



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

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**“CLASIFICACIÓN DE BEBIDAS ALCOHÓLICAS DESTILADAS
POR ABSORCIOMETRÍA MOLECULAR UV-VISIBLE”**

TRABAJO DE TESIS DE GRADO
LICENCIATURA EN QUÍMICA

PRESENTADO POR

VICTOR MARTÍN ZELAYA ALVAREZ

DIRECTOR

Dr. CAMIÑA, JOSÉ MANUEL

CO-DIRECTOR

Dr. CANTARELLI, MIGUEL ÁNGEL

SANTA ROSA, LA PAMPA

2012

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. José Manuel CAMIÑA y bajo la co – dirección del Dr. Miguel Ángel CANTARELLI.

V́ctor Mart́n ZELAYA ALVAREZ

27 de Septiembre de 2012

Departamento de Química

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Universidad Nacional de La Pampa

RESUMEN

Las llamadas bebidas blancas constituyen un grupo de bebidas con elevada graduación alcohólica. Estas bebidas son obtenidas por destilación de alcohol fermentado a partir de diversas fuentes de carbohidratos, destacándose cereales como cebada, centeno, maíz, etc., con elevada presencia de almidón, cuya hidrólisis produce los azúcares necesarios para la fermentación alcohólica.

Dentro del grupo de bebidas blancas se hallan, entre otras, tequila, ron, vodka, ginebra, gin, caña, pisco, etc. Estas bebidas tienen la particularidad de poseer una graduación alcohólica superior al 30% de etanol (v/v) y si bien todas se obtienen por destilación fraccionada de líquidos fermentados, las diferencias en su elaboración producen las distinciones posteriores que caracterizan a cada bebida en particular.

Desde el punto de vista analítico, la cromatografía de gases es uno de los métodos más utilizados para cuantificar el contenido de etanol en estas bebidas, la corroboración del contenido etanólico nominal según su etiqueta. Sin embargo, no existen métodos analíticos capaces de distinguir fehacientemente cada una de estas bebidas. En el presente trabajó se diseñó un método analítico espectrofotométrico para la clasificación de diferentes bebidas blancas comerciales (exceptuando bebidas blancas coloreadas como el whisky, ron de roble, licores, etc.). Dicho método permite discriminar e identificar las mencionadas bebidas, con fines de control de calidad en el comercio.

SUMMARY

The so-called white spirits are a group of beverages known because of its high alcohol content. These drinks are obtained by distillation of fermented alcohol from various sources of sugars, standing cereals such as barley, rye, corn, etc, with high starch content, which hydrolysis which produces the sugars necessary for alcoholic fermentation.

Hard liquors include drinks such as tequila, rum, vodka, gin, sugar, pisco, etc. Their ethanol content is above 30% (v/v), and are obtained by fractional distillation of fermented liquids. The sensorial features of each particular beverage arise from the raw materials as well as the processing they undergo.

Gas chromatography is the most frequently used analytical method for the ethanol content quantification of hard liquors, e.g. ethanol content corroboration according to their label. However, there are no analytical methods able to reliably distinguish each of these beverages. In this paper we designed a spectrophotometric analytical method for classification of different commercial white beverages (except white colored drinks such as whiskey, rum oak, spirits, etc.). Said method allows discriminating and identifying the above drinks, for purposes of quality control in the trade.

INDICE

<u>OBJETIVOS</u>	6
<u>CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN</u>	8
<i>1.1 Reseña histórica de las bebidas alcohólicas</i>	8
<i>1.2. Proceso de destilación</i>	9
<i>1.2.1. Principios de destilación</i>	10
<i>1.3. Proceso de fermentación</i>	12
<i>1.4. Bebidas destiladas</i>	12
<i>1.4.1 Ginebra</i>	14
<i>1.4.2. Gin</i>	15
<i>1.4.3. Vodka</i>	16
<i>1.4.4. Tequila</i>	17
<i>1.4.5. Ron</i>	19
<i>1.5. Autenticidad de las bebidas alcohólicas</i>	20
<i>1.6. Herramientas de calibración multivariadas</i>	22
<i>1.6.1. Fundamentos matemáticos del PCA</i>	25
<i>1.6.2. Estimación de un modelo PCA</i>	28

<i>1.6.3. Análisis de clusters</i>	29
<i>1.7. Análisis multivariado y autenticidad de las bebidas alcohólicas</i>	31
<i>1.7.1. Espectroscopia UV- análisis multivariado</i>	31
<u>CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS.</u>	33
<i>2.1. Bebidas</i>	33
<i>2.2. Preparación de las bebidas para la medición</i>	34
<i>2.3. Espectroscopia UV-visible</i>	35
<i>2.4. Análisis multivariado</i>	35
<u>CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	36
<i>3.1. Espectros de Absorción</i>	36
<i>3.2. Análisis Multivariado</i>	43
<i>3.2.1. Análisis por Componentes Principales (PCA)</i>	43
<i>3.2.2. Varianza Explicada</i>	44
<i>3.2.3. Análisis de Clusters</i>	45
<i>3.2.4 LDA utilizando categorías independientes Tabla de clasificación cruzada</i>	46
<i>3.2.5. LDA utilizando categorías según PCA y CA</i>	47
<u>CAPÍTULO 4: CONCLUSIONES</u>	48
<u>CAPÍTULO 5: BIBLIOGRAFÍA</u>	49

OBJETIVOS

El surgimiento de nuevas habilidades para la elaboraci3n de bebidas destiladas blancas impone la necesidad de aplicaci3n 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 evaluaci3n de cada una de las etapas implicadas en la producci3n de una bebida como aś tambi3n en el producto final.

La destilaci3n y la fermentaci3n constituyen etapas decisivas, por lo que se pone mucho 3nfasis en su control. Actualmente se le confiere gran importancia a la buena calidad de las materias primas, que de hecho est3n reguladas legalmente. Tambi3n se han comenzado a regular las condiciones en las que se lleva a cabo la maduraci3n de un determinado producto, que en definitiva es el procedimiento que le confiere a la bebida las caracterfsticas deseadas.

La revisi3n bibliogr3fica demuestra que los sistemas formales empleados para determinar la calidad, generalmente, implican la utilizaci3n de t3cnicas engorrosas y econ3micamente no accesibles para laboratorios peque1os; como por ejemplo cromatograf́a gaseosa, espectroscoṕa infrarroja, microextracci3n en fase s3lida, espectroscoṕa de plasma acoplado inductivamente, etc.

Por su parte, el uso de herramientas de calibraci3n multivariada, ha ido en creciente aumento, 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 equipos y sistemas de computaci3n) generando un conjunto de an3lisis de datos sumamente valioso para el desarrollo de la Química. Estos sistemas de an3lisis de datos, han adquirido incluso la categoŕa de subdisciplina, la cual es conocida en su conjunto con el nombre de Quimiometŕa. El uso de herramientas de an3lisis computacionales tambi3n se ha aplicado con 3xito en otras disciplinas como la Econoḿa, Psicoloǵa, Ciencias Sociales, Bioloǵa, etc.

La ventaja multivariada radica en la posibilidad de analizar muestras complejas, utilizando herramientas analíticas ŕpidas y ecońmicas, a trav́s de los sistemas multivariados de ańlisis. El ańlisis convencional de muestras complejas implica el uso de procesos separativos engorrosos para la eliminaci3n de interferencias, como aś tambi3n la utilizaci3n de instrumental analítico de elevado costo, el cual no siempre es asequible en laboratorios de docencia y de control de calidad de bajo presupuesto.

A raíz de ello, se plantea la necesidad de contar con m3todos analíticos confiables, asequibles, ŕpidos y de bajo costo, para la discriminaci3n de bebidas blancas, a los fines de una ŕpida determinaci3n para el control de calidad en el comercio nacional e internacional.

El objetivo del trabajo fue la clasificaci3n de las bebidas blancas, utilizando la combinaci3n de absorciometría molecular UV y herramientas multivariadas. Esto supondría dejar atŕs m3todos instrumentales complejos como los mencionados o t3cnicas de percepci3n sensorial que no son definitivas.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1 RESEÑA HISTÓRICA DE LAS BEBIDAS ALCOHÓLICAS

Las bebidas alcohólicas constituyen un producto sumamente primitivo en la humanidad. No obstante, el proceso de destilación no era un proceso muy corriente hasta fines del siglo XVI. Los griegos y romanos apenas conocían la elaboración del vino, que en algunos casos perfumaban con la utilización de hierbas aromáticas. Es factible que entre esos vinos aromáticos se encuentre el predecesor del actual vermouth. También preparaban cierta clase de bebidas a base de azúcar y zumos de frutas, similares a lo que hoy se conoce como jarabes. Las reseñas históricas también indican que la reina de Saba tenía los secretos para la preparación de un jarabe similar a la granadina. A pesar de todo esto, no hay evidencia suficiente que permita aseverar que en esos tiempos se poseyera conocimientos en la elaboración de las bebidas espirituosas.

Arnaldo Vilanova, profesor de la Universidad de Montpellier, fue quién ahondó en sus estudios y realizó varias experiencias que lo llevaron a la elaboración de destilados alcohólicos. Éstos en primera medida se utilizaron con fines médicos, a tal punto que permitieron obtener un licor al que se le atribuían virtudes y propiedades capaces de combatir todos los males. Si bien estas propiedades no pudieron ser comprobadas, este preparado constituyó el punto de partida de los más variados licores y bebidas.

Hasta hace un siglo atrás el alcohol solamente se obtenía del vino o del orujo, únicamente en el Reino Unido se extraía de la cebada. Hoy en día, debido a la gran cantidad de demanda, necesidades y usos se hizo necesario buscar otras fuentes de alcohol, entre las que puede mencionarse los cereales, caña o melaza de azúcar.

El sistema de destilación que se use va a permitir variar el sabor de la bebida; esto hizo que el proceso se vaya modificando en función de dichas necesidades. A pesar de ello, el objetivo es común a todos: separar el alcohol de un fermento para llevarlo a una bebida.

Por este motivo se desarrollaron diversos ḿtodos que permitieran calentar recipientes y recolectar los vapores condensados en alguna superficie fŕa que transformara el vapor en ĺquido. Este ĺquido se colecta y se transporta a otro recipiente de baja temperatura que sirve como deṕsito del “esṕritu” destilado. [1]

1.2. PROCESO DE DESTILACI3N.

En el 800 a.C. se document3 el primer proceso de fermentaci3n y destilaci3n, correspondiente a la elaboraci3n de bebidas a base de cereales y leche, como lo indica la tabla 1.

Época	País o Zona Geográfica	Bebida Fermentada	Material base para el producto	Bebida Destilada Obtenida
800 a.C.	China	Tchoo (tchú)	Arroz y mijo	Sautchú (sautchoo)
	Ceylan e India	Toddy	Arroz y malaza	Arack
	Asia	Kumiss	Leche de burra o yegua	Arika
	Tartaria	Jefir	Leche de burra o yegua	Skhou
	Caucásica			
	Jap3n	Sake	Arroz	Sochu
500 d.C.	Reino Unido (Inglaterra)	Agua miel (mead)	Miel	Agua miel destilada
1000	Italia	Vino	Uvas	Brandy
	Cárpatos	Fermento	Papas y cereales	Vodka
	Países eslavos	Brandy de ciruela	Ciruelas	Silvovitza
1100	Irlanda	Cerveza	Malta, avena y cebada.	Usquebaugh (un tipo de whisky)
1200	España	Vino	Uvas	Aqua vini
	España y Francia	Melaza de Caña	Caña de azúcar	Rum, rhum o ron
1500	Escocia	Cerveza	Malta de cebada	Aqua vitae o whisky
1650	México	Fermento	Agave (cactus)	Tequila

Tabla1. Proceso de destilaci3n a lo largo de la historia de la humanidad

El proceso de destilaci3n fue evolucionando en funci3n del tiempo y las diferencias en las zonas geográficas. No obstante, el gran cambio se reflejó durante la Revoluci3n Industrial, que permiti3 obtener bebidas de diferentes características, diferentes materias primas, etc.

El avance en el conocimiento de la Química, del empleo de sistemas cerrados y sobre todo en el entendimiento de los procesos de evaporaci3n- condensaci3n, también

colaboró a este progreso. En este apartado cabe destacar a dos personas que marcaron tendencia:

- La primera variante significativa fue introducida en 1512 por H. Braunschwick en la elaboración de brandy. Propuso un sistema que incluía el evaporador y condensador separados para así optimizar la separación de los vapores volátiles en un solo circuito cerrado y una única separación.
- El segundo cambio se produjo 330 años después. En 1832 Robert Stein ideó un proceso separado en dos columnas para su destilería de whisky escocés. Una de las columnas se usaba para la evaporación y la otra para la condensación y separación de vapores. Este invento fue patentado por Aeneas Coffey ese mismo año, y fue conocido por su nombre; así, la máquina es conocida hoy en día como “Coffey Still” o Columnas de Coffey. El principio, con algunas mejoras, se sigue utilizando para la elaboración de la mayoría de las bebidas alcohólicas. [1]

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.

$$p_{H_2O} + p_{EtOH} = 1$$

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

En donde p_{H_2O} 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.

$$p_{EtOH} = \gamma_1 x_1 P_{EtOH}$$

$$p_{H_2O} = \gamma_2 x_2 P_{H_2O} = \gamma_2 (1 - x_1) P_{H_2O}$$

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

En el punto de ebullición se establece un equilibrio entre el líquido y el vapor que tiene 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 condensaci3n del vapor y vaporizaci3n del ĺquido repetidamente. En la pŕctica, esto se logra por la utilizaci3n de una columna fraccionada (rectificador). [2]

1.3. PROCESO DE FERMENTACI3N

Los organismos heter3trofos consiguen la enerǵa a partir de las reacciones de 3xido-reducci3n, es decir, aquellas en las que se produce una transferencia de electrones desde un dador electr3nico (agente reductor) a un aceptor electr3nico (agente oxidante).

Los organismos aer3bicos obtienen su enerǵa a partir de la respiraci3n, en donde el oxígeno actúa como aceptor electr3nico final y oxida los combustibles orgánicos. En el caso de los organismos anaer3bicos, tambi3n obtienen su enerǵa a partir de reacciones de 3xido reducci3n, en un proceso que recibe el nombre de fermentaci3n. Aqú, los electrones pasan de un intermediario orgánico (dador electr3nico) producido por la escisi3n de un carbohidrato hasta otro intermediario orgánico que actúa como aceptor.

En la fermentaci3n alcoh3lica, la mol3cula de glucosa se escinde en dos mol3culas de etanol y dos mol3culas de di3xido de carbono. Este proceso se produce por las mismas transformaciones enzimáticas de la gluc3lisis pero consta de dos etapas enzimáticas diferentes hacia el final [3].

1.4. BEBIDAS DESTILADAS

Las bebidas destiladas pueden elaborarse a partir de cualquier materia prima que contenga etanol. Los destilados pueden ser agrupados en dos tipos: los del primer tipo (vodka y ginebra) se rectifican y no precisan cong3neres; su materia prima es cualquier soluci3n alcoh3lica que puede obtenerse de cualquier fuente. Los del segundo tipo (whisky y ron) son los que poseen aroma propio, materia prima tradicional y procesos de fermentaci3n y destilaci3n determinados [2].

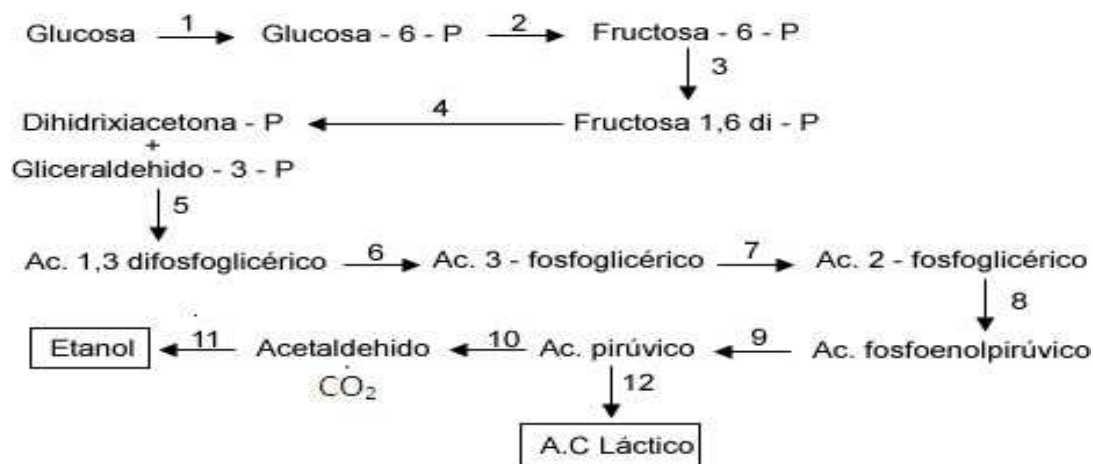


Figura 1. Fermentación alcohólica

El Código Alimentario Argentino (CAA) define como bebida destilada (a excepción de las fermentadas) como: “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:

- 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.
- 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".

La denominación "de cereales" o de otra materia prima (ej: "de fruta") solamente podrá ser empleada si el alcohol etílico potable de origen agrícola y/o destilado

alcoh́lico simple de origen agŕcola utilizados en la elaboraci3n de la bebida, fueran exclusivamente de cereales o de la materia prima indicada [4].

1.4.1. Ginebra

La ginebra es la bebida espirituosa obtenida a partir de la fermentaci3n y aromatizaci3n de componentes vegetales, siendo el m1s utilizado el enebro (*Juniperus communis*). Hay diferentes tipos de ginebras pero la variedad m1s importante es la llamada ginebra seca de Londres (*London dry gin*).

La ginebra seca de Londres se produce a partir de cereales o tambi3n de melazas. En realidad, cada marca de ginebra utiliza un tipo particular de combinaci3n de plantas, adem1s del enebro. Pueden mencionarse como plantas comunes al cilantro y la raíz de ang3lica, aunque el n1mero es extenso. Su obtenci3n se lleva a cabo en un alambique, cuyo dise1o puede variar. En todos los casos, el grado de rectificaci3n es muy bajo, por lo que la graduaci3n de los destilados raramente supera la del aguardiente base. Las plantas y el aguardiente neutro se colocan en el alambique y se dejan toda la noche para que se produzca el brebaje. Por su parte, las hierbas aromatizantes se pueden colocar en soportes sobre la superficie del lquido, lo que puede dificultar la extracci3n. La ginebra se extrae del alambique de la segunda de las tres fracciones que se obtienen. Las cabezas y las colas se llevan a un destilador que permite recuperar el etanol. Por otra parte, el alambique puede funcionar de manera tal que se obtenga un destilado que s3lo precise la diluci3n antes de ser embotellado y destinado al consumo. Alternativamente, se puede obtener una ginebra sumamente concentrada y transportarla a un lugar lejano para su diluci3n y embotellado; esto hace que la cantidad de plantas aromatizantes usadas sea mayor [2].

El CAA define a la ginebra como “la bebida de graduaci3n alcoh3lica de 35% a 54% a 20°C, obtenida de destilados alcoh3licos simples de cereales redestilados, total o parcialmente, en presencia de bayas de enebro (*Juniperus communis*) mezclado o no con alcohol etílico potable de origen agŕcola, pudiendo ser adicionada de otras sustancias aromatizantes naturales.

Las característias organolépticas del enebro deberán ser perceptibles, aún cuando pudieran estar atenuadas. La bebida podrá ser adicionada de azúcares en la proporción máxima de 15 g por litro del producto y caramelo para corrección del color. El coeficiente de congéneres no podrá ser superior a 150 mg/100 mL de alcohol anhidro [4].

1.4.2. Gin

El gin es una bebida destilada de grano, que debe su sabor principalmente a la presencia de bayas de enebro. Existen dos tipos de variedades que son la británica y la holandesa. Básicamente, el gin se prepara mediante la purificación del alcohol obtenido del grano mediante destilación fraccionada.

En el caso del gin holandés, la elaboración se realiza por la mezcla de un tercio de malta aplastada, fermentada, rectificada y alcoholes con volatilidad relativamente baja, que se destilan para obtener el producto final. Este destilado se mezcla con aromatizantes, dando como resultado una bebida de graduación alcohólica entre 43 y 44%. Como características principales, el gin holandés es una bebida con ligero aroma a malta y un cuerpo fuerte.

Por su parte, el gin británico es producido por rectificación de mezclas de whiskys u otras bebidas de elevada graduación alcohólica; esto se hace para que se pierdan los sabores y aromas característicos. Una vez concluida esta etapa se los reduce con agua y colocan en recipientes conjuntamente con aromatizantes. Luego, esta mezcla se destila nuevamente. Para obtener el producto final se requiere la reducción de la graduación alcohólica hasta 40-47%.

La saborización en Estados Unidos e Inglaterra se hace con fresas y con algún otro saborizante que se encuentra en menor proporción: orris, angélica o licorice; almendras, coriandro, carvi, cardamomo, anís, cassia, cáscara de limón, naranja, etc. Evidentemente, el secreto de cada productor es la mezcla de hierbas que utiliza y que son en definitiva las que dan el sabor particular [5].

El CAA define al Gin como “la bebida con graduación alcohólica de 35% a 54% a 20°C, obtenida por la redestilación de alcohol etílico potable de origen agrícola, en presencia de bayas de enebro (*Juniperus communis*) con adición o no de otras sustancias vegetales aromáticas, o por la adición de extracto de bayas de enebro, con o sin otras sustancias vegetales aromáticas, al alcohol etílico potable de origen agrícola. En ambos casos el sabor del enebro deberá ser preponderante. La bebida podrá ser adicionada de azúcares hasta un máximo de 15g (quince gramos) por litro del producto.

- Gin destilado: es la bebida obtenida exclusivamente por redestilación.
- Gin dulce (*old Tom gin* o gin cordial): es la bebida que contiene más de 6 g y hasta 15 g de azúcar por litro del producto.
- Gin seco (*dry gin*): es la bebida que contiene hasta 6 g (seis gramos) de azúcar por litro de producto.
- *London dry gin*: es el gin destilado seco.

Será optativo el uso de las denominaciones "gin destilado" o "London dry gin". El coeficiente de congéneres no podrá ser superior a 50 mg/100 mL de alcohol anhidro [4].

1.4.3. Vodka

En el mercado existen una gran variedad de vodkas, sin embargo, el más común se elabora a partir de aguardiente sin aroma y que obtiene casi todas sus características del etanol. Asimismo también pueden mencionarse vodkas aromatizados con frutas (cerezas) y otros materiales (hierba de bisonete, la pimienta y la miel).

En Europa occidental lo más empleado para la elaboración son los cereales, en tanto que en Europa central y del este se utiliza las papas. Básicamente, el vodka sin aromatizar se obtiene por la dilución de los aguardientes de base seleccionados y el tratamiento con carbón activo. El procedimiento se lleva a cabo en tanques, en donde el destilado se pone en contacto con carbón vegetal en polvo, aunque también se puede pasar el destilado por una serie de columnas que contienen partículas de carbón vegetal.

La funci3n del carb3n es disminuir al m3ximo la concentraci3n de los compuestos arom3ticos no deseables (como por ejemplo el diacetilo).

En el caso de los vodkas aromatizados, su obtenci3n se lleva a cabo mediante la destilaci3n de la infusi3n de frutas con el aguardiente base. Normalmente se utiliza un destilador discontinuo y no se realiza rectificaci3n. Como alternativa, se puede agregar al vodka una infusi3n de fruta y posteriormente filtrarlo antes de embotellarlo; o utilizar alg3n tipo de esencia. Para el caso de los vodkas de hierba de bisonte o pimienta, la fuente del aroma se coloca directamente en la botella y aś est3 presente en el momento del consumo [2].

El CAA define al Vodka como “bebida con graduaci3n alcoh3lica de 36 % a 54 % a 20°C, obtenida de alcohol et́lico potable o destilados alcoh3licos simples de origen agŕcola rectificados, seguidos o no de filtraci3n a trav3s de carb3n activado como forma de atenuar los caracteres organol3pticos de las materias primas originales. La bebida podr3 ser aromatizada con sustancias naturales de origen vegetal. El coeficiente de cong3neres no podr3 ser superior a 50 mg/ 100 mL de alcohol anhidro. La bebida podr3 ser edulcorada hasta un m3ximo de 2 g por litro del producto [4].

1.4.4 Tequila

El tequila es una bebida conocida en M3xico desde mediados del siglo XVIII. Se produce por una doble destilaci3n jugo fermentado de agave (*Agave tequilaza Weber, variedad azul*). B3sicamente existen dos tipos de tequilas: una llamada 100% agave y la otra simplemente conocida como tequila. La primera es una bebida de excelente calidad y proviene exclusivamente del jugo de agave azul.

La segunda tambi3n se conoce como tequila mezcla, y se obtiene por la combinaci3n de un 51% de jugo de agave azul y un 49% de otros tipos de jugos, generalmente proveniente de la caña de az3car [6].

La elaboraci3n del tequila se realiza a partir del cultivo de agave variedad azul. Esta planta tiene un ciclo que le permite llegar a la madurez a los diez ańos, momento en el que produce los az3cares necesarios para la fermentaci3n. Del agave s3lo se utiliza su coraz3n o cabeza.

En primer t́rmino se procede al calentamiento de los corazones o cabezas (en hornos o autoclave). Esto permite transformar la inulina (azúcar en mayor proporci3n) en azúcares como la sacarosa o fructosa fáclilmente fermentables. Luego se procede a la extracci3n de los azúcares del agave, que se logra mediante la utilizaci3n de agua a vapor y posterior prensado. Los azúcares así obtenidos viajan a trav́s de tuberías a piletas de formulaci3n (para obtener tequila) o fermentaci3n (para obtener tequila 100% agave).

La formulaci3n consiste en mezclar el azúcar de agave (en proporci3n al 51%) con otros azúcares como glucosa, fructosa, azúcar estándar (en proporci3n al 49%). Esta mezcla es la que se fermenta posteriormente.

La fermentaci3n es el proceso más importante, dado que permite la obtenci3n del alcohol etílico y otros alcoholes en menor proporci3n. Es llevada a cabo en piletas de acero inoxidable, en las que se agrega el mosto, las levaduras y nutrientes necesarios para la fermentaci3n. El tiempo de este proceso depende de la temperatura ambiente, si es baja puede prolongarse hasta 24 horas.

Posteriormente sigue el proceso de destilaci3n que se lleva a cabo en alambiques de cobre o acero inoxidable o bien, en torres de destilaci3n continua. En la elaboraci3n del tequila son necesarias dos destilaciones, llamadas destronamiento y rectificaci3n. El tequila obtenido del destronamiento o primera destilaci3n se lo conoce como “tequila ordinario”; mientras que el obtenido de la rectificaci3n o segunda destilaci3n se denomina “tequila blanco” [7].

El CAA define al Tequila como “la bebida con graduaci3n alcoh3lica de 36 % a 54 % a 20°C, obtenida de destilado alcoh3lico simple de agave o por destilaci3n de mosto fermentado de agave (*Amarilidacea*).

La destilaci3n deberá ser efectuada de forma que el destilado tenga el aroma y el sabor de los elementos naturales volátiles contenidos en el mosto fermentado, derivados del proceso fermentativo o formados durante la destilaci3n.

La bebida podrá ser adicionada de alcohol etílico potable de origen agŕcola, siempre que el contenido de destilado alcoh3lico simple de agave no sea inferior al 51%, expresado en alcohol anhidro. El coeficiente de congéneres no podrá ser inferior a 200 mg/100 mL ni superior a 650 mg/100 mL de alcohol anhidro. La bebida podrá ser

adicionada de azúcares hasta 30 g/L. Cuando la cantidad de azúcar adicionada sea superior a 6 g/L, la denominación deberá ser seguida del término "abocada." La bebida podrá ser añejada, permitiéndose el uso de caramelo para la corrección de color [4].

1.4.5 Ron

El ron es una bebida alcohólica destilada que se obtiene a partir de caña de azúcar. Además de ella, las materias primas utilizadas son los jarabes (almíbar) y melazas. El extracto de caña es lo más apropiado para la elaboración de un ron suave y se obtiene por el prensado del azúcar de caña finamente molido. Este jugo de caña se puede fermentar directamente, o como ocurre con los rones de mayor calidad, primero se calientan y clarifican para llevar a cabo la fermentación. Por su parte, las melazas son las encargadas de brindarle a la bebida aromas y sabores característicos.

Es necesario realizarle un tratamiento a las melazas antes de llevar a cabo la fermentación. Éste varía dependiendo del tipo de melaza, pero consiste en la clarificación inicial que se hace para evitar oclusiones en los equipos. El primer paso de la clarificación consiste en la precipitación con alúmina y fosfato de calcio, o la adición de ácido sulfúrico (aunque puede generar una disminución en la concentración de azúcar). Posteriormente, las impurezas se eliminan por centrifugación. Frecuentemente, las melazas están asociadas a una carga microbiana elevada por lo que se hace necesario la utilización de un tratamiento térmico similar a una pasteurización.

En la producción a pequeña escala puede usarse un simple alambique. A escala comercial, el proceso se lleva a cabo en tres destiladores: el destilador del extracto, el destilador del vino básico y el destilador del vino fuerte.

La destilación final es selectiva, obteniéndose el ron en la segunda. Las fracciones primeras y últimas se reciclan, pudiéndose obtener una mayor purificación por el uso de un rectificador [2].

El CAA define al Ron/Rhum/Rum como "bebida con graduación alcohólica de 35 % a 54% a 20°C, obtenida de destilados alcohólicos simples o de la destilación de mostos fermentados de jugos de caña de azúcar, mieles, melaza o sus mezclas, de forma tal que se mantengan aquellos principios aromáticos a los que el producto debe sus caracteres organolépticos específicos, añejados total o parcialmente.

Se permite el uso de caramelo para la correcci3n de color y de carb3n activado para decoloraci3n. El producto podr3 ser adicionado de azúcares hasta 6 g/L. El coeficiente de congéneres no podr3 ser inferior a 40 mg/100 mL de alcohol anhidro ni superior a 500 mg 100/mL de alcohol anhidro.

Podrá denominarse:

- Ron liviano (*light ron*) al ron cuyo coeficiente de congéneres no supere los 200 mg/100 mL de alcohol anhidro,
- Ron pesado (*heavy ron*) al ron cuyo coeficiente de congéneres sea superior a 200 mg/100 mL de alcohol anhidro e inferior a 500 mg/100 mL de alcohol anhidro.
- Ron añejo o ron viejo al ron que haya sido añejado en su totalidad por un periodo ḿnimo de 2 (dos) ańos” [4].

1.5. AUTENTICIDAD DE BEBIDAS ALCOH3LICAS

La autenticidad de los alimentos en general (y sus ingredientes) es un tema sumamente importante dado que muchas veces se producen fraudes por parte del fabricante que pueden ocasionar problemas de salud en el consumidor. Un alimento aut3ntico se define como aquel que cumple la descripci3n brindada por el fabricante, es decir, las descripciones industriales como las de composici3n. La preferencia de los consumidores por determinados alimentos se basa principalmente en cuestiones subjetivas, como por ejemplo, etno-religiosas, paladar o econ3micas.

Para un fabricante, la calidad de un alimento constituye un conjunto de atributos que son relevantes para la comercializaci3n del mismo. Por esta raz3n, se hace indispensable que tanto lo que se produce como lo que se consume sea aut3ntico. De esta manera, el producto debe cumplir con las especificaciones de calidad y que, adem3s, responda a lo que el fabricante plantea en la etiqueta [8].

Se han utilizado diferentes t3cnicas para determinar la calidad y autenticidad de los alimentos, tales como espectroscopía Raman, espectroscopía de infrarrojo medio y cercano, cromatografía gaseosa, microextracci3n en fase s3lida, espectroscopía UV, m3todo de is3topos estables. Los m3todos anal3ticos utilizados se muestran en la tabla 2.

T́cnica Anaĺtica	Algunas Aplicaciones
Espectroscopía Infrarroja	Jugos de fruta, miel y vinos
Espectroscopía de Raman	Aceite de oliva, miel
Resonancia Magnética Nuclear	Vino, Jugo de naranja
Espectroscopía Ultravioleta Visible	Autenticidad de Bebidas blancas coloreadas
Cromatografía de Gases	Aceites de oliva, purés de frutas
HPLC	Queso, vino
Nariz electrónica	Aceite de Oliva, vino, miel
Análisis de ADN	Carne de res, de cordero y pastas
Técnicas inmunoquímicas (ELISA)	Carne, leche

Tabla 2. Técnicas empleadas para autenticación de alimentos.

La autenticidad de las bebidas alcohólicas constituye un tema ampliamente estudiado. En 1988 se utilizó la espectroscopía infrarroja para el análisis de extractos de brandies y coñacs para hacer una diferenciación cuantitativa y cualitativa, que permitió la calasificación de los mismos [9].

La espectroscopía de infrarrojo cercano (NIR) no destructiva y espectroscopía Raman se utilizaron en la determinación del contenido etanólico en whiskys, vodka y bebidas alcohólicas azucaradas [10]. Por su parte, la espectroscopía de Raman también se usó en la determinación del contenido alcohólico de tequilas [11].

La espectroscopía infrarroja cercana y la espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier se utilizaron para controles analíticos en la fabricación de vinos, obteniéndose mejores resultados a partir de NIR [12]. Además se utilizó la espectroscopía de infrarrojo cercano y visible para la discriminación de vinos blancos australianos de diferente procedencia [13].

La espectroscopía de plasma acoplado inductivamente (ICP) se usó para determinar metales como magnesio, cobre y cinc en la bebida chipriota Zivania y así diferenciarla de otras bebidas de similar graduación alcohólica [14].

Spectroscopic & Analytical Developments (SAD) desarrolló un autenticador de marcas, basado en los espectros de absorción ultravioleta y visible de whiskys escoceses. Se trata de un método rápido, económico y transportable. Posteriormente la autenticidad se confirma por el uso de cromatografía gaseosa. A partir de este método se ha podido llevar a cabo la autenticación de marcas de whiskys provenientes de lugares en donde no puede usarse la cromatografía gaseosa y, además, introducir para trabajos de campo un equipo pequeño, portátil y manuable [15-16].

Mediante la utilizaci3n de microextracci3n en fase s3lida se extrajeron cong3neres de whiskys escoceses. Esto permiti3 la clasificaci3n en cuatro grupos (Deluxe, West, Standard y West Highlands). Adem3s se determin3 por cromatograf́a ĺquida de alta resoluci3n (HPLC) la presencia de 57 componentes y 38 cong3neres en todos los tipos, aunque solamente el tipo Deluxe produjo una separaci3n definida [17].

Para la autenticidad del tequila se emple3 el m3todo de is3topos estables y la microextracci3n en fase s3lida del espacio superior. La diferenciaci3n se bas3 en las materias primas originadas de plantas C3 y C4/CAM (3 o 4 3tomos de carbono). Del mismo modo, la cromatograf́a gaseosa se us3 en la determinaci3n de constituyentes vol3tiles, aś como para la determinaci3n de la relaci3n C13/C12 mediante espectroscopia de masas de radio is3topos. Por otra parte, la resonancia magn3tica nuclear fue empleada para obtener la relaci3n deuterio/hidr3geno (D/H) de etanol se us3 para determinar la cantidad de etanol en los tequilas y, de esta manera, diferenciar los tequilas 100% agave [18-19].

Para las bebidas blancas destiladas se han propuesto numerosos m3todos. La cromatograf́a de iones se emple3 para la determinaci3n de diferentes aniones (cloruros, nitratos, sulfatos) en bebidas como el vodka o ron. Para llevar a cabo dicha determinaci3n, se removieron los componentes vol3tiles antes de que se produjera la inyecci3n en el cromat3grafo [20].

Tambi3n se propuso la medici3n de la conductividad para diferenciar vodkas falsos. La conductividad del vodka se deriva de la presencia de iones inorg3nicos marcados como autentificadores por la cromatograf́a de iones. La conductividad se mantiene constante entre botellas de las mismas marcas, sin embargo, hay grandes fluctuaciones entre marcas diferentes. Este m3todo se utiliza en casos forenses para determinar fraudes de marcas [21].

1.6. HERRAMIENTAS DE CALIBRACI3N MULTIVARIADA

El empleo de herramientas multivariadas es un aspecto de gran importancia y un aporte consecuente en el estudio de la Qúmica Analt́ica. 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 [22].

En la actualidad, la calibración multivariada es utilizada como herramienta no sólo 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*) [22].

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 ciertas 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 más 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 composici3n anaĺtica de una serie de muestras de inter3s, para luego clasificarlas de manera multivariada, a fin de poder agruparlas en base a propiedades que se hallan ocultas dentro de los datos anaĺticos iniciales.

El análisis e interpretaci3n por medio de PCA, involucra la confecci3n de modelos matemáticos basados en los datos anaĺticos, en los cuales se puede observar si existe discriminaci3n en base a propiedades de las muestras, como aś tambi3n una interpretaci3n cualitativa de las mismas. Es en este terreno donde PCA ha adquirido relevancia como herramienta de clasificaci3n 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 m3todo que si bien no permite realizar una evaluaci3n detallada del modelo como PCA, puede brindar informaci3n tan importante como PCA y ser una herramienta de clasificaci3n complementaria.

El n3mero de posibles aplicaciones de modelado predictivo es virtualmente ilimitado. La mayor aplicaci3n actual se centra en el 3rea de la qúmica anaĺtica, sobre todo en el desarrollo y aplicaci3n de modelos de calibraci3n con fines cualitativos (PCA, CA y LDA) y cuantitativos (MLR, PLS).

En el primer caso la b3squeda se orienta al hallazgo de propiedades ocultas, mientras que en segundo caso la aplicaci3n mas importante es la determinaci3n simult3nea de la concentraci3n de varios analitos en una mezcla multicomponentes donde se puede elegir la metodoloǵa mas adecuada a partir de un gran arsenal de m3todos espectrosc3picos (por ejemplo, UV-Visible, IR, NIR, XRF, NMR). Por otra parte, el uso de sensores m3ltiples en ĺnea resulta ser otra posibilidad muy interesante y depende casi exclusivamente de la aplicabilidad de modelos de calibraci3n multivariada para el monitoreo cuantitativo de los sistemas o procesos de inter3s. Por ejemplo, la aplicaci3n de espectroscoṕa de infrarrojo cercano para analizar pequeñas muestras en sistemas en ĺnea o sistemas discontinuos, ha encontrado un uso extendido en las industrias qúmicas y en las industrias de alimentos. La metodoloǵa es 3til para caracterizar e identificar propiedades de productos relacionadas a su composici3n que

por metodologías cĺsicas puede resultar costoso, por ejemplo determinaci3n del ńmero de octanos en combustibles, valores de yodo y grado de insaturaci3n en grasas y aceites o cristalinidad de polímeros. Otras aplicaciones por fuera del campo de la qúmica analítica son la predicci3n de propiedades farmacol3gicas o bioquímicas desde parámetros estructurales (QSAR), la compresi3n de perfiles sensoriales y organolépticos desde datos fisicoquímicos en investigaciones de alimentos y la obtenci3n y uso de modelos a partir de datos ambientales [23].

La calibraci3n multivariada puede estimular el desarrollo de nuevo instrumental analítico, a través de la incorporaci3n adecuadas herramientas computacionales multivariadas a nuevos equipos, como aś tambi3n incrementar la capacidad analítica y la precisi3n de los instrumentos tradicionales actuales.

La aplicaci3n de metodologías de calibraci3n multivariada al tratamiento de datos analíticos requiere que el analista conozca de los fundamentos matemáticos, como aś tambi3n 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 ńmero determinado de muestras. La examinaci3n 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 relaci3n entre ellas. Sin embargo, sin un adecuado programa de análisis, esto puede ser factible siempre que el ńmero de variables analizadas (columnas) sea menor que tres (espacio tridimensional). PCA realiza una manipulaci3n matemática de la matriz de datos donde la meta es representar la variaci3n presente en algunas variables utilizando un pequeño ńmero 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 ńmero reducido de dimensiones correspondientes al espacio de los

componentes principales. Con esta nueva visi3n, el qúmico anaĺtico 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 ńmero de variables. Esto no es de utilidad en PCA pero sirve como ejemplo pŕctico. En un gráfic0 de tres variables como el de la figura 2 se representa el funcionamiento del PCA en t́rminos generales para hallar los componentes principales o factores.

En la figura 2 se observa claramente c3mo 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 direcci3n hacia la ḿxima elongaci3n 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 direcci3n de la segunda mayor elongaci3n de la nube en las tres dimensiones, ortogonal al CP1.

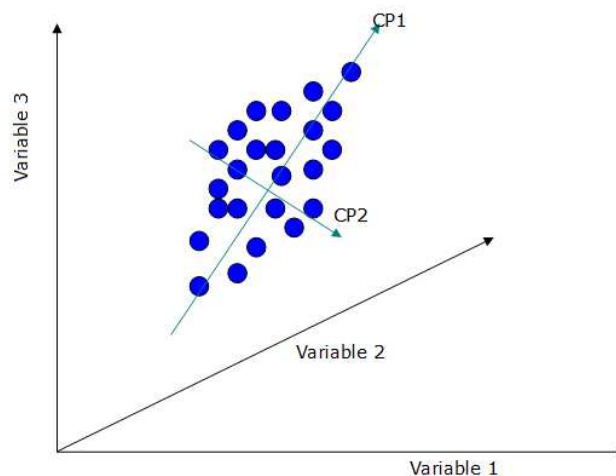


Figura 2 Direcci3n de los componentes principales a partir de una nube de puntos tridimensional.

Cada componente principal que subsecuentemente surja en n - dimensiones, seŕ ortogonal a los anteriores, por lo que se generaŕ un nuevo sistema de ejes cartesianos que se orientaŕ hacia donde exista la mayor elongaci3n de la nube de puntos y por

ende, la mayor informaci3n del sistema. Por otra parte, se produce una sustancial reducci3n de variables ya que, como se aprecia en el gŕfico, dos componentes PLS modelan a las tres variables originales y esto se hace ḿs notorio en espacios n -dimensionales con n variables con una reducci3n a unos pocos componentes principales.

La expresi3n matemática que explica el funcionamiento del PCA se muestra en la ecuaci3n 4

$$\mathbf{R} = \mathbf{USV}^T$$

Ecuaci3n 4

Donde \mathbf{R} es la llamada matriz de respuestas, la matriz que contiene los valores de las variables originales; \mathbf{U} es la llamada matriz de *scores* donde est́n contenidas las coordenadas de las variables originales proyectadas sobre los nuevos componentes principales; \mathbf{V} se denomina matriz de *loadings* y contiene la informaci3n referida a la vinculaci3n entre las medidas originales con los componentes principales; por ́ltimo \mathbf{S} es una matriz diagonal, que posee ceros salvo en la diagonal, brinda informaci3n acerca de la varianza de cada componente principal.

En t́rminos descriptivos, el gŕfico de *scores* (o sea, proyecci3n de las variables originales sobre los componentes principales) mostrará el comportamiento de cada muestra respecto a ellos. La ubicaci3n de cada muestra dependerá de sus característicás. Si existen subgrupos de muestras con diferentes característicás entre sí, este gŕfico permitirá observar dichas diferencias y de esa forma generar una clasificaci3n.

Por otra parte, el gŕfico 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 gŕfico alejadas del cero, mientras que si su influencia es escasa o nula se encontrarán cerca de él.

En ́ltimo t́rmino, la matriz de varianza determinará el grado de dispersi3n de los datos originales sobre los componentes principales. Esta dispersi3n puede deberse tanto a la variabilidad de los datos originales como a una dispersi3n que puede ser causada

por una selecci3n icorrecta de variables y ńmero extremadamente alto de componentes principales.

Existen una serie de algoritmos que pueden ser usados para calcular los *loadings* y scores en PCA. El mas coḿnmente empleado es el llamado *descomposici3n de valores singulares* [23].

1.6.2. Estimaci3n de un modelo PCA

Como ya se coment3, en un modelo PCA resulta de inter3s el estudio de relaciones entre las muestras en el espacio fila; las distancias entre las muestras son usadas para definir similitudes y diferencias. En t3rminos matemáticos, la meta de un modelo PCA es describir la dispersi3n de la variaci3n usando la menor cantidad de dimensiones que sea posible.

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

A fin de estimar el ńmero de componentes principales a utilizar, se puede emplear como herramienta b́sica un gráfico de porcentaje de varianza explicada, como el que se muestra en la figura 3, donde se observa el porciento de varianza explicada acumulativa en funci3n del ńmero de componentes PCA. Se puede apreciar en 3l que existe una tendencia ḿxima a partir de la componente ńmero 3 (en el ejemplo hipot3tico), lo que significa que el modelo est́ utilizando un alto porcentaje de informaci3n de los datos originales a partir de la componente 3 [24-25]. El uso de un mayor ńmero de componentes sería err3neo, ya que la informaci3n contenida en ellos puede incorporar errores del sistema en vez informaci3n útil. Otros parámetros a evaluar en el modelo son el gráfico de *loadings*, el gráfico de *scores*, los resultados de la validaci3n del modelo y los gráficos de residuales.

El modelo es obtenido a partir de un determinado ńmero de muestras, las cuales serán el objeto de estudio. Generalmente, el modelo es obtenido por validaci3n cruzada o *cross* validaci3n, que se expone a continuaci3n

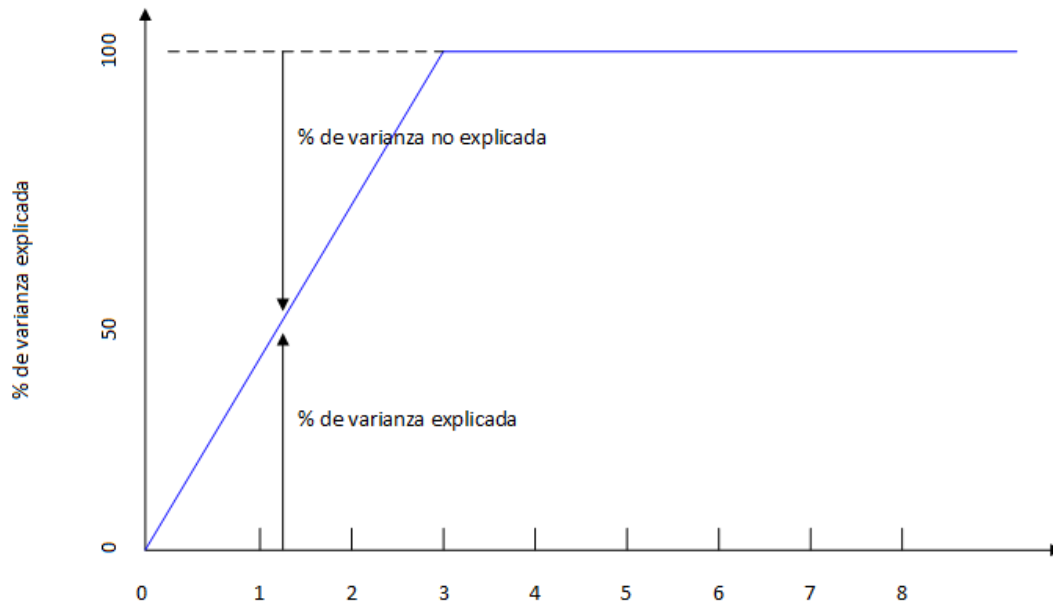


Figura 3 Porcentaje de varianza explicada en función del número de componentes PCA.

1.6.3. Análisis de clusters

El análisis de agrupamientos jerárquico (más conocido como análisis de cluster) es una técnica no supervisada que examina las distancias entre todas las muestras y representa esa información en forma de un gráfico de dos dimensiones llamado *dendograma* [26]. Estos dendogramas presentan los datos provenientes de un espacio filas de grandes dimensiones (variables instrumentales) y facilita la capacidad de reconocimiento del ser humano y puede proveer información adicional a la obtenida por PCA.

Para generar un dendograma, el análisis de clusters (CA) forma agrupamientos de muestras basados en su cercanía dentro del espacio filas. Existen diferentes maneras de hallar las distancias entre muestras y con ello, su cercanía o similitud entre sí. Por ejemplo, la combinación de las conexiones simples, cuadráticas, centroide, método de Ward, etc, con distancias como la Euclídea, de Mahalanobis, de Pearson, etc. [23-24]. La información que brindan difiere entre sí, en el sentido de que ciertas combinaciones son más útiles que otras dependiendo de la relación que exista entre las muestras.

Por ejemplo, la conexi3n m1s simple est1 basada en la distancia del “vecino m1s cercano” (*neighbor joining method*) contenida en el cluster o grupo de muestras. La relaci3n del vecino m1s cercano se aplica en todo el conjunto de muestra hasta obtener la vinculaci3n con todas ellas. Este v́nculo determina las similitudes y diferencias entre las muestras. La figura 4 representa un dendograma t́pico, en donde en el eje y se enlistan las muestras (A, B, C, D, E y F), mientras que en el eje x se aprecia la distancia entre grupos o clusters. En el eje y los valores generalmente utilizados es de 1 y 0, en donde 1 representa la m1xima similitud mientras que 0 representa la m1xima diferencia. Los valores en el eje de las x dependen del criterio de distancia seleccionado. En todos los casos, es conveniente realizar el an1lisis de cluster utilizando una combinaci3n de varios m1todos de conexi3n (*linkage*) y de distancias, de tal manera de obtener la m1xima informaci3n posible de las muestras [24].

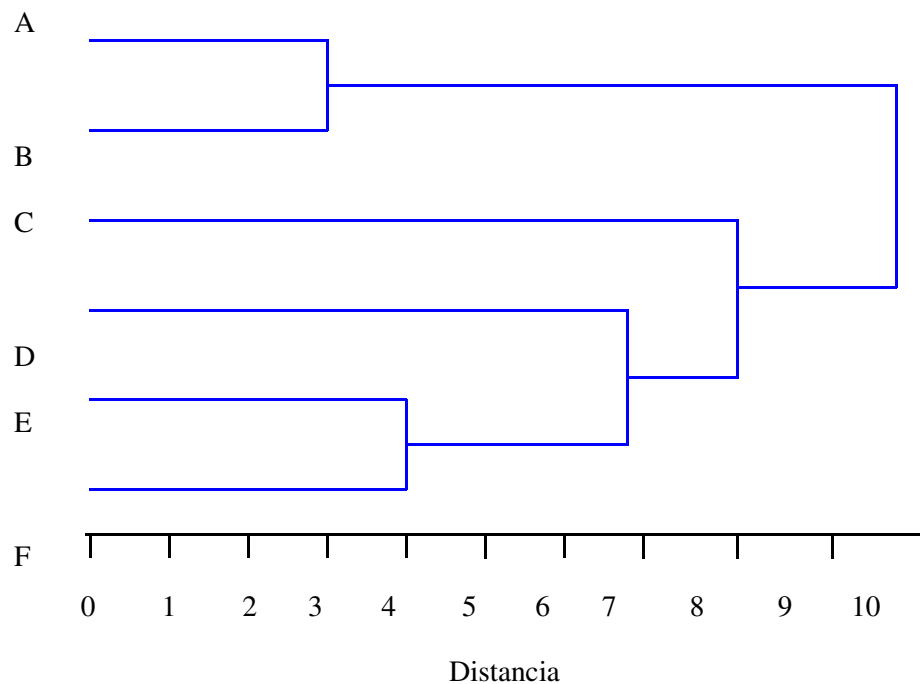


Figura 4. Ejemplo hipot3tico de un dendograma

1.7. ANÁLISIS MULTIVARIADO Y AUTENTICIDAD DE LAS BEBIDAS ALCOHÓLICAS

Diferentes técnicas se han empleado conjuntamente con las herramientas multivariadas para poder autenticar bebidas espirituosas. Las herramientas comúnmente utilizadas son el análisis de componentes principales, análisis canónico y análisis de clusters.

La espectroscopia infrarroja se usó conjuntamente con el análisis multivariado en vinos, whisky, brandy, ron y vodka. A través de ello se pudo determinar la adulteración de las bebidas por el agregado de agua, etanol y metanol [26]

Otro trabajo muestra el análisis de la composición química por espectroscopia infrarroja de diferentes rones provenientes de diferentes fábricas en Francia. La diferenciación se realizó a través del análisis de componentes principales y análisis discriminante. Esto permitió una clasificación del 100% [27].

Un trabajo posterior muestra también el análisis de la composición pero por cromatografía. Para el procesamiento estadístico se utilizaron diez variables con valores significativos. Los métodos utilizados fueron el análisis por componentes principales y el análisis discriminante. Nuevamente, se consiguió una clasificación del 100% [28].

Otra de las estrategias utilizadas para determinar adulteraciones en las bebidas es el llamado efecto Schlieren, basado en la creación de un gradiente de índices de refracción. Cuando las bebidas se adulteraron con agua y etanol, los índices de refracción se reprodujeron. Los datos obtenidos se trataron por el método SIMCA creándose modelos de clasificación utilizados para determinar adulteraciones [29].

1.7.1. Espectroscopía UV- análisis multivariado

La utilización de la espectroscopía UV-visible junto con el análisis multivariado para la clasificación de bebidas destiladas no está demasiado extendida. No obstante, es posible mencionar un par de trabajos.

En el primero se utilizó espectroscopía UV para la discriminación de tequilas. Los resultados obtenidos muestran que los diferentes tipos de tequilas pueden ser distinguidos a partir de espectroscopía UV-visible y análisis de componentes principales (PCA). Además el uso de análisis discriminante por regresión de cuadrados mínimos parciales (PLS-DA) muestra que es posible distinguir 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 [6].

En el segundo trabajo, se usó un analizador *flow –batch* para determinar, mediante espectroscopía UV-visible, la adulteración en bebidas destiladas. En el artículo se hace hincapié en que, si bien la espectroscopía UV-visible 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 combina el flujo, el *batch* y el uso de componentes de aproximación. El FABs permite la mezcla, dilución y reacción de manera automático, promoviendo de esta manera reduciendo la posibilidad de errores.

Se trata de un sistema capaz de acoplarse a diferentes técnicas (como la determinación de dureza de agua, titulaciones, adiciones estándar, preparación de soluciones para calibración uni y multivariada, etc.). En este caso se empleó para desarrollar un análisis UV-visible automático capaz de determinar adulteraciones con agua y metanol en bebidas destiladas como whisky, vodka, ron y brandy [30].

CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. BEBIDAS

Para llevar a cabo el trabajo se utilizaron diferentes tipos de bebidas blancas obtenidas en diferentes comercios. Entre ellas se encontraban 1 gin, 1 ginebra, 1 licor, 3 rones, 1 tequila y 2 vodkas. La Tabla 2 muestra la información extraída de cada una de las etiquetas: marca, ingredientes, graduación alcohólica y lugar de producción.

Bebida	Marca	Ingredientes	Graduación alcohólica (%)	Información Adicional	Lugar de Producción
Gin	HIRAM WALKER	Agua, alcohol de cereal hidratado, destilado alcohólico de hierbas	45	Elaborado con mezcla de cereales con bayas de enebro y otras hierbas cuidadosamente seleccionadas de Europa y Oriente	Bella Vista- Provincia de Buenos Aires
Ginebra	BOLS	Agua, alcohol de cereales, aguardiente de cereales y bayas de enebro.	40	Alcohol obtenido por destilación de centeno, cebada y maíz.	Capilla del Señor- Buenos Aires
Licor Padilla	CUBANA SELLO VERDE	Agua, alcohol, maceración de hierbas y frutas, destilación de orujos de uva, J.A.M.F, col caramelo	40	Alcohol destilado de malezas de caña	Lomas de Zamora- Provincia de Buenos Aires

Tabla 2. Detalle de las bebidas blancas analizadas

Ron	TROPIC CLUB	Agua, agua ardiente de caña, aromatizantes	39		Vicente Ĺpez- Provincia de Buenos Aires
Ron	BACCARDI		40	Ron Liviano	México D.F. México
Ron	CASTILLO	Aguardiente de caña de azúcar y agua.	35		Avellaneda- Provincia de Buenos Aires
Licor de Tequila	CONQUISTADOR DE MÉXICO	Agua, tequila concentrado, alcohol y azúcar	40	Licor extra seco de tequila elaborado con tequila premium 30% importado de México.	Villa Mercedes- Provincia de San Luis
Vodka	NITA	Agua, alcohol de cereal	40	Alcohol de cereal, triple destilación	Vicente Ĺpez- Provincia de Buenos Aires
Vodka	MOSKOVSKAYA	Agua, alcohol y azúcar.	40	Alcohol elaborado a partir de finísimos cereales seleccionados	Villa Mercedes- Provincia de San Luis

Tabla 2. Detalle de las bebidas blancas analizadas (continuación.).

2.2 PREPARACIÓN DE LAS BEBIDAS PARA LA MEDICIÓN

Para llevar a cabo la medición se prepararon soluciones con diferentes soluciones reguladoras, elaboradas a partir de la tabla de Clark y Lubs [31] (tabla 3). Las soluciones fueron preparados en matraces de 10 y 25 mL, por el agregado de la bebida (8 y 20 mL) y el buffer (2 o 5 mL) correspondiente en una relación 0,8.

Las soluciones reguladoras empleadas comprendieron el rango de pH 1-12 (1, 3, 5, 7, 9 y 12). Se realizaron cinco réplicas para cada bebida en cada uno de los pH.

pH	Composici3n	Diluci3n
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 b3rax 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. Composici3n y valores de pH de soluciones Buffer de Clark y Lubs

2.3. ESPECTROSCOPIA UV-VISIBLE

El espectro de absorci3n de cada una de las bebidas fue obtenido con un espectrof3tmetro UV-visible de marca Ocean Optics modelo ChemUSB 4000 con detector CDD de arreglo de diodo en ĺnea. Las mediciones se llevaron a cabo entre 178 y 890 nm, obteniéndose una medida cada 0,2 nm. De todo este rango, solamente se consider3 3nicamente el comprendido entre 190-400 nm, correspondiente al rango UV.

Para la medici3n se usaron aproximadamente 2 mL de la soluci3n preparada, llevándose a cabo en celda de cuarzo y con un camino 3ptico de 10 mm. En tanto que el blanco para todos los casos fue agua bidestilada sin agregado de buffer.

2.4. ANÁLISIS MULTIVARIADO

Los datos obtenidos de las mediciones se analizaron en los siguientes programas de análisis:

- 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), análisis de clusters (CA) y el análisis discriminante lineal (LDA).

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. ESPECTROS DE ABSORCIÓN

Las figuras 5 a 13 muestran los espectros obtenidos a distintos valores de pH para cada una de las bebidas analizadas. En ellos es posible distinguir tres zonas: la primera correspondiente a los 190-240 nm. , la segunda comprendida entre los 240-300 nm y la tercera que se encuentra entre los 300-400 nm.

La primera zona espectral es correspondiente al agua y al etanol y es común a todas las bebidas. La segunda y tercera zona son las distintivas para cada bebida y comprende todos los compuestos químicos que contiene la bebida y que le son característicos (alcoholes superiores, aldehídos, cetonas, terpenos, compuestos aromáticos, etc.). Esta distinción se hace más notoria a medida que el pH se vuelve alcalino.

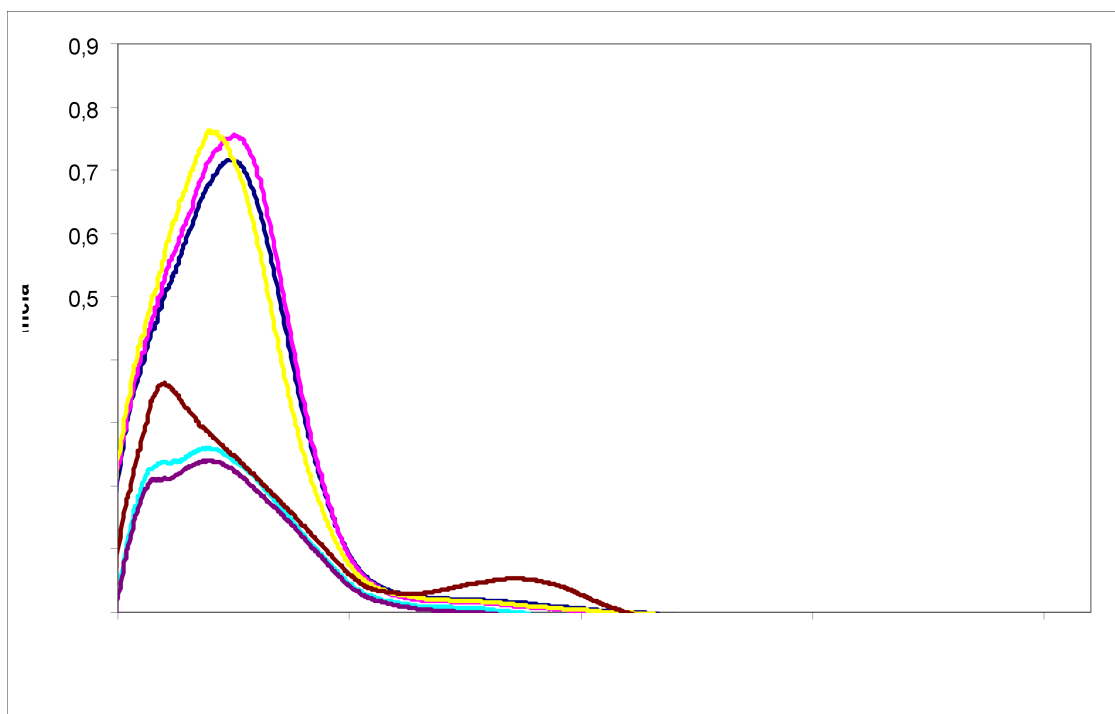


Figura 5. Espectros de absorci3n a diferentes pH. Gin HIRAM WALKER. pH1 (azul), pH3 (fucsia), pH5 (amarillo), pH7 (turquesa), pH9 (violeta), pH12 (marr3n)

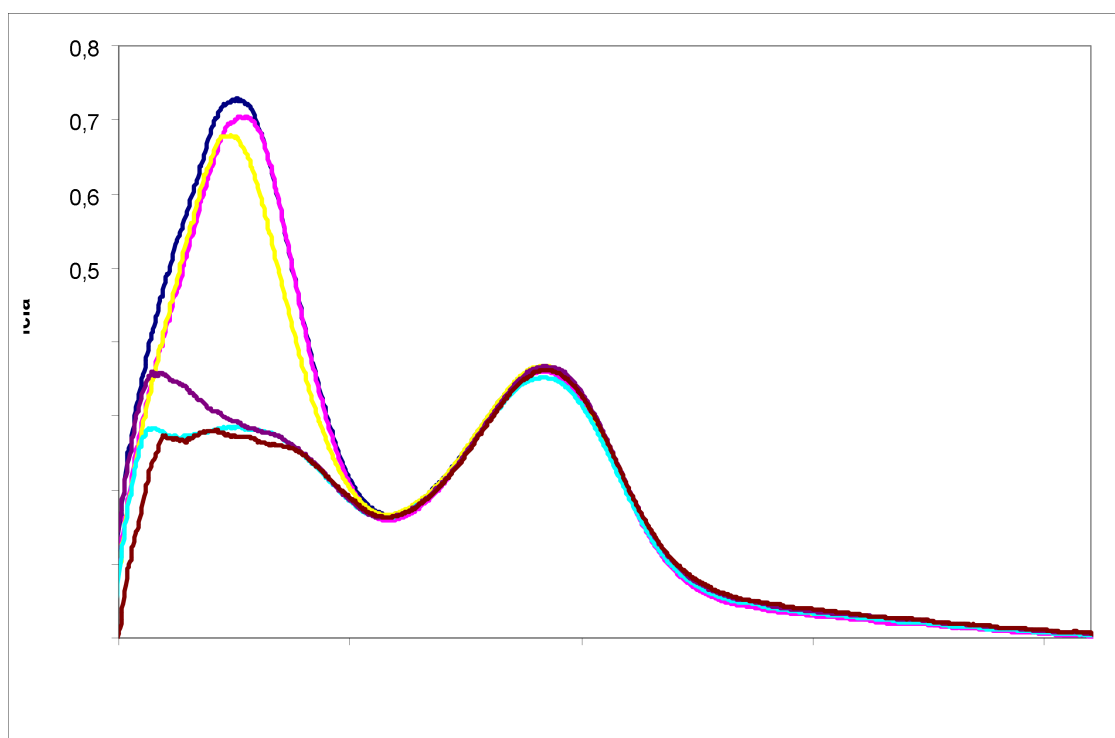


Figura 6. Espectros de absorci3n a diferentes pH. Ginebra BOLS. pH1 (azul), pH3 (fucsia), pH5 (amarillo), pH7 (turquesa), pH9 (violeta), pH12 (marr3n)

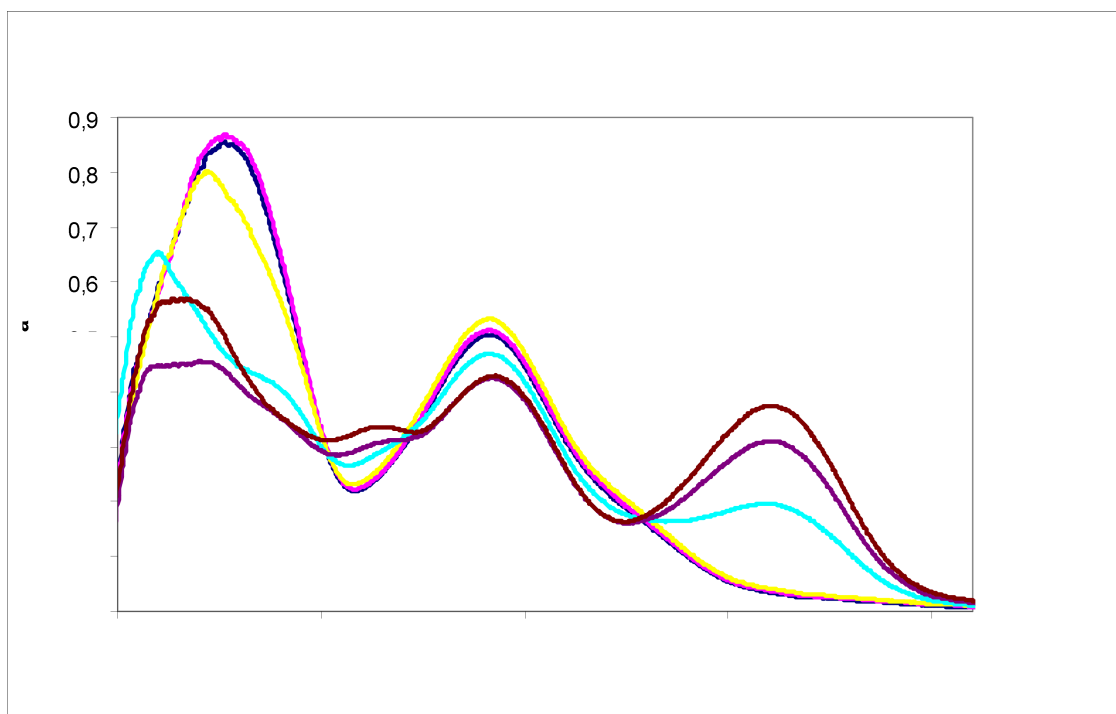


Figura 7. Espectros de absorci3n a diferentes pH. Padilla cubana sello verde. pH1 (azul), pH3 (fucsia), pH5 (amarillo), pH7 (turquesa), pH9 (violeta), pH12 (marr3n)

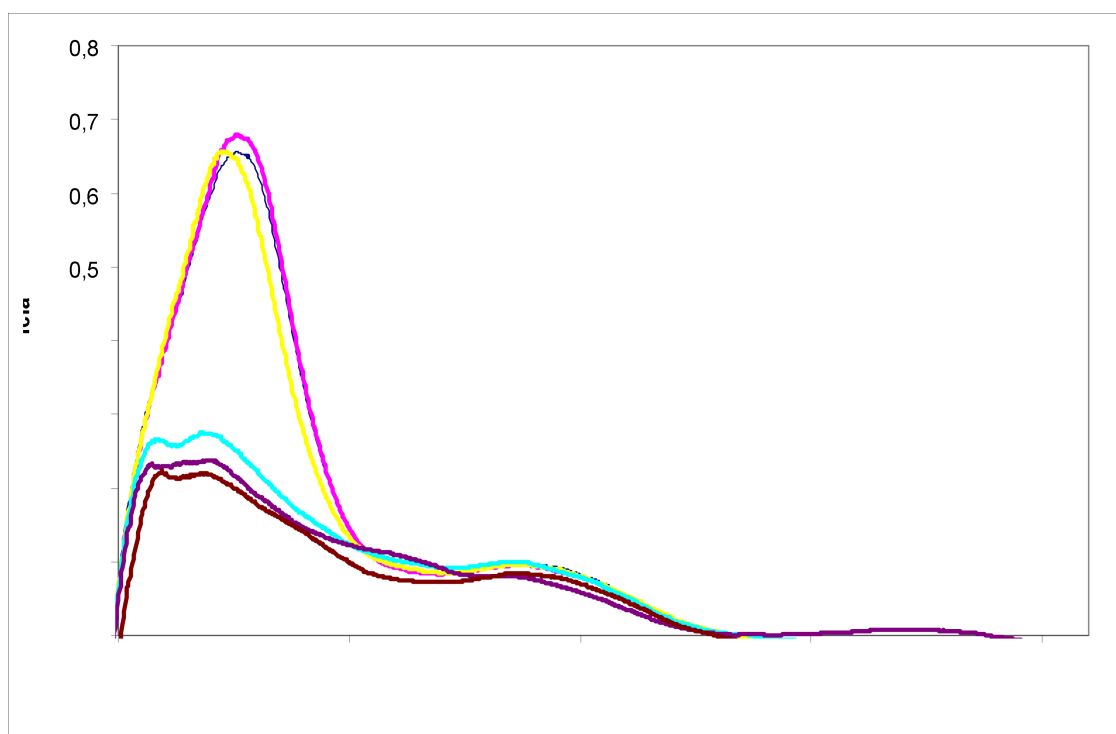


Figura 8. Espectros de absorci3n a diferentes pH. Ron Baccardi. pH1 (azul), pH3 (fucsia), pH5 (amarillo), pH7 (turquesa), pH9 (violeta), pH12 (marr3n)

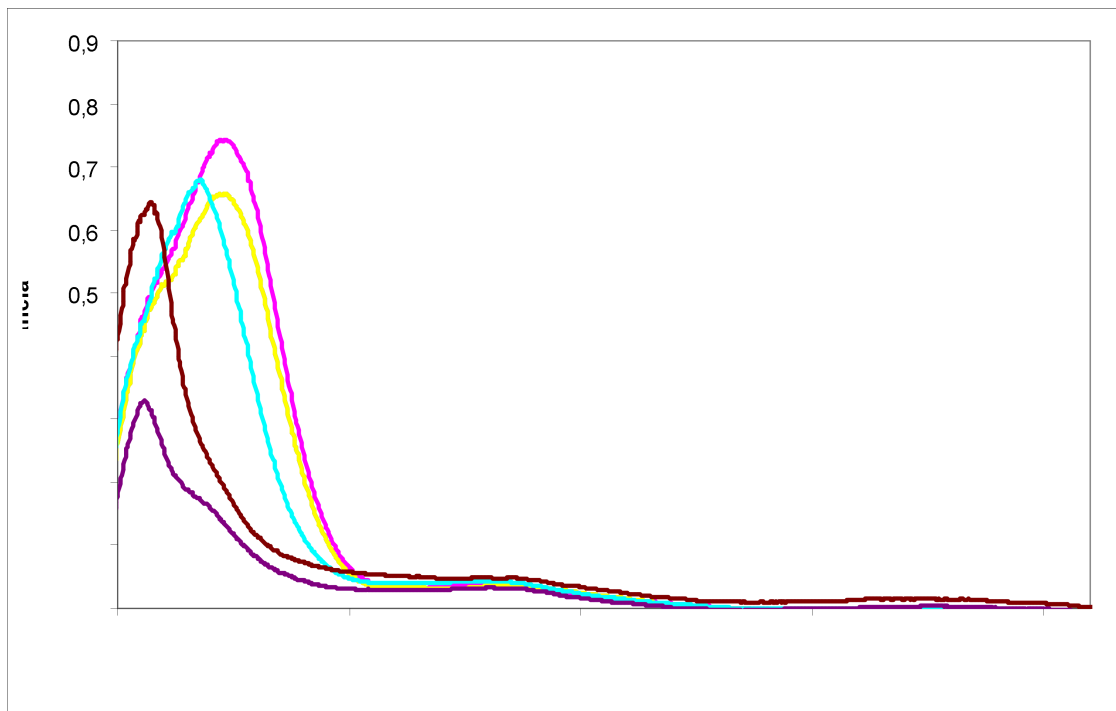


Figura 9. Espectros de absorci3n a diferentes pH. Ron Castillo. pH1 (azul), pH3 (fucsia), pH5 (amarillo), pH7 (turquesa), pH9 (violeta), pH12 (marr3n)

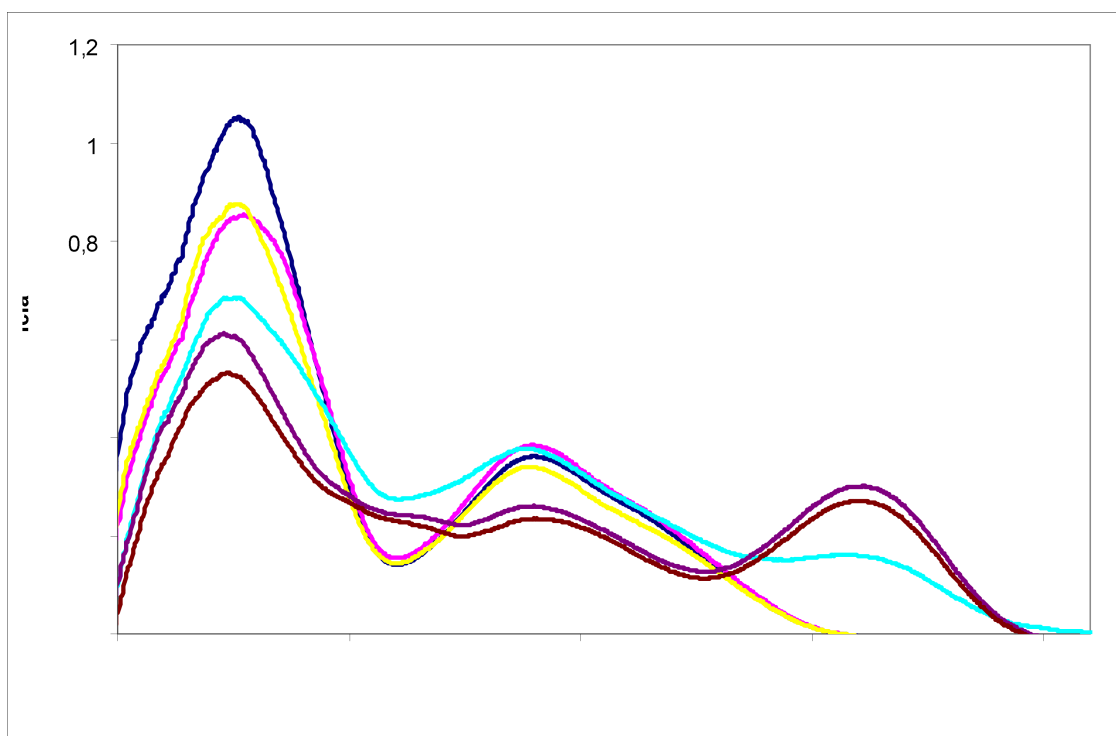


Figura 10. Espectros de absorci3n a diferentes pH. Ron Tropic Club. pH1 (azul), pH3 (fucsia), pH5 (amarillo), pH7 (turquesa), pH9 (violeta), pH12 (marr3n)

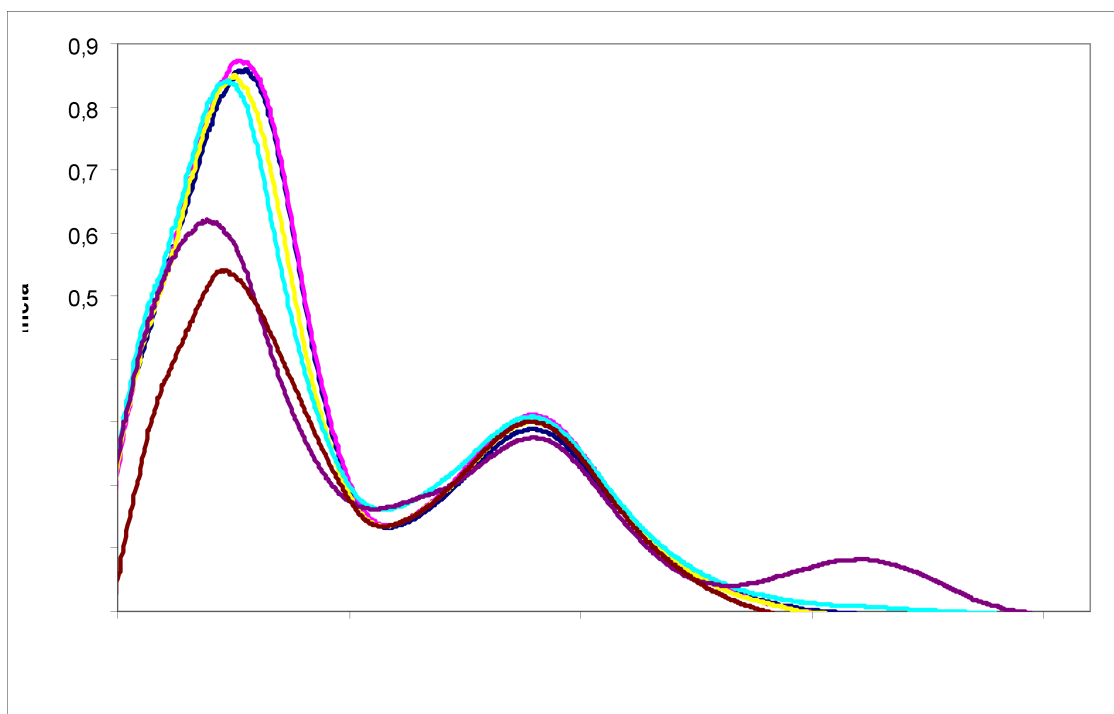


Figura 11. Espectros de absorción a diferentes pH. Tequila Conquistador de México. pH1 (azul), pH3 (fucsia), pH5 (amarillo), pH7 (turquesa), pH9 (violeta), pH12 (marrón)

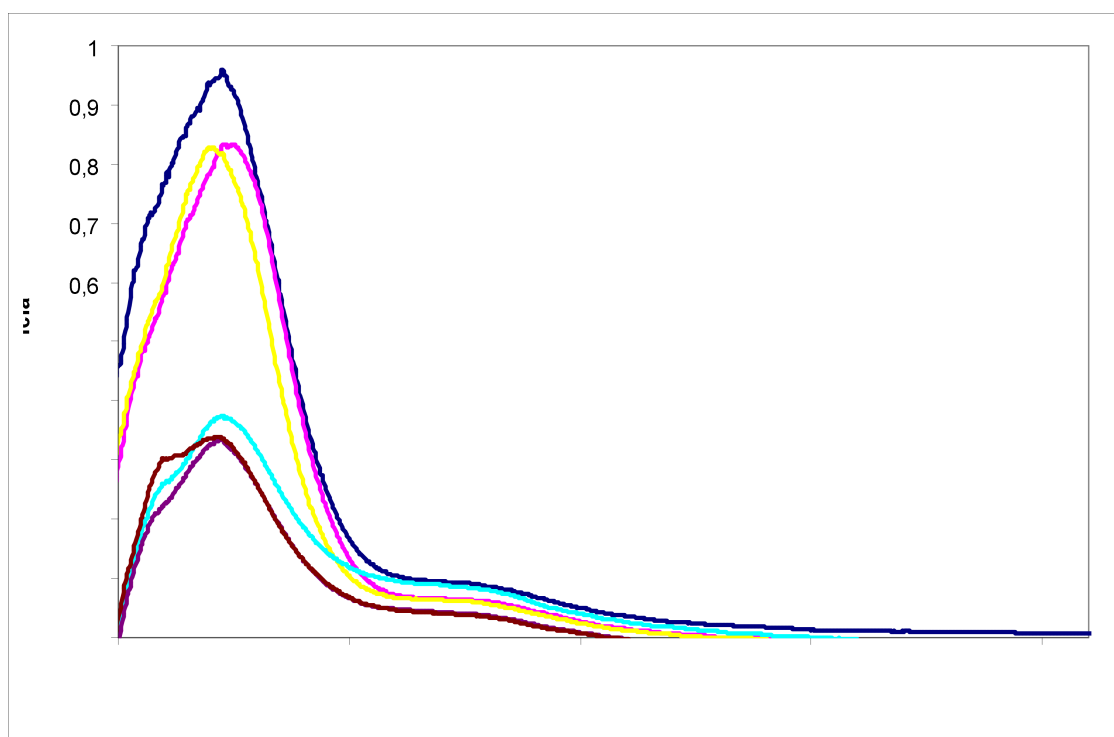


Figura 12. Espectros de absorción a diferentes pH. Vodka Nita. pH1 (azul), pH3 (fucsia), pH5 (amarillo), pH7 (turquesa), pH9 (violeta), pH12 (marrón)

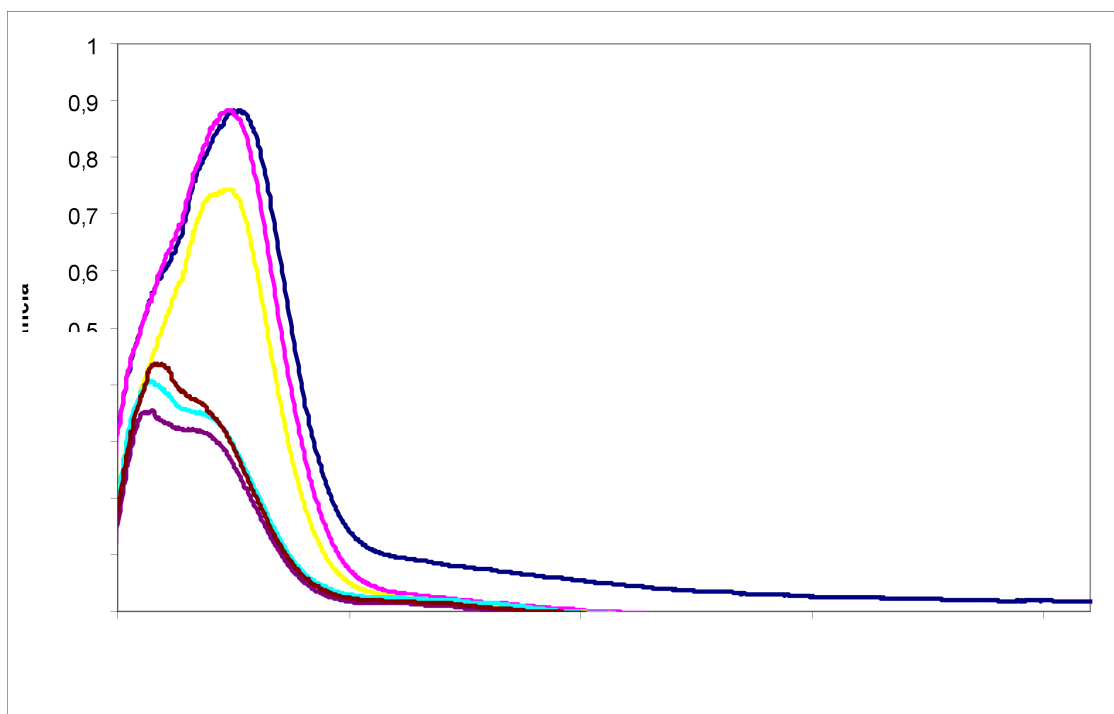


Figura 13. Espectros de absorción a diferentes pH. Vodka Moskovskaya. pH1 (azul), pH3 (fucsia), pH5 (amarillo), pH7 (turquesa), pH9 (violeta), pH12 (marrón)

Al observar los espectros del Gin Hiram Walker, el ron Baccardi, el ron Castillo y los vodkas Nita y Moskovskaya se distingue únicamente la primera zona (190-240 nm.) y la completa desaparición de las otras dos. Esta observación se distingue mejor a pH 12. De esta manera, puede suponerse que los componentes mayoritarios de estas bebidas son agua y etanol.

Para realizar una comparación, se preparó una solución de alcohol comercial al 40% y se midió su absorbancia a pH 12 (figura 14). El espectro obtenido es similar al de las cinco bebidas mencionadas, lo cuál se pone de manifiesto al superponer todos los espectros (figura 15).

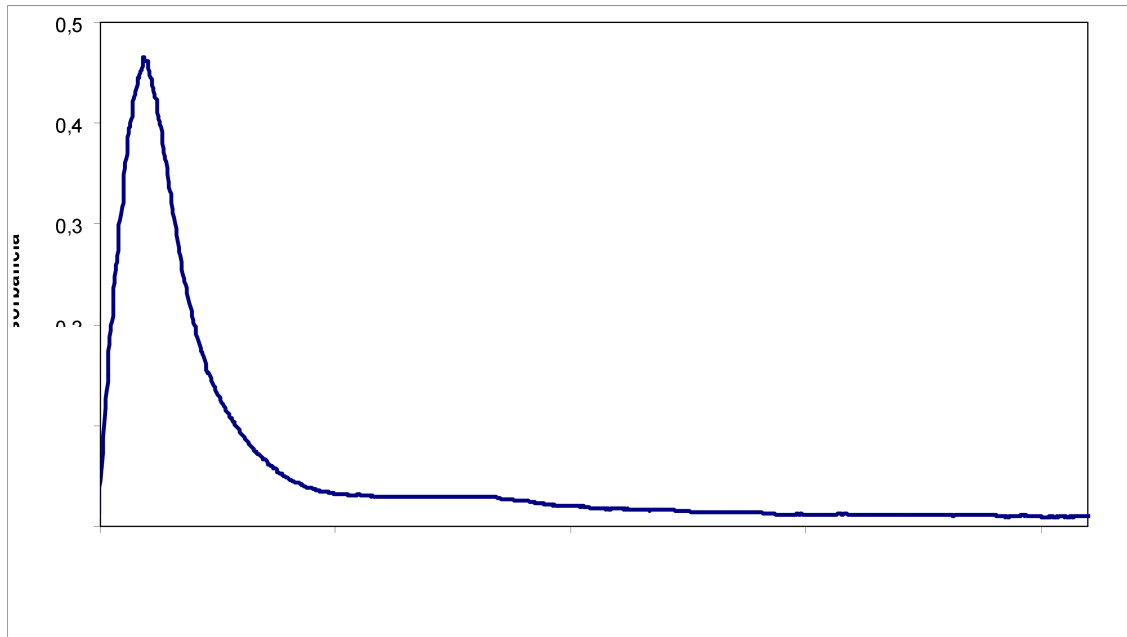


Figura 14. Espectro de absorci3n de una soluci3n de alcohol al 40% a pH12.

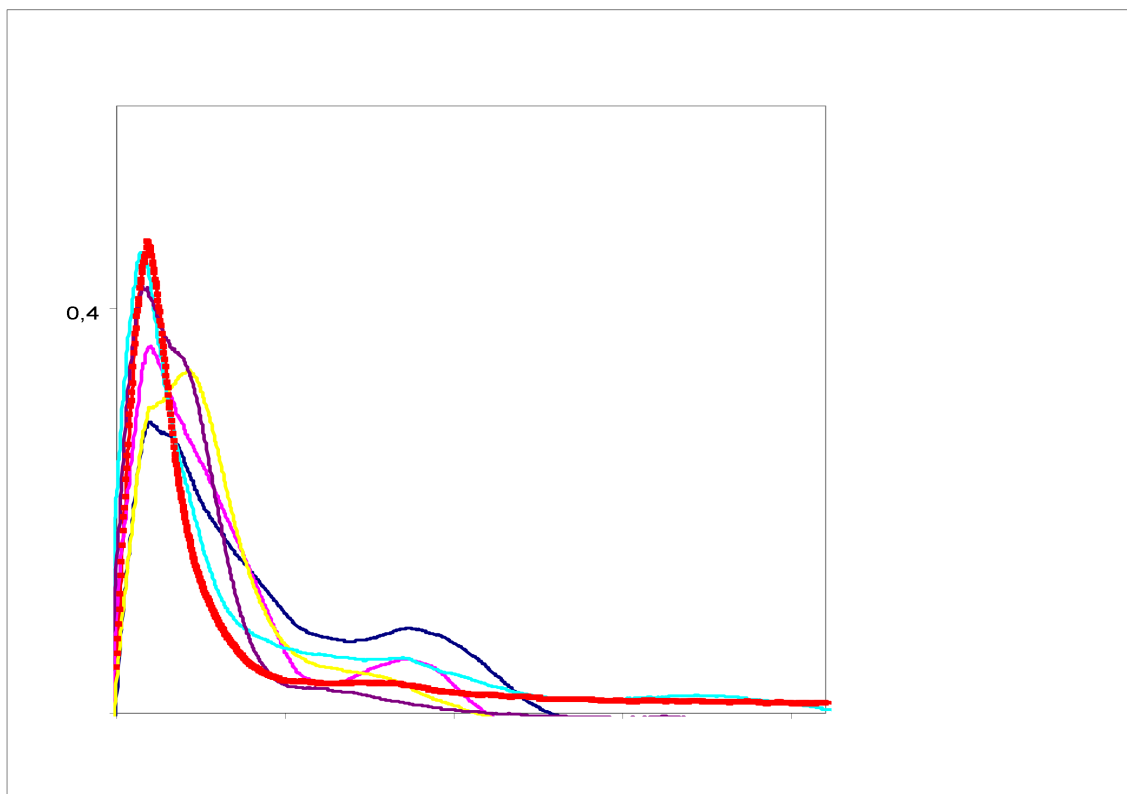


Figura 15. Comparaci3n de espectros de absorci3n a pH 12 de: alcohol40% (rojo) Gin HIRAM WALKER (fucsia), Ronas BACARDI (azul) y CASTILLO (turquesa) y Vodkas NITA(amarillo) y MOSKOVSKAYA (violeta)

3.2. ANÁLISIS MULTIVARIADO

3.2.1. Análisis de componentes principales (PCA)

La figura 16 muestra el gráfico de *scores*. En él puede observarse el agrupamiento de las bebidas analizadas en función de los componentes principales.

Es posible distinguir dos grupos bien diferenciados:

- El primero constituido por dos bebidas (ginebra BOLS y el tequila CONQUISTADOR DE MÉXICO) que presentan dos zonas de absorbancia en sus espectros, correspondientes a los 190-240 nm y la de 240-300 nm.

El segundo formado por cinco bebidas (Gin HIRAM WALKER, Ron BACARDI, Ron CASTILLO, Vodka MOSKOVSKAYA y vodka NITA), cuyos espectros sólo presentan absorbancia en el rango 240-300 nm y que son semejantes al del alcohol al 40%.

Por su parte las bebidas Ron TROPIC CLUB y Padilla SELLO CUBANO, que son bebidas cuyos espectros presentan tres rangos de absorbancia (190-240, 240-300 y 300-400 nm) se encuentran en el extremo inferior derecho del gráfico formando grupos individuales.

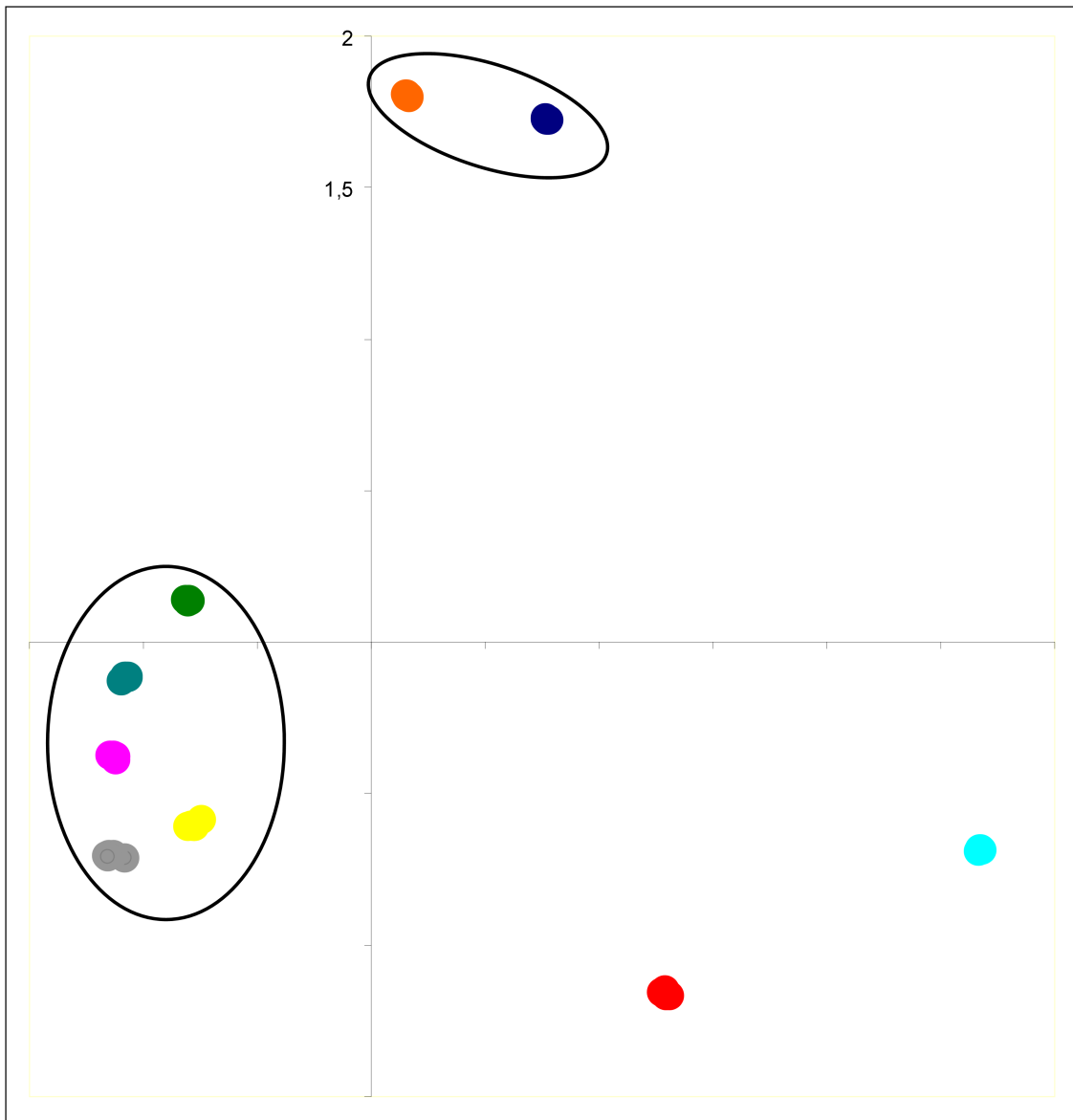


Figura16 Grafico de scores del modelo PCA. Ginebra BOLS (azul), Ron BACARDI (verde), Gin HIRAM WALKER (verde azulado), Padilla SELLO CUBANO (turquesa), Ron CASTILLO (amarillo), Ron TROPIC CLUB (rojo), Tequila CONQUISTADORES DE MÉXICO (naranja), Vodka NITA (fucsia) y Vodka MOSKOVSKAYA (gris).

3.2.2. Varianza explicada

El modelo obtenido requirió solamente dos componentes principales para explicar el 100% de la información inicial relevante del sistema analítico en estudio. Esto se puede observar en la figura 16 donde se puede observar el % de varianza explicada en función del número de componentes principales en el modelo PCA.

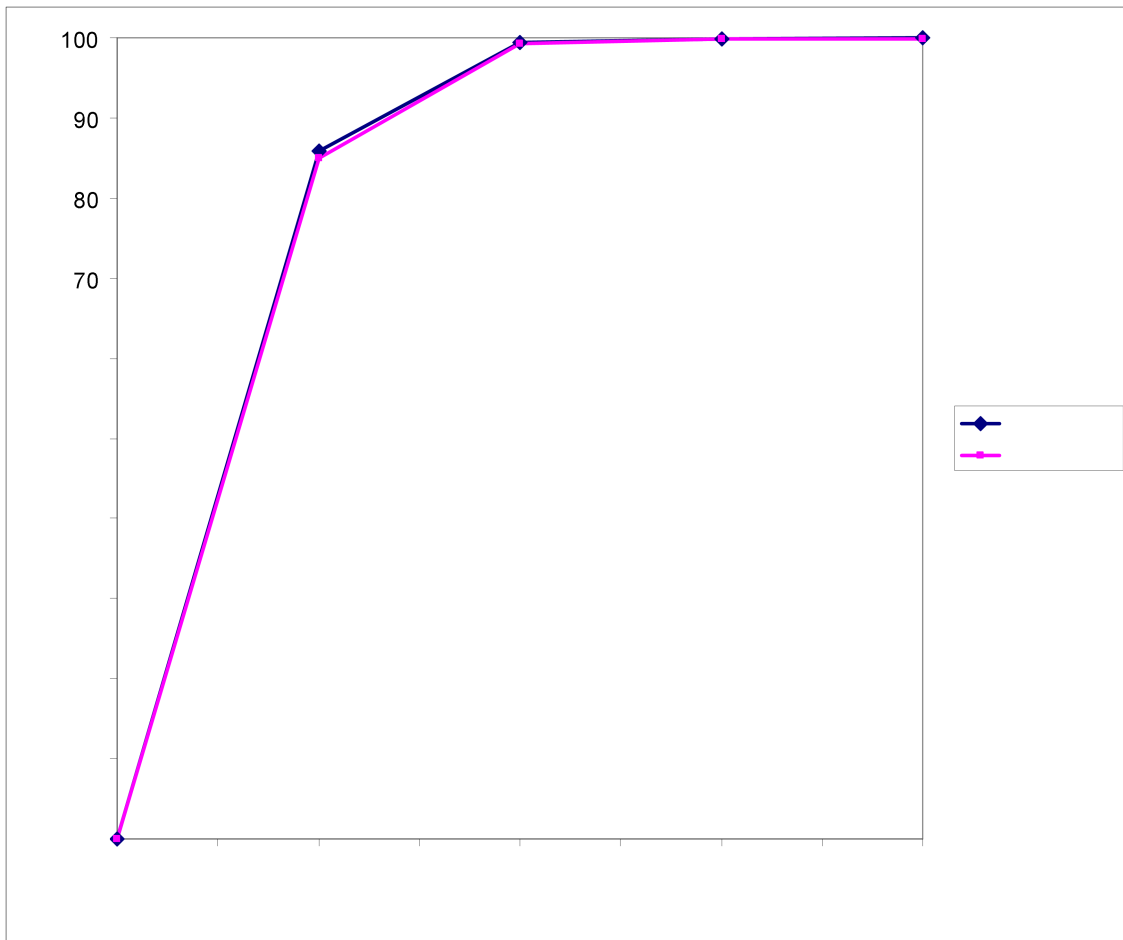


Figura 16. Porcentaje de varianza explicada.

3.2.3. Análisis de Clusters

En la figura 17 se puede apreciar el análisis de agrupamientos para las bebidas analizadas. Se observa una clara discriminación entre los diferentes tipos y marcas de bebidas. En la figura puede observarse que, al igual que en el modelo PCA, los rones Baccardi y Castillo, el gin Hiram Walker y los vodkas Nita y Moskovskaya, conforman una única gran familia en la mitad superior del gráfico, mientras que el resto de las bebidas presentan una discriminación mas individualizada en la mitad inferior del mismo.

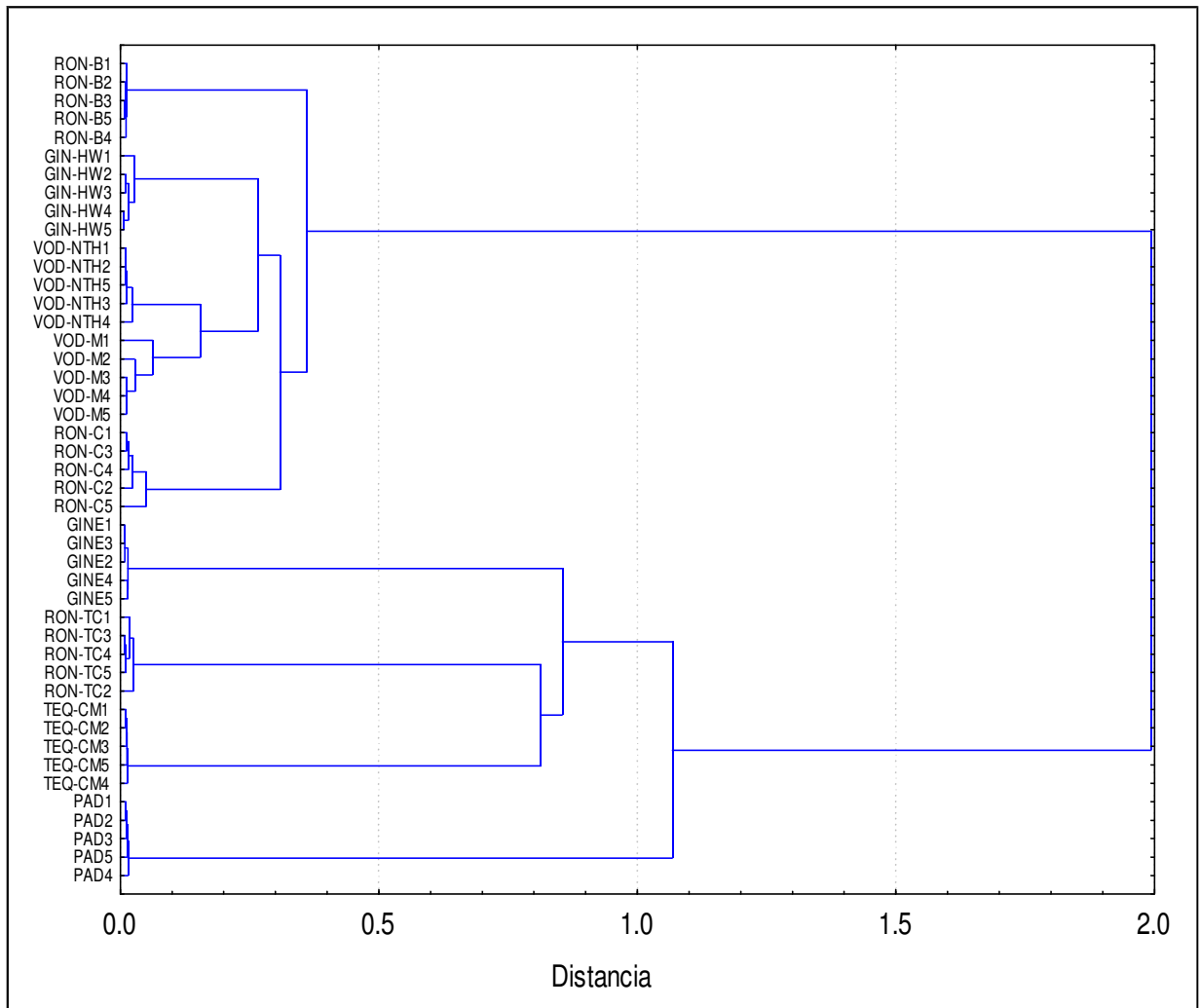


Figura 17. Dendrograma de las diferentes bebidas analizadas

3.2.4 LDA utilizando categorías independientes. Tabla de clasificación cruzada

En la tabla 4 se puede apreciar el grado de clasificación obtenido empleando análisis discriminante lineal como método multivariado de clasificación supervisado. En la primera columna y primera fila se detallan nueve grupos, cada uno de los cuales se corresponde a cada bebida analizada.

Lo que la tabla indica es cuántas de las cinco réplicas de cada bebida se clasificó correctamente. Por ejemplo, para el grupo 1 (Ron BACCARDI) sólo 1 de las cinco réplicas se clasificó correctamente, de manera que el error porcentual es del 80%. Cuando el error porcentual es igual a cero, se logró una clasificación correcta.

Grupo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Total	Error (%)
1.00	1	0	0	0	1	0	0	3	0	5	80
2.00	0	4	0	0	0	0	1	0	0	5	20
3.00	0	0	5	0	0	0	0	0	0	5	0
4.00	0	0	0	5	0	0	0	0	0	5	0
5.00	1	1	0	0	3	0	0	0	0	5	40
6.00	0	0	0	0	0	5	0	0	0	5	0
7.00	0	0	0	0	0	0	5	0	0	5	0
8.00	1	0	0	0	0	0	0	4	0	5	20
9.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0
Total	3	5	5	5	4	5	6	7	5	0	17,78

Tabla 4. Tabla de clasificación cruzada

Grupos: 1 = Ron Baccardi; 2 = Gin-Hiram walter; 3 = Ginebra Bols; 4 = Padilla Cubana Sello Verde; 5 = Ron Castillo; 6 = Ron Tropic Club; 7 = Tequila Conquistador de México; 8 = Vodka Nita; 9 = Vodka Moskovskaya

3.2.5 LDA utilizando categorías según PCA y CA

En la tabla 5 se realizó un nuevo análisis discriminante lineal, pero en esta ocasión se consideraron dentro de un mismo grupo todas aquellas bebidas cuya clasificación no fue correcta en el análisis anterior (es decir, aquellas bebidas que tuvieron errores porcentuales diferentes a cero). Dicho agrupamiento, permitió una correcta clasificación, lográndose para cada grupo un error porcentual igual a cero.

Grupo	1	2	3	4	5	Total	Error (%)
1	5	0	0	0	0	5	0
2	0	25	0	0	0	25	0
3	0	0	5	0	0	5	0
4	0	0	0	5	0	5	0
5	0	0	0	0	5	5	0
Total	5	25	5	5	5	45	0

Tabla 5. Tabla de clasificación cruzada

Grupos: 1 = Ginebra 2 = Ron Baccardi + Gin-Hiram Walker + Ron Castillo + Vodka Nita + Vodka Moskovskaya; 3 = Padilla ; 4 = Ron-Tropic Club ; 5 = Tequila

A partir de los modelos obtenidos mediante análisis discriminante lineal, sumado al análisis por PCA, CA y análisis de espectros, se deduce que el grupo 2 es un grupo de bebidas no identificable, cuyo espectro simple hace suponer que se tratan de bebidas obtenidas por simple dilución de etanol.

CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se ha realizado de manera exitosa, la clasificaci3n multivariada de diferentes bebidas destiladas. Las metodologías analíticas clásicas de control de calidad, requieren de elevados tiempos de análisis y elevado costo, tal como la cromatografía de gases. En funci3n de lo expuesto, se pueden arribar a las siguientes conclusiones:

- La utilizaci3n de absorciometría molecular UV en combinaci3n con herramientas multivariadas tales como PCA, CA y LDA, ha permitido la correcta clasificaci3n de tres grandes grupos de bebidas, clasificadas segun su composici3n.
- Basados en lo anterior, esta metodología resulta de gran importancia para la detecci3n de fraudes, falsificaciones y adulteraciones de bebidas blancas, sobre todo aquellas de elevados precios (como por ejemplo el Tequila Mexicano, Ron Cubano, etc.).
- Por otra parte, se ha hallado la existencia de un grupo importante de bebidas, cuyos espectros son similares al del alcohol comercial. Esto hace suponer de que se tratan solamente de bebidas fabricadas por simple diluci3n de etanol, sin más procesamiento previo, sin que ello signifique necesariamente fraude, ya que el CAA deja abierta en ciertos casos, esa posibilidad.
- Esta última suposici3n puede comprobarse mediante el uso de diluciones isotópicas (Espectrometría de Masa) que permita determinar el origen del alcohol empleado para la fabricaci3n de las bebidas.

Por todo lo expuesto, se puede concluir que la metodología propuesta, resulta ser econ3mica y evita importantes demoras de tiempo, aspecto crucial para una rápida comercializaci3n de productos de importaci3n.

CAPÍTULO 5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Muñoz de Cote Orozco, J. Las bebidas alcohólicas en la historia de la humanidad. Rev AAPAUNAM Academia, Ciencia y Cultura, Legión de Honor de México. 42-52. 2010.
- [2] Alan H. Vernam, Jane P. Sutherland. Bebidas: Tecnología, Química y Microbiología. Serie 2 Alimentos Básicos. Acribia, S.A. 1994.
- [3] Albert L. Lehninger. Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular. Segunda edición. Edición Omega, S.A. 1978
- [4] Código Alimentario Argentino (CAA). Capítulo XIV: Bebidas espirituosas, Alcoholes, Bebidas Alcohólicas Destiladas y Licores.
- [5] Scribd.com. Mayo, 2012. <http://es.scribd.com/doc/79644947/Capitulo-2-Whisky-Ginebra-y-Vodka> .
- [6] Barbosa García, O.; Ramos-Ortiz G.; Maldonado J. L.; Pichardo-Molina J. L.; Meneses-Nava M. A.; Landgrave J.E.A.; Cervantes –Martinez J. UV-Vis absorption spectroscopy and multivariate analysis as a method to discriminate tequila. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 66 129-134. 2007.
- [7] La ruta del Tequila en el Paisaje Agavero. Jalisco, México. Mayo, 2012. <http://www.rutadeltequila.org.mx/es/iniciomenu/procespelaboracionmenu.html>.
- [8] Zayas, P. E.; Hernández Sainz, D. Autenticidad de Alimentos y Quimiometría. Revista Estudiantil Nacional de Ingeniería y Arquitectura, 1 (4) 2010.
- [9] 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.

- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] Urbano-Cuadrado M.; Luque de Castro, M. D.; Pérez-Juan, P. M.; García-Olmo. J. 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.
- [13] Cozzolino, D.; Smyth, H. E.; 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*, vol. 51, 7703–7708. 2003.
- [14] 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 Agriculture and Food Chemistry*, 51 (21) 6233-6239. 2003.
- [15] MacKenzie, W. M. and Aylott, R. I. Analytical strategies to confirm Scotch whisky authenticity. Part II: Mobile brand authentication. *The Analyst*, 129 (7) 607 – 612. 2004.
- [16] Spectroscopic & Analytical Developments. Mayo, 2012. <http://www.spectroscopic.co.uk/brandauthenticator.html>.
- [17] 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*. Vol 107, No. 105. 315-331. 2001.
- [18] Aguilar-Cisneros, B.O.; López, M.; Richling, E.; Heckel, F.; Shreier, P. Tequila authenticity assessment by headspace SPME-HRGC-IRMS analysis of ¹³C/¹²C and ¹⁸O/¹⁶O ratios of ethanol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 7520- 7523. 2002.

- [19] Bauer-Christoph, C. Authentication of tequila by gas chromatography and stable isotope ratio analyses. *European Food Research and Technology*, 217, 438–443. 2003.
- [20] 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.
- [21] Lachenmeier, D.; Schmidt, B. and Bretschneider, T. Rapid and mobile brand authentication of vodka using conductivity measurement. *Microchimica Acta*, 160, 283–289. 2008.
- [22] Wold, S and Eriksson, L. in: H. Van der Waterbeemd Ed. “Chemometric Method in Molecular Design”. VCH Weinheim. Germany. 1995.
- [23] 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.
- [24] Beebe, K.; Pell, R. and Seasholtz, M. “Chemometrics, a Practical Guide”. John Wiley and Sons. New York. 1998.
- [25] Esbensen, K.; Schönkopf, S. and Midgaard, T. “The Unscrambler. Multivariate Analysis in Practice”. CAMO-AS. Norway. 1997.
- [26] 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.
- [27] Smadja, J.; Shum Cheong Sing, A. and Gaydou, E.M. Differentiation of Reunion Aged Rums by Physical and Chemical Parameters. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 27 (2) 133- 141. 1994.
- [28] Shum Cheong Sing, A.; Smadja, J. and Gaydou, E.M. Criteria selection for classification of reunion aged rums. *LWT - Food Science and Technology*, 28 (1) 123-128. 1995.
- [29] Da Costa R.S.; Santos, S.R.B.; Almeida, L.F.; Nascimento, E.C.L.; Pontes, M.J.C.; Lima, R.A.C.; Simões, S.S. and Araújo, M.C.U. A novel strategy to verification of

adulteration in alcoholic beverages based on Schlieren effect measurements and chemometric techniques. *Microchemical Journal* 78, 27– 33. 2004.

[30] Nascimento E.C.L.; Araujo, M.C.U. and Galṽao, R.K.H. A Flow-Batch for UV-Vis Spectrophotometric Detection of Adulteration in Distilled Spirits. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 22, 1061-1067. 2011.

[31] Meites, L. “Handbook of analytical chemistry”. Mc Graw-Hill, New York. 1982.