellos.

Se puede ver en el gráfico de scores (figura 14) la presencia de varios grupos de muestras de los whiskys analizados completamente definidos. Por un lado dos grupos constituidos por los whiskys “Jhonny Walker” de 6 (etiqueta roja) y 12 (etiqueta negra) años de añejamiento y por otro lado tres grupos compuesto por los whiskys “J & B” de 8, 12 y 15 años de añejamiento, estos whiskys fueron clasificados y caracterizados debido su importancia y valor comercial.

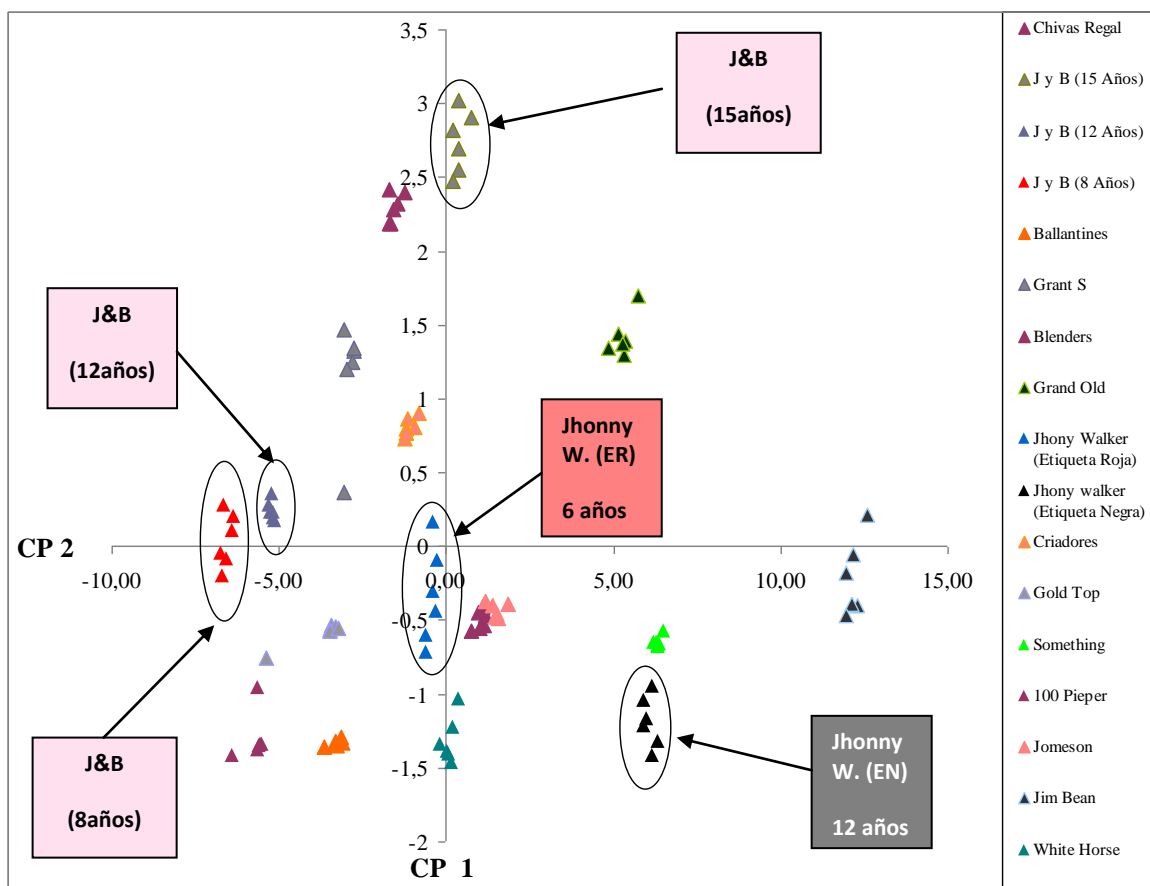


Figura 14. Grafico de scores del modelo PCA.

3.2.2 Varianza explicada

El modelo PCA obtenido requirió solamente tres componentes principales para explicar el 99,86 % de la información inicial relevante del sistema analítico en estudio, siendo el rango óptimo de longitudes de onda espectral de 210,41 a 306,7 nm. Esto se puede observar en la figura 15, donde se detalla el % la varianza explicada en función del número de componentes principales óptimos del modelo PCA.

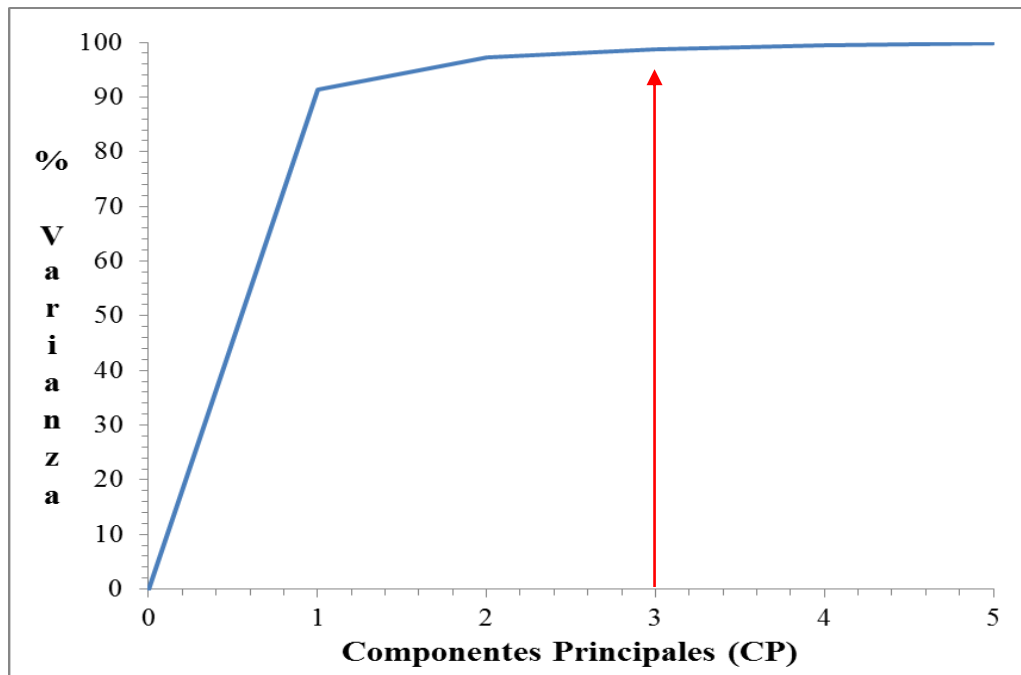


Figura 15. Porcentaje de varianza explicada.

3.2.3 Análisis Discrimínate Lineal (LDA). Funciones Discriminantes

Para construir un modelo de clasificación supervisada como lo es LDA, es necesario disponer de muestras de objetos cuyas clases sean conocidas y que también se conozcan los valores de las variables predictoras.

Estos objetos forman lo que se denomina el "conjunto de entrenamiento" con el cual se construye el modelo de discriminación. Una vez construido, el modelo se utiliza para predecir la clase a que pertenecen nuevos objetos a partir de la medida de la variables predictoras. Es usual utilizar muestras adicionales pertenecientes a clases conocidas, que no forman parte del conjunto de entrenamiento original, para comprobar el modelo y controlar su precisión y exactitud.

El LDA busca hallar funciones lineales (funciones discriminantes) de las variables independientes (objetos) que permitan discriminar individuos en grupos definidos por la variable dependiente (longitudes de onda).

En la etapa de entrenamiento, un grupo o set de muestras son utilizadas para obtener las llamadas *funciones discriminantes o canónicas*. En la etapa de validación, muestras conocidas se predicen a través de las funciones discriminantes a fin de hallar el error de predicción del método.

Si se grafican las primeras funciones discriminantes F1 vs F2 se obtiene un gráfico conocido como gráfico discriminante o gráfico de scores discriminante.

En la figura 16 se puede apreciar el grado de clasificación obtenido empleando análisis discriminante lineal como método multivariado de clasificación supervisado.

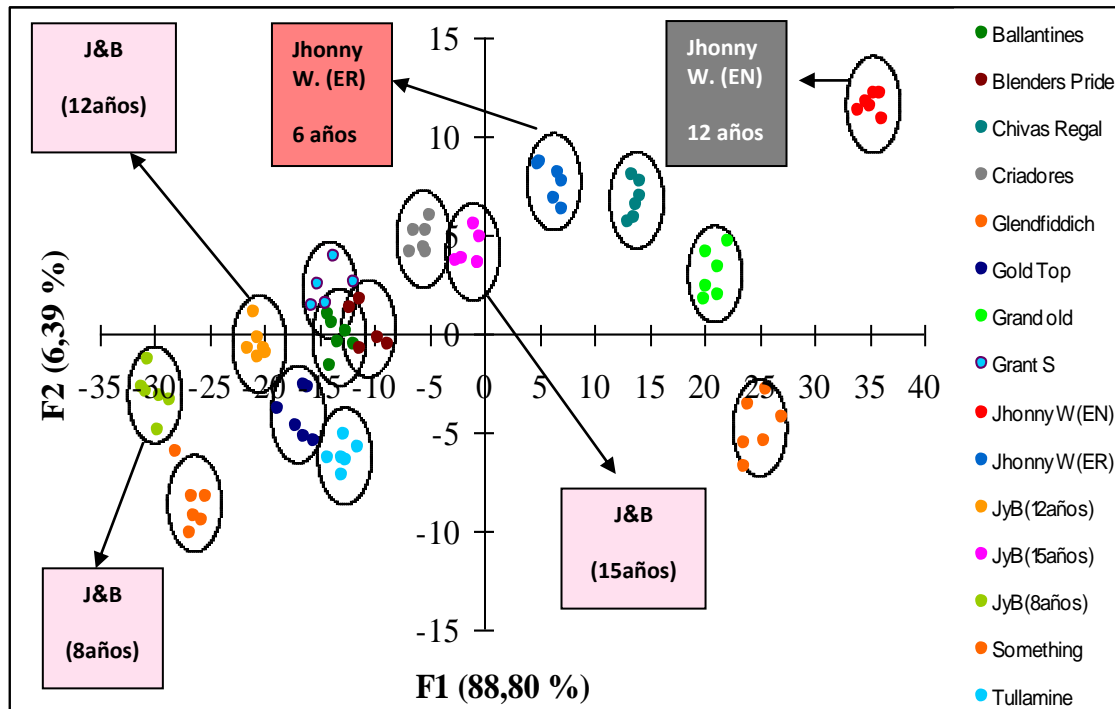


Figura 16. Gráfico de scores discriminante

3.2.4 Análisis Discrimínate Lineal (LDA). Tabla de clasificación cruzada

Como se muestra en la tabla 4, el análisis discriminante lineal fue capaz de discriminar el 100% de 14 marcas comerciales sobre un total de 15; para la marca Glenfiddich, la clasificación fue del 83,33% (5 muestras de 6).

El análisis discriminante lineal confirmo los resultados obtenidos mediante PCA, considerando que el mismo es un método supervisado; a su vez el modelo discriminante permitió una adecuada separación y discriminación de las muestras de whiskys de mejor calidad y mayor costo en el mercado como lo son “Jhonny Walker” (6 y 12 años) y “J&B” (de 8, 12 y 15 años de añejamiento).

En general el modelo multivariado obtenido mediante análisis discriminante lineal resulto altamente satisfactorio considerando el bajo costo del instrumental utilizado.

de \ a	Ballantines	Blenders Pride	Chivas Regal	Criadores	Glendfiddich	Gold Top	Grand old	Grant S	Johnny W (EN)	Johnny W (ER)	Jim Bean	Jomeson	JyB (12años)	JyB (15años)	JyB (8años)	Something	Tullamine	Total	% correcto
Ballantines	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	100,00%
Blenders Pride	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	100,00%
Chivas Regal	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	100,00%
Criadores	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	100,00%
Glendfiddich	0	0	0	0	5	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	83,33%
Gold Top	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	100,00%
Grand old	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	100,00%
Grant S	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	100,00%
Jhonny W (EN)	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	6	100,00%
Jhonny W (ER)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	6	100,00%
JyB(12años)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	6	100,00%
JyB(15años)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	6	100,00%
JyB(8años)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	6	100,00%
Something	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	6	100,00%
Tullamine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	6	100,00%
Total	6	6	6	6	5	6	6	7	6	6	6	6	6	6	6	6	6	101	99,15%

Tabla 4. Tabla de clasificación cruzada

CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se ha realizado de manera exitosa, la clasificación multivariada de diferentes whiskys asequibles en el mercado. Las metodologías analíticas clásicas de control de calidad, requieren de elevados tiempos de análisis y elevado costo, como lo es la cromatografía de gases. En función de lo expuesto, se pueden arribar a las siguientes conclusiones:

- La utilización de absorciometría molecular UV-vis en combinación con herramientas multivariadas tales como PCA y LDA, ha permitido la correcta clasificación y discriminación de cinco grupos de whiskys con diferente grado de añejamiento y consecuente valor comercial.
- Basados en lo anterior, esta metodología resulta de gran importancia para la detección de fraudes de whiskys, considerando el importante mercado mundial existente en términos de exportación de éstas bebidas.
- El modelo discriminante obtenido permitió la correcta discriminación de whiskys de alto valor comercial como: “Jhonny Walker” (6 y 12 años) y “J&B” (de 8, 12 y 15 años de maduración), cuyos precios difieren considerablemente dependiendo de sus grados de maduración y calidad de materias primas.

Por todo lo expuesto, se puede concluir que la metodología propuesta, resulta ser económica, rápida y accesible de implementación inmediata en cualquier laboratorio de control de calidad de bajos recursos, como así también, evita importantes demoras de tiempo, aspecto crucial para una rápida comercialización de productos de importación.

CAPÍTULO 5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Alan, H. Vernam, Jane P. Sutherland. Bebidas: Tecnología, Química y Microbiología. Serie 2 Alimentos Básicos. Acribia, S.A. 1994.
- [2] Revista Virtualpro. Numero 97. Febrero de 2010.
<http://www.revistavirtualpro.com/revista/index.php?ed=2010-02-01&pag=1>
Disponible en Internet: marzo de 2013.
- [3] Hernández, A, Alfaro, I., y Arrieta, R. Microbiología Industrial. Editorial Universidad a Distancia. San José, Costa Rica. 2003
- [4] Código Alimentario Argentino (CAA). Capítulo XIV: Bebidas espirituosas, Alcoholes, Bebidas Alcohólicas Destiladas y Licores.2013.
- [5] Wikipedia, La Enciclopedia de Contenido Libre. Mayo, 2012.
<http://es.wikipedia.org/wiki/FermentacionAlcoholica>. Disponible en Internet: marzo de 2013.
- [6] Scribd.com. Mayo, <http://es.scribd.com/doc/79644947/Capitulo-2-Whisky-Ginebra-y-Vodka> . 2012. Disponible en Internet: marzo de 2013.
- [7] Scribd.com. Febrero, <http://es.scribd.com/doc/6763546/Bebidasalcoholicas>. 2011.
Disponible en Internet: marzo de 2013.
- [8] García Padrón, Y. Facultad Ingeniería Química, ISPJAE, C. Habana. Detección de adulteraciones en bebidas alcohólicas con el uso de Quimiometría.2010.
<http://renia.cujae.edu.cu/index.php/revistacientifica/article/viewFile/86/57>. Disponible en Internet: marzo de 2013.

-
- [9] Nagato, L. Duran, M., Caruso, M., Barsotti, R. and Badolato, E. Monitoramento da autenticidade de amostras de bebidas alcoólicas enviadas ao instituto Adolfo Lutz em Sao Paulo. *Ciencia e tecnologia de alimentos*. 1 (21) 54-62-2001.
- [10] Mac Kenzie, W.M. and Aylott, R.I. Analytical strategies to confirm Scotch whisky authenticity. Part II: Mobile brand authentication. *Analyst*, 129 (7) 607-612. 2004.
- [11] Zayas, P.E., Hernández Sainz, D. Autenticidad de Alimentos y Quimiometría. *Revista Estudiantil Nacional de Ingeniería y Arquitectura*, 1 (4) 311-317. 2010.
- [12] Bellanato, J. and Bravo-Abad, F. Análisis de componentes del brandy por espectroscopía infrarroja. *Revista Agroquímica y Tecnología de los Alimentos*, 28, 379-394. 1988.
- [13] Nordon, A.; Mills, A.; Burn, R.; Cusick, F. Littlejohn, D. Comparison of non invasive NIR and Raman spectrometries for determination of alcohol content of spirits. *Analytica Chimica Acta*, 548, 148-158.2005.
- [14] Frausto-Reyes, C. Qualitative study of ethanol content in tequilas by Raman spectroscopy and principal component analysis. *Spectrochimica Acta Part A* ,61 2657-2662. 2005.
- [15] Urbano-Cuadrado M., Luque de Castro, M. D., Pérez-Juan, P. M., García-Olmo. J. and Gómez-Nieto, M.A. Near infrared reflectance spectroscopy and multivariate analysis in enology Determination or screening of fifteen parameters in different types of wines. *Analytica Chimica Acta*, 527, 81-88. 2004.
- [16] Cozzolino, D., Smyth, H. E. and Gishen, M. Feasibility study on the use of visible and near-infrared spectroscopy together with chemometrics to discriminate between

-
- commercial white wines of different varietal origins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 7703-7708. 2003.
- [17] Kokkinofta, R., Petrakis P.V., Mavromoustakos, T. and Theocharis C.R. Authenticity of the traditional cyprriot spirit "zivania" on the basis of metal content using a combination of coupled plasma spectroscopy and statistical analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (21) 6233-6239.2003.
- [18] Petrakis P. Authenticity of the traditional cyprriot spirit "zivania" on the basis of H-1 NMR spectroscopy diagnostic parameters and statistical analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (13) 5293-5303. 2005.
- [19] Mac Kenzie, W.M. and Aylott, R.I. Analytical strategies to confirm Scotch whisky authenticity. Part II: Mobile brand authentication. *Analyst*, 129 (7) 607-612. 2004.
- [20] Spectroscopic & Analytical Developments. Mayo, 2012. <http://www.spectroscopic.co.uk/brandauthenticator.html>. Disponible en Internet: marzo de 2013.
- [21] Savchuk, S.A. Application of Chromatography and Spectrometry to the Authentication of Alcoholic Beverages. *Journal of Analytical Chemistry*, 56 (3) 214-231. 2001.
- [22] Lee, M.K.Y.; Paterson, A.; Birkmyre, L. and Piggott, J. Headspace congeners of blended scotch whiskies of different product categories from SPME analysis. *Journal of the Institute of Brewing*. 4 (107) 315-331. 2001.
- [23] González-Arjona, D. González-Gallero, V. Pablos, F. González, A. G. Authentication and differentiation of irish whiskeys by higher-alcohol congener analysis. *Analitica Chimica Acta*, 381 (12) 257-264. 1999.

-
- [24] Møller, J. K. S. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of whisky: immediate proof of origin and authenticity. *Analyst*. (130) 890-897. 2005.
- [25] Aguilar-Cisneros, BO. López, M. Richling, E. Heckel, F. and Shreier, P. Tequila authenticity assessment by headspace SPME-HRGC-IRMS analysis of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ and $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ratios of ethanol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 24 (50) 7520-7523. 2002.
- [26] Bauer-Christoph, C. Authentication of tequila by gas chromatography and stable isotope ratio analyses. *Eur. Food Res. Technol.* 32 (217) 438-443. 2003.
- [27] Lachenmeier, D.W. Attig, R. Frank, W. and Athanasakis, C. The use of ion chromatography to detect adulteration of vodka and rum. *European Food Research and Technology*, 218 (1) 105-110. 2004.
- [28] Arbuzov, V.N. and Savchuk, S.A. Identification of vodkas by ion chromatography and gas chromatography. *Journal of Analytical Chemistry*, 57 (5) 428-433. 2002.
- [29] Lachenmeier, D. Rapid and mobile brand authentication of vodka using conductivity measurement. *Microchimica Acta*, 160 (21) 283-289. 2008
- [30] Wold, S and Eriksson, L. in: H. Van der Waterbeemd Ed. "Chemometric Method in Molecular Design". VCH Weinheim. Germany. 1995.
- [31] Massart, D., Vandeginste, B., Buydens, L., De Jong, S., Lewy, P. and Smeyers-Verbeke, J. "Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A and B". Elsevier, Germany. 1997.
- [32] Beebe, K., Pell, R. and Seasholtz, M. "Chemometrics, a Practical Guide". John Wiley and Sons. New York. 1998.

-
- [33] Esbensen, K., Schönkopf, S. and Midgaard, T. "The Unscrambler. Multivariate Analysis in Practice". CAMO-AS. Norway. 1997.
- [34] García, J., Vaz, B., Corilo, Y., Ramires, C., Saravia, S., Sanvido, G., Schmidt, E., Maia, D., Cosso, R., Zacca, J. and Nogueira Eberling, M. Whisky analysis by electrospray ionization- Fourier transform mass spectrometry. *Food Research International*, 51, 98-106. 2013
- [35] Pontes, M.J.C.; Santos, S.R.B.; Araújo, M.C.U.; Almeida, L.F.; Lima, R.A.C.; Gaião, E.N. and Souto, U.T.C.P. Classification of distilled alcoholic beverages and verification of adulteration by near infrared spectrometry. *Food Research International*, 39 (2) 182-189. 2006.
- [36] Praveen, A., Bavishna, P., Dholakia, K. Near Infrared spectroscopic analysis of single malt Scotch whisky on an optofluidic chip. *Optics Express*, 19 (23) 22982-22992. 2011.
- [37] Mignani, A., Ciaccheri, L., Gordillo, B., Mencaglia, A., González- Miret, M., Heredia, F. and Culshaw, B. Identifying the production region of single- malt Scotch whiskies using optical spectroscopy and pattern recognition techniques. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 171, 458-462. 2012.
- [38] Lorenzo- Izquierdo, M., Zayas- Ruiz, E., Guerra- Rodríguez, M., Crespo- Zayas, D., Mieres- Balmaseda, G. Uso de algunas herramientas analíticas en la determinación de la autenticidad de ron añejo. 2011. <http://www.redalyc.org>. Disponible en Internet: marzo de 2013.

- [39] Barbosa García, O., Ramos-Ortiz G., Maldonado J.L., Pichardo-Molina, J.L., Meneses-Nava, M.A. Landgrave, J.E.A. and Cervantes–Martinez, J. UV-Vis absorption spectroscopy and multivariate analysis as a method to discriminate tequila. *Spectrochimica Acta Part A* (66) 129-134. 2007.
- [40] Nascimento, E.C.L., Araujo, M.C.U. and Galvão, R.K.H. A Flow-Batch for UV-Vis Spectrophotometric Detection of Adulteration in Distilled Spirits. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 12 (22) 1061-1067. 2011.