



**UNIVERSIDAD DEL AZUAY**  
**FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA**  
**ESCUELA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS**

**“DETERMINACIÓN DE ALCOHOL, ACIDEZ Y  
AZÚCARES EN BEBIDAS ALCOHÓLICAS MEDIANTE  
ESPECTROSCOPIA INFRARROJA”**

**TRABAJO DE GRADUACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE  
INGENIERÍA EN ALIMENTOS**

**AUTORES:**

**VICTORIA VERÓNICA PLAZA NAULA**

**EUN JOO SUNG KWAK**

**DIRECTOR:**

**PIERCOSIMO TRIPALDI**

**CUENCA – ECUADOR**

**2011**

## **DEDICATORIA**

Dedicamos este trabajo a nuestros padres por ser el apoyo, la comprensión y el impulso de todos los días para superarnos como personas y llegar a ser buenos profesionales.

## **AGRADECIMIENTO**

Agradecemos de forma más sincera al Doctor Piercósimo Tripaldi, por brindarnos siempre su apoyo y conocimientos de manera desinteresada; por tal motivo hemos podido culminar el presente trabajo de graduación.

## **RESUMEN**

Para la determinación de modelos de calibración en la determinación de alcohol, azúcares y acidez en bebidas alcohólicas mediante la espectroscopia FTIR-ATR. La técnica infrarroja que combina la obtención de espectros de alta calidad mediante la Transformada de Fourier con la Reflexión Atenuada es bien establecida a pesar que en el campo del análisis de los alimentos es más utilizada en el campo de Infrarrojo cercano. De los espectros obtenidos se ha utilizado el campo entre  $4000$  y  $700\text{ cm}^{-1}$ . Se han seleccionado las mejores bandas para cada modelo mediante algoritmo genético implementado por el software Moby Digs el mismo que ha permitido validar los tres modelos mediante BOOSTRAP.

03/10/11  
Eun Joo Sung Kwak

**DETERMINATION OF ALCOHOL, ACID AND SUGAR IN ALCOHOLICS  
DRINKS WITH INFRARED SPECTROSCOPY**

**ABSTRACT**

The purpose of this study was to determinate calibration models for identifying alcohols, sugars and acidity in alcoholic beverages by FTIR-ATR spectroscopy. The infrared technique which combines the production of high quality spectra using the Fourier Transform Attenuated Reflection is well established in food analysis and is **often** used in the near infrared spectrum. Spectra were obtained at frequency fields from 4000 to 700 cm<sup>-1</sup>. The characteristics bands for each model were selected using genetic algorithm implemented by Moby Digs software. The models obtained were validated using Bootstrap.

AUTORAS:

  
Victoria Veronica Plaza Naula

  
Eun Joo Sung Kwak

DIRECTOR:

  
Piercósimo Tripaldi Capelleti

Revisado por:

María Elena Cazor, Ph.D  
03-10-2011

  
M. E. Cazor

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

Contenido	Página
Dedicatoria.....	ii
Agradecimiento.....	iii
Resumen.....	iv
Abstract.....	v
Índice de contenidos.....	vi
Índice de tablas.....	vii
Índice de Abreviaturas.....	viii
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>CAPITULO I: BEBIDAS ALCOHÓLICAS</b>	
1.1. Generalidades.....	3
1.2. Componentes principales de las bebidas alcohólicas.....	6
1.2.1. El Agua.....	6
1.2.2. El Alcohol.....	6
1.2.3. El Azúcar.....	7

1.3. Bebidas Alcohólicas en el comercio.....	8
1.3.1. Aguardiente.....	8
1.3.2. Ron.....	10
1.3.3. Vino.....	12
1.3.4. Vodka.....	15
1.3.5. Whisky.....	16

## **CAPITULO II: SELECCIÓN DE LA MUESTRA.**

2.1. Levantamiento de información Primaria.....	17
2.1.1. Recopilación y tratamiento estadístico de datos.....	25
2.1.2. Resultados y análisis de información.....	31

## **CAPITULO III:MÉTODOS ANALÍTICOS CLÁSICOS PARA BEBIDAS ALCOHOLICAS**

3.1. Determinación de acidez.....	33
3.2. Azúcares reductores.....	34
3.3. Gascromatografía.....	36

**CAPITULO IV: ESPECTROSCOPIA INFRARROJA.**

4.1. Introducción.....	41
4.1.1. Radiación electromagnética.....	42
4.1.2. Absorción infrarroja.....	47
4.1.3. Modelos normales de vibración.....	49
4.2. Método Experimental.....	51
4.2.1. Fourier-método de reflexión.....	51
4.2.2. Métodos de reflectancia.....	53

**CAPITULO V: MÉTODOS DE CALIBRACIÓN.**

5.1. Métodos de calibración multivariante aplicadas a técnicas espectroscópicas.....	55
5.1.1. Preparación de la matriz de datos.....	56
5.1.2. Métodos de construcción de modelos de predicción.....	59
5.2. Regresión de componentes principales.....	59
5.2.1. Calibración mediante regresión en componentes principales PCR.....	59
5.2.2. Método de calibración por regresión partial least squares PLS.....	60

5.2.3. Selección de las mejores longitudes de onda mediante algoritmo genético y posterior regresión por mínimos cuadrados ordinarios.....60

**CAPITULO VI: MÉTODO DE SELECCIÓN DE MUESTRAS PARA SET TEST.**

6.1. Métodos de validación.....64

6.1.1. Definición y tipos de métodos de validación.....64

6.1.2. Método interno y externo de validación.....65

6.1.3. Método de Bootstrap.....65

6.1.4. Determinación del coeficiente de regresión cross validado mediante el set sintético externo.....66

6.1.5. Determinación del coeficiente de regresión cross validado mediante un set real externo.....66

6.2.Resultados y Discusión.....68

**CONCLUSIONES**.....90

**BIBLIOGRAFÍA**.....91

**ANEXOS**.....93

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Tabla 1.2.3. Porcentajes de azúcares en diferentes bebidas alcohólicas.....	8
Tabla 1.3.3. Principales Ácidos de los Vinos.....	13
Tabla 2.1.1. Resultados para determinar el tamaño de la muestra.....	18
Figura 3.3. Diagrama de un cromatógrafo de gases.....	36
Figura 3.3.1 Inyector de muestra para un GC.....	39
Figura 4.1.1. Radiación Electromagnética.....	43
Figura 4.1.1.1 Ondas electromagnéticas.....	44
Tabla 4.1.1.2 Espectro electromagnético.....	46
Figura 4.1.1.3 Ilustración de los niveles discretos de energía cuantizada.....	47
Figura 4.1.2 Cambio en el momento dipolar de la molécula.....	48
Figura 4.1.3. Vibraciones de tensión y vibraciones de flexión.....	51
Figura 4.2.1. Infrarrojo de Fourier.....	52
Tabla 6.2. Porcentajes para la preparación de muestras sintéticas.....	68
Gráfico 6.2.1. Espectros recogidos de muestras de soluciones sintéticas.....	69
Tabla 6.3.1. Bandas seleccionadas por el algoritmo genético en la determinación de acidez.....	70

Tabla 6.3.1.1. Parámetros de calidad del modelo en la determinación de acidez.....	70
Gráfico 6.3.1. Correlación entre el contenido experimental y predicho por el modelo en la determinación de acidez.....	71
Gráfico 6.3.1.1. Distribución de muestras patrón vs Distribución de residuos normalizados en la determinación de acidez.....	72
Gráfico 6.3.1.2. Distribución de los Residuos normalizados en la determinación de acidez.....	73
Tabla 6.3.2. Bandas seleccionadas por el algoritmo genético en la determinación de alcohol.....	73
Tabla 6.3.2.1. Parámetros de calidad del modelo en la determinación de alcohol.....	74
Gráfico 6.3.2. Correlación entre el contenido experimental y predicho por el modelo en la determinación de alcohol.....	74
Gráfico 6.3.2.1. Distribución de muestras patrón vs Distribución de residuos normalizados en la determinación de alcohol.....	75
Gráfico 6.3.2.2. Distribución de los residuos normalizados en la determinación de alcohol.....	76
Tabla 6.3.3. Bandas seleccionadas por el algoritmo genético en la determinación de azúcares.....	76
Tabla 6.3.3.1. Parámetros de calidad del modelo en la determinación de azúcares.....	77
Gráfico 6.3.3. Correlación entre el contenido experimental y predicho por el modelo en la determinación de azúcares.....	78

Gráfico 6.3.3.1. Distribución de muestras patrón vs Distribución de residuos normalizados en la determinación de alcohol.....	79
Gráfico 6.3.3.2. Distribución de los residuos normalizados en la determinación de alcohol.....	79
Gráfico 6.3.4.1. Modelo de selección PLS en acidez.....	80
Gráfico 6.3.4.2. Residuo normal en PLS en acidez.....	81
Gráfico 6.3.4.3. Respuesta experimental vs Respuesta predictiva en acidez.....	81
Gráfico 6.3.5. Modelo de selección PLS en alcohol.....	82
Gráfico 6.3.5.1. Residuo normal en PLS en alcohol.....	82
Gráfico 6.3.5.2. Respuesta experimental vs Respuesta predictiva en alcohol.....	83
Gráfico 6.3.6. Modelo de selección PLS en azúcares.....	84
Gráfico 6.3.6.1. Residuo normal en PLS en azúcares.....	84
Gráfico 6.3.6.2. Respuesta experimental vs Respuesta Predictiva de azúcares.....	85
Gráfico 6.3.7. Respuesta Experimental vs Respuesta Predicción en acidez.....	86
Gráfico 6.3.7.1. Respuesta Experimental vs Respuesta en Predicción en alcohol.....	86
Gráfico 6.3.7.2. Respuesta Experimental vs Respuesta en Predicción en azúcares.....	87
Tabla 6.4. Valores de acidez de las bebidas alcohólicas seleccionadas.....	88
Tabla 6.4.1. Valores de alcohol de las bebidas alcohólicas seleccionadas.....	88
Tabla 6.4.2. Valores de azúcares de las bebidas alcohólicas seleccionadas.....	89

**TABLA DE ABREVIATURAS**

<b>Abreviatura</b>	<b>Correspondencia</b>
PLS	Partial Least Square (Mínimos Cuadrados Parciales)
PCR	Regresión de Componentes Principales
GA	Genetic Algorithm
N	Normalidad
GC	Cromatografía de gases
IR	Infrarrojo
FT-IR	Infrarrojo de transformada de Fourier
ATR	Reflectancia Atenuada Total
SNV	Standar Normal Variate

Plaza Naula Victoria Verónica

Sung Kwak Eun Joo

Trabajo de Graduación

Dr. Piercosimo Tripaldi

Junio, 2011

***DETERMINACIÓN DE ALCOHOL, ACIDEZ Y AZÚCARES EN BEBIDAS ALCOHÓLICAS MEDIANTE ESPECTROSCOPIA INFRARROJA.***

**INTRODUCCIÓN**

La industria de bebidas alcohólicas necesita disponer de métodos analíticos rápidos y fiables para poder controlar de forma eficiente tanto las materias primas como los productos intermedios o finales y, en un sentido amplio su proceso de fabricación.

Se puede describir que una bebida alcohólica es la que contiene alcohol etílico, azúcares superiores, saborizantes, aromatizantes, colorantes y otros aditivos permitidos, la calidad de estos depende del cuidado de su preparación, que consiste en que ninguna de esas sustancias quede en exceso ni en defecto, además de las sustancias empleadas en los mismos.

La espectroscopía infrarroja AFTR-ATR, es un tipo de espectroscopía de absorción que utiliza la región infrarroja del espectro electromagnético. Se basa en el hecho de que los enlaces químicos de las sustancias tienen frecuencias de vibración específicas, que corresponden a los niveles de energía de la molécula.

Industrialmente es utilizado como un método de investigación ya que es simple y confiable para realizar diferentes tipos de mediciones y controles de calidad; en la actualidad estos instrumentos son de fácil transportación por lo que son pequeños e incluso pueden ser utilizados para ensayos en terreno; con su tecnología se pueden medir con precisión las muestras en una solución debido al filtrado computacional y la manipulación de los resultados, algunos espectros indican automáticamente

qué sustancia está siendo analizada a través de miles de espectros de referencia almacenados en la memoria. Por lo cual la radiación infrarroja se subdivide en tres regiones: infrarrojo lejano, medio y cercano.

Se presentan métodos de análisis aplicables a las distintas necesidades que existen en el control de calidad de licores, utilizando como técnica la espectroscopía en el infrarrojo medio, implementada con métodos de calibración multivariable, se ha aplicado tanto en análisis cualitativo como en análisis cuantitativo.

La espectroscopía Infrarroja estudia las vibraciones de los enlaces covalentes de las moléculas. En el campo de energías estudiadas, los espectros son muy complejos en cuanto se superponen vibraciones propias de toda la molécula y vibraciones de enlaces singulares de las mismas, formando las así llamadas HUELLAS DIGITALES.

El enlace C-O de los alcoholes, de los ácidos y de los azúcares presenta una absorción entre  $1000$  y  $1200\text{ cm}^{-1}$ . Esta banda se superpone a la banda de los ésteres y de los ácidos lo que dificulta la utilización directa de su absorbancia para fines analíticos.

Esta dificultad puede ser obviada utilizando métodos de calibración multivariante que utilizan todas las energías (PCR, PLS) o seleccionada las frecuencias mejor correlacionadas con las concentraciones con un algoritmo genético y luego determinar el modelo de calibración mediante Mínimos Cuadrados multivariantes.

## CAPÍTULO UNO

### 1.1. Generalidades

#### Alcoholes

Los alcoholes son el grupo de compuestos químicos que resultan de la sustitución de uno o varios átomos de hidrógeno (H) por grupos hidroxilo (-OH) en los hidrocarburos saturados o no saturados.

El grupo funcional del alcohol es R-OH y su fórmula general es  $C_nH_{2n+1}OH$

#### Propiedades Generales

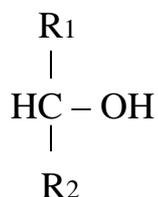
Son líquidos incoloros de baja masa molecular y de olor característico, son solubles en el agua en proporción variable y menos densa que la misma. Los puntos de ebullición se pueden considerar anormalmente altos si se relacionan con su masa molecular, pudiendo ser sólidos a temperatura ambiente.

Los alcoholes pueden ser primarios, secundarios o terciarios, en función del número de átomos de hidrógeno sustituidos en el átomo de carbono al que se encuentran enlazado el grupo hidroxilo. (<http://es.wikipedia.org/wiki/Alcohol>).

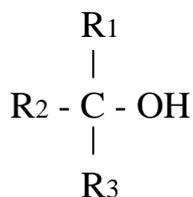
**Alcoholes Primarios.**- Un alcohol es primario si el átomo de hidrógeno (H) sustituido por el grupo oxidrilo (-OH) pertenece a un carbón (C) primario.



**Alcoholes Secundarios.**- Si el átomo de hidrógeno (H) sustituido por el grupo oxidrilo (-OH) pertenece a un carbón (C) secundario.



**Alcoholes Terciarios.**-Si el átomo de hidrógeno (H) sustituido por el grupo oxidrilo (-OH) pertenece a un carbón (C) terciario.



Los alcoholes primarios y secundarios son líquidos incoloros y de olor agradable, solubles en el agua en cualquier proporción y menos densos que ella. Los terciarios en cambio son todos los sólidos. (<http://www.textoscientificos.com/quimica/alcoholes>).

El alcohol más importante es el etílico o etanol, que es el compuesto al que nos referimos con frecuencia denominándole simplemente *alcohol*. Tiene importancia como disolvente industrial y farmacéutico y es un ingrediente activo de muchas bebidas y licores, el cual se forma en la fermentación de los zumos de frutas por la acción de las levaduras naturales, con formación de vinos y sidras.

### **Bebidas alcohólicas**

Las bebidas alcohólicas son todas aquellas que, por diversos procedimientos (fermentación, destilación, adición, extracción, etc.), presentan en su composición más de un 0,5% (vol/vol) de alcohol. Es decir son una solución de alcohol etílico (etanol) en proporciones variables mezclado con otras sustancias como agua, éteres y/o aldehídos.

Son diferentes los tipos de bebidas alcohólicas: licores, cervezas y vinos. Los licores se producen cuando la levadura se fermenta el azúcar de diferentes jugos de frutas o semillas. El azúcar al fermentarse se transforma en alcohol, este se destila para purificarse junto con otras sustancias que le otorgan distintos sabores y aromas que depende de la fuente de azúcar, por ejemplo: el whisky se hace del centeno, trigo, maíz o cebada; el ron, de la caña de azúcar; el cognac, del jugo de uva; y la ginebra del enebro. Los licores contienen grandes cantidades de alcohol, algunas veces más del 50%. (Elizondo, 2001).

Las bebidas alcohólicas contienen elementos nutritivos que aportan un valor alimenticio (principalmente calórico). No obstante, se pone en duda su consideración como alimento debido a la toxicidad de alcohol, así como a que dichas bebidas son potencialmente capaces de alterar el equilibrio de otros elementos de la dieta e incluso de desplazarlos. (López, Garibay, Quintero, 2004)

### **Clasificación de las bebidas alcohólicas**

En relación con el proceso fermentativo, se pueden clasificar las bebidas alcohólicas habituales de la manera siguiente:

- **Bebidas obtenidas por fermentación directa del azúcar del fruto**
  - **Vino.-** Resultado de la fermentación del mosto de uva.
  - **Sidra.-** Obtención por fermentación del mosto de manzana.
- **Bebidas obtenidas por fermentación del almidón:**
  - **Cerveza.-** Se prepara por fermentación de la malta.
  - **Sake.-** Resultado obtenido por la fermentación del arroz.
- **Bebidas obtenidas por destilación de líquidos fermentados:**
  - **Brandy/coñac.-** Son bebidas alcohólicas obtenidas por destilación del vino. El brandy es la denominación que se da en las zonas de habla inglesa, mientras que el coñac se obtiene en la región francesa de Cognac.
  - **Ron.-** Es el destilado obtenido del fermentado de caña de azúcar.
  - **Vodka.-** Se obtiene por destilado del fermentado de trigo, patata, centeno, remolacha o maíz.
  - **Whisky.-** Es el destilado del fermentado de varios cereales, entre ellos la cebada. (KUKLINSKY, Claudia).

Todas estas bebidas alcohólicas se definen por el grado de alcohol, que es el tanto por ciento de alcohol expresado en volumen (%v/v); es decir, los mililitros de etanol en 100ml de bebida. El grado de alcohol debe constar en el etiquetado del producto.

## **1.2. Componentes principales de las Bebidas Alcohólicas**

### **1.2.1. El Agua**

El agua es un cuerpo formado por la combinación de un volumen de oxígeno y dos de hidrógeno, cuya fórmula química es  $H_2O$ . Es líquida, inodora, insípida e incolora, disuelve muchas sustancias. Habitualmente la encontramos en estado líquido, aunque dependiendo de las condiciones de presión y temperatura, es usual hallarla en estado sólido o gaseoso. (Sánchez, 2003).

Para la elaboración de bebidas alcohólicas el agua es el elemento que entra en mayor proporción para su composición.

#### **El agua en la fabricación de Bebidas Alcohólicas**

La calidad del agua es un factor muy importante en la fabricación de bebidas alcohólicas, para evitar posterior enturbiamientos. El agua debe ser inodora, transparente e incolora y solo debe estar muy poca sustancia orgánica, ante todo no debe contener amoníaco ni ácido nitroso y a ser posible solo reducidas cantidades de compuestos clorados.

Una buena agua potable no es siempre absolutamente indicada para la fabricación. Para este fin se necesita principalmente un agua muy blanda, para tener la garantía que posteriormente no se enturbiará el producto acabado; estos enturbiamientos suelen formarse más tarde o más temprano por la precipitación de los compuestos de calcio y magnesio, carbonatos, sulfatos, etc.

### **1.2.2. Alcohol**

Se entenderá por alcohol ordinario o etílico el producto de la destilación de un líquido cualquiera que haya sufrido previamente la fermentación alcohólica.

El alcohol tiene la propiedad de reaccionar con los ácidos dando más o menos según y con el tiempo unos cuerpos llamados ésteres, ésteres salinos o cuerpos olorosos que son combinaciones de los ácidos con los alcoholes.

El alcohol puede mezclarse con cualquier proporción; con agua, al mezclar ambos líquidos se produce aumento o elevación de temperatura. Si se mezcla alcohol con nieve se verá que se funde rápidamente, pero como el alcohol desprendido es insuficiente para determinar esta fusión la nieve separa calor de los cuerpos cercanos, la temperatura puede rebajarse y producir un frío de 37°.

### **Clases de alcohol**

Entre las clases de alcoholes describimos los siguientes:

- a) **Alcohol de primera calidad.-** Con aproximadamente 96% en volumen; generalmente se fábrica con patatas, melaza y cereales. El alcohol de primera calidad es claro como el agua y tiene un elevado grado de pureza, de modo que se puede emplear muy bien para la fabricación de bebidas alcohólicas simples y muchos licores. Es la clase de alcohol más empleada en la actualidad para la fabricación de bebidas espirituosas.
- b) **Alcohol filtrado extrafino.-** Es un alcohol de primera calidad que después de su filtraje sobre carbón activo, se ha destilado nuevamente para eliminar con ello el aldehído que se ha formado en el tratamiento con carbón, ofreciendo así su mayor grado de pureza con respecto a su olor y sabor.
- c) **Alcohol absoluto.-** Es un producto casi anhidro, obtenido por un procedimiento especial y con materias deshidratantes. En la práctica no tiene ninguna importancia para el especialista en bebidas alcohólicas. (García, Muela, García).

### **1.2.3. El Azúcar**

Otra de las materias importantes para la industria de bebidas alcohólicas y licores es el azúcar. Se entiende por azúcar, al azúcar de caña o sacarosa, tanto si se obtiene de la caña de azúcar, o de la remolacha azucarera.

Se necesita del azúcar para la fabricación de alcoholes, aguardientes dulces y en pequeñas cantidades también para otras bebidas alcohólicas.

La dulcina, sacarina y otros edulcorantes sintéticos están prohibidos para fabricación de bebidas alcohólicas.

Los porcentajes de azúcares contenidos en los diferentes elaborados son:

Licores superfinos	40 a 60 por 100
Licores finos	30 a 40 por 100
Licores semifinos	22 a 30 por 100
Licores ordinarios	12 a 20 por 100
Aguardientes dulces	12 a 17 por 100
Otros aguardientes	2 a 10 por 100
Vinos aromáticos y aperitivos	2 a 10 por 100

Tabla 1.2.3. Porcentajes de azúcares en diferentes bebidas alcohólicas

En la elaboración de licores, el porcentaje de azúcar se incorpora a la mezcla total en forma de jarabe simple.

### **1.3. Bebidas Alcohólicas en el Comercio**

En el comercio existen diferentes tipos de bebidas alcohólicas entre las principales tenemos aguardiente, ron, vino, vodka y whisky, cada una de ellas posee características y tipos diferentes.

A continuación se explicará los tipos de bebidas alcohólicas más consumidas por las personas.

#### **1.3.1. Aguardiente**

El aguardiente es aquella bebida alcohólica que proviene del fermentado alcohólico, el sabor y aroma perteneciente al aguardiente se debe a la destilación de la materia prima.

El alcohol etílico rectificado, químicamente considerado es siempre el mismo, sea cual fuere la sustancia de que proceda, ya que teóricamente ha de quedar exento de olores y sabores; prácticamente, le queda algún vestigio de su procedencia, por meticulosa que haya sido la rectificación. (Espantaleón, 2002).

Los alcoholes de graduación baja, obtenidos por simple destilación, mantienen plenamente el olor, sabor, acritud y demás características del caldo fermentado de que

procede; estos son en definitiva, los llamados aguardientes o alcoholes para el uso de boca.

Los principales aguardientes son:

**Aguardientes simples.-** Se consideran aguardientes simples los líquidos alcohólicos que procedan de la destilación de materias vegetales previamente fermentadas a las que deben sus características peculiares de aroma y sabor. Su graduación alcohólica no será superior a 80 grados ni menor de 30 grados. (Valencia Díaz, 2008).

Según las materias primas empleadas y los sistemas de obtención, se distinguen los siguientes:

- **Aguardientes de vino.-** Obtenidos por la destilación de vinos sanos en limpio o con heces o bajos que conserven los productos secundarios propios del vino.
- **Aguardientes de orujo.-** Obtenidos por la destilación simple o directa de los orujos y de otros residuos de vinificación.
- **Aguardientes de caña.-** Obtenidos por la destilación directa de los jugos y melados de la caña de azúcar previamente fermentado.
- **Aguardientes de melazas de caña.-** Obtenidos por la destilación de las melazas de caña, previamente fermentadas.
- **Aguardiente de frutas.-** Obtenidos por la destilación de los jugos de frutas, que previamente hayan sufrido la fermentación alcohólica. Llevarán el nombre de la fruta de procedencia, o simplemente de frutas, si procede de la mezcla de diferentes clases.
- **Aguardiente de sidra.-** Obtenidos por la destilación de la sidra pura sana, adicionada o no de sus heces u orujos frescos.
- **Aguardiente de cereales (de malta).-** Obtenidos por la destilación de los caldos fermentados de cereales malteados en su totalidad. Llevarán la denominación del cereal de procedencia.

**Aguardientes compuestos.-** Son los productos elaborados con aguardientes simples naturales o por re destilación con diversas sustancias vegetales, alcoholes

autorizados, diluidos con agua, adicionados o no de caramelo y añejados o no. Su contenido alcohólico será de 30 grados como mínimo.

Según las materias primas empleadas y los sistemas de elaboración, se distinguen, entre otros los siguientes:

- **Arrak.-** Líquido alcohólico que se obtiene destilando el producto resultante de la fermentación del arroz, de ciertas variedades de palma, de la malta de maíz mezclados con flores de Toddy y melaza fermentada y adicionada o no de otras materias aromáticas naturales.
- **Brandy.-** Bebida obtenida sobre la base de holandas de vino conservadas o envejecidas durante el tiempo suficiente en recipientes de roble y en las debidas condiciones ambientales; los demás componentes habrán de ser también de vino.
- **Brandy viejo.-** es el brandy obtenido exclusivamente de aguardientes de vino puro y sano añejado en recipiente de roble.
- **Ginebra.-** Bebida obtenida por la maceración alcohólica de bayas de enebro y posterior destilación, con adición o no de otras sustancias aromáticas o por dilución de los agentes esenciales determinados y elaborada con alcoholes autorizados.

Los aguardientes conseguidos de cada uno de estas sustancias, tienen un bouquet particular, característico de cada uno de ellas, debido a la presencia de diversidad de aceites esenciales. (Valencia Díaz, 2008).

### 1.3.2. Ron

El ron es el resultado de la destilación de los productos derivados de la caña de azúcar fermentada. De todas las bebidas alcohólicas, el ron es el que conserva después de su elaboración una mayor parte de su sabor natural, ya que, a diferencia de las bebidas derivadas de las féculas (vodka de patatas) o de cereales (whisky o ginebra), no necesita cocerse o convertirse en malta. Esto tiene como resultado que el ron no necesita destilarse a una graduación muy alta y puede añejarse en barriles que anteriormente se

hayan utilizado para el envejecimiento de otros licores, ya que debido a su color no necesita el tanino de la madera. (Valencia Díaz, 2008).

La calidad del ron dependerá de la materia prima utilizada en su elaboración. Los de mayor calidad son los destilados a base de jugo de caña, le sigue los rones elaborados con jarabe concentrado y por último los de menor calidad son los destilados de melazas.

## **Tipos de Ron**

A la hora de clasificar los tipos de ron, existen tres maneras principales de hacerlo:

1. Por materia prima.
2. Por el método de destilación
3. Por su presentación final.

### **1. Por materia Prima**

La clasificación se hace entre dos tipos de rones tanto agrícolas e industriales.

Los **rones agrícolas** son elaborados a partir del jugo de caña o guarapo, con una graduación de 50 - 55 °GL. Son rones de alta calidad, fuertes, intensos, que guardan parte de los aromas primarios.

Los **rones industriales**, que son la mayoría de los que se producen en el mundo, se fabrican a partir de la melaza, que es un residuo de la producción del azúcar. Es un ron incoloro, ligero, con 65 - 75 °GL, no envejecen y son ideales para cocteles y combinarlos.

### **2. Por Destilación**

Otra manera de clasificar los rones es por su método de destilación, es decir, es la destilación en alambique o la destilación continua en columnas. En el primer caso, los rones se destilan en lotes, utilizando alambiques y proceden de una primera y segunda destilación, sin embargo la mayoría de los rones se obtiene a partir de la destilación en columnas.

### 3. Por su presentación

Dentro de esta clasificación, encontramos las siguientes:

- **Blanco o White.-** Indica rones claros, secos y ligeros. Cuando sale de la destilería es incoloro, y sirve de base en la industria del ron. Durante su añejamiento adquiere un ligero color ámbar que es eliminado durante la filtración. Es de corto envejecimiento, y por ello es el más barato y neutro.
- **El dorado o Gold.-** Tiene un tono ámbar más intenso y su sabor es más fuerte debido a que no se filtra y a que su período de envejecimiento es más largo. Para acentuar su color, se le agrega caramelo u otros colorantes.
- **El negro o Dark.-** Alude a rones pesados y con cuerpo. Como la mayoría son producidos en alambiques, conservan un fuerte sabor a melaza. El color oscuro se debe a la adición de colorantes.
- **Con especias o con sabor.-** Son rones mezclados con extractos de frutas o de especias.
- **Los OverProof.-** Son rones blancos con un contenido muy alto de alcohol,
- **Los Premium.** - Son rones añejos de gran calidad. (M.T.Sánchez, 2003).

#### 1.3.3. Vino

Los vinos se originan cuando se fermenta el jugo de la uva. El azúcar del jugo alcanza a transformarse en gran medida en alcohol, pero los vinos como no sufren proceso de destilación contienen menor cantidad del alcohol que los licores.

No obstante, dentro de la designación de vino existe una gran cantidad de productos con características muy diversas: vinos de mesa (entre los cuales podemos mencionar, por lo menos, blancos, rosados y tintos), vinos fortificados, vinos espumosos, vinos de postre y vinos compuestos. Aún cuando algunos vinos se encuentran bajo la misma denominación general, pueden tener características muy diferentes debido al tipo de uva que se utiliza en su elaboración, a la región de donde ésta proceda, y a las características del proceso de elaboración..(López, García, Quintero, 2003)

La graduación de los vinos varía entre un 7% y un 16% de alcohol por volumen, aunque la mayoría de los vinos embotellados oscilan entre 10 y 14 grados. Los vinos dulces tienen entre un 15% y 22% de alcohol por volumen.

La acidez es uno de los sabores fundamentales del vino. Su proporción va a determinar la sensación de frescor y va a incidir en su equilibrio. Encontrando en el vino ácidos orgánicos en los cuales tres de ellos son provenientes de la uva (tartárico, málico, cítrico), y los ácidos producto de la fermentación y la acción de las bacterias (láctico, succínico, acético).

Procedentes de la uva	Ácido Tartárico Ácido Málico Ácido Cítrico	Acidez Fija	Acidez Total
Originados por la fermentación	Ácido Succínico Ácido Láctico		
	Ácido Acético	Acidez Volátil	

### 1.3.3. Principales Ácidos de los Vinos

Fuente: GARCÍA Francisco, MUELA Mario, GARCÍA Pedro, 2003, Bebidas, Thomson Ediciones PARANINFO S.A, Madrid España.

## Tipos de Vino

Existe una gran variedad de vinos basada en varios factores como son: variedad de uva, variaciones en el proceso, fermentaciones secundarias, añejamiento, etc.

Al fino se lo puede dividir de la siguiente forma: (Whiesenthal, 2004).

a) **Vinos Blancos.-** Es aquel que se elabora a partir del mosto obtenido de uvas blancas.

- **Ligeros y Secos.-** Vinos jóvenes y ácidos, sin cuerpo, raramente añejados en barricas de roble, no suelen ser aptos para envejecer.
- **Secos y Amplios.-** Tienen más cuerpo y pueden envejecer en bastantes casos en barricas y/o botella, a pesar de ser secos pueden tener cierta dulzura.

- **Secos y Concentrados.-** Más complejos y con más cuerpo, añejados en barrica y botella, este grupo incluye los mejores vinos blancos.
  - **Aromáticos.-** Son los productos de determinadas variables que se destacan por sus aromas, siendo secos o semi.
  - **Semisecos.-** Sin ser dulces son los embotellados antes de que la totalidad del azúcar se haya transformado en alcohol.
  - **Dulces y licorosos.-** Intensamente concentrados, con cuerpo y complejos.
- b) **Vinos Tintos y Rosados.-** Se obtiene de uvas tintas o de uvas tintas y blancas.
- **Rosados.-** Son vinos poco apreciados pues se encuentran entre blancos y tintos.
  - **Ligeros Afrutados.-** Ligeros con poco tanino ósea poco astringentes.
  - **Concentrados.-** Muy afrutados, generalmente suelen envejecer bien.
  - **De Guarda.-** Tienen alta densidad y cuerpo, su sabor mejora con el tiempo (hasta un límite).
  - **Especiales.-** No son frecuentes y suelen ser licorosos y dulces.
- c) **Vinos Espumosos.-** Son vinos con un contenido visible de bióxido de carbono y son elaborados a partir de vinos base, procedentes de la segunda fermentación.
- **Cava.-** Vino espumoso elaborado por el método “Champanoise” o método tradicional, se parte de un vino base que no debe superar los 11° al cual se le añade el *licor tiraje*, que no es más que una mezcla de azúcares y levaduras. Una vez mezclados se llenan en botellas y se cierra para ser trasladadas a las cavas para la segunda fermentación.
  - **Fermentación en botellas o “*transfer*”.-** El proceso es similar al cava pero la fermentación es de 2 meses.
  - **Granvas o grandes envases.-** La segunda fermentación tiene lugar en envases cerrados herméticamente, el periodo de fermentación dura 21 días y al finalizar se envasa a botellas.
- d) **Vinos Generosos.-** Conocidos también con el nombre de *fortificados* o *encabezados*, poseen una alta graduación alcohólica que oscila entre los 14° y los

23°, procedentes de uvas con alto contenido en azúcar. Los más famosos en este tipo son el Jerez y el Oporto.

- **Secos.-** Se elaboran a partir de vinos blancos, al finalizar del proceso se le añade alcohol de uva al mosto. Son especiales para aperitivo.
- **Dulces.-** Se elaboran con uvas muy maduras y dulces, durante la vinificación, se agrega alcohol vínico al mosto para interrumpir la fermentación. Son especiales para tomarse después de la comida o con el postre. (Prez, Rincón, 2001).

#### 1.3.4. El Vodka

El vodka es un aguardiente incoloro, neutro e insípido elaborado a partir de la fermentación, destilación y rectificación de cereales (centeno, trigo, maíz, cebada) y a veces tubérculos como la patata. Suele aromatizarse con hierbas, especias, frutas, etc., para este modo suavizarlo. Su grado alcohólico se sitúa entre 32° y 49°. (M.T.Sánchez, 2003).

#### Tipos de Vodka

1. **Vodka de Centeno.-** Se caracteriza por el aroma suave y el sabor ligeramente dulce.
2. **Vodka de Melaza.-** Es el almíbar que se extrae al refinar el azúcar. Los vodkas que provienen de este ingrediente tienen aromas limpios y puros y se sienten un poco más dulces al paladar que los obtenidos de cereales.
3. **Vodka de Papa.-** Es una materia prima que resulta difícil de trabajar: pues resulta más complejo descomponer y liberar ciertos productos químicos durante la fermentación.
4. **Vodka de Trigo.-** Se puede destilar de los granos de trigo.
5. **Vodka con saborizantes.-** Al tradicional puro se le agrega sabores como vainilla, coco, naranja, limón, hierbas y plantas.

### 1.3.5. El Whisky

Es el aguardiente compuesto obtenido por mezcla de aguardientes de malta y destilados de cereales, previamente envejecidos por separado en recipientes de roble durante el tiempo y en las condiciones ambientales de temperatura y humedad debidas.

Este aguardiente se comercializa con un contenido alcohólico de entre 40 y 62%.

#### Tipos de Whisky

1. **Whisky de Malta.-** Considerado por los expertos el mejor whisky del mundo, es elaborado con cebada malteada y ahumada con turba, destilación doble con alambique y envejecimiento en toneles de roble quemado un mínimo de 3 años.
2. **Whisky de Grano.-** Con maíz o trigo y una pequeña cantidad de cebada malteada y no ahumada. Destilación continua y envejecimiento en toneles de jerez usados, como mínimo, durante 3 años.
3. **American Bourbon.-** Maíz, centeno, cebada malteada y sin ahumar. Destilación continua y envejecimiento mínimo de 1 año.
4. **Whisky Blended.-** Es el resultado de la combinación de diferentes Whiskies de Malta y Grano, en una proporción de 40% Malta y 60% grano. De esta combinación nace un Whisky con sabor y aroma constante, dicha mezcla se lleva a cabo en barricas de grandes dimensiones para conseguir la mezcla óptima de los ingredientes. El Whisky Blend lo podemos encontrar de dos tipos:

- **Whisky Standard.-** Que tiene un envejecimiento de mínimo de tres años.
- **Whisky Blended de Luxe.-** Que tiene una mayor proporción de Malta y envejece a partir de ocho hasta 20 años..(López, García, Quintero, 2003)

## **CAPITULO DOS**

### **2.1. Selección de la muestra**

Para la selección de las muestras de las bebidas alcohólicas que van a ser analizadas con los diferentes métodos, primero se realizó el levantamiento de la información primaria por medio de encuestas, para el mismo se tomará una muestra piloto a través de una pregunta referente al consumo de bebidas alcohólicas y de esta manera se determinará el número de personas que van a ser encuestadas.

A continuación se encuentran los datos del levantamiento de la información primaria, el modelo de la encuesta establecida, y la selección de las muestras a ser analizadas. Con los resultados de las encuestas se estableció las diferentes marcas y tipos.

#### **2.1.1. Levantamiento de información Primaria**

El levantamiento de la información primaria se obtuvo por medio del contacto directo con los consumidores, tomando en cuenta una población infinita; para el cual se aplicaron las encuestas, utilizando muestreo al azar, basada en la ley de probabilidades; tanto en la probabilidad de éxito y la probabilidad de fracaso.

Para la realización de la encuesta se determina el tamaño de la muestra, la cual se partió de la toma de una muestra piloto compuesta por 50 personas a quienes se les realizó la siguiente pregunta:

¿Usted consume bebidas alcohólicas?

Los resultados obtenidos de esta pregunta fueron los siguientes:

Respuesta	N° de personas
Afirmativa	39
Negativa	11

Tabla 2.1.1. Resultados para determinar el tamaño de la muestra

En los resultados de la muestra piloto se obtuvo que de las 50 personas, 39 personas consumen bebidas alcohólicas siempre y las 11 personas no lo consumen. Estos datos fueron tomados para determinar el tamaño de la muestra de las encuestas a realizarse.

Además se determinó que el nivel de confianza requerido es del 95% y el porcentaje de error del 5%.

Para lo cual se utilizó la siguiente fórmula:

$$p = \frac{p \cdot q \cdot z^2}{50} = 0.78 \quad n = \frac{p * q * z^2}{e^2}$$

**Donde:**

$p$  = Probabilidad de éxito **o también llamada** probabilidad de ocurrencia (probabilidad de que ocurra el evento. Lo usual es utilizar una probabilidad de ocurrencia del 50%).

$q$  = Probabilidad de fracaso **o también llamada probabilidad de** no ocurrencia (probabilidad de que no ocurra el evento. Lo usual es utilizar una probabilidad de no ocurrencia del 50%). La suma de  $p$  más  $q$  debe dar el 100%.

$e$  = Margen de error (mide el porcentaje de error que puede existir en los resultados. Lo usual es utilizar un grado de error de 5% o de 10%. Hay que tomar en cuenta que mientras menor margen de error, mayor validez tendrán los resultados pero también mayor será el número de la muestra es decir que la cantidad de encuestas que se realicen será mayor).

$z$  = nivel de confianza (mide la confiabilidad de los resultados. Lo usual es utilizar un nivel de confianza de 95% (1.96) o de 90% (1.65). Hay que tomar en cuenta que mientras mayor sea el nivel de confianza, mayor confiabilidad tendrán los resultados pero mayor será el número de la muestra es decir que la cantidad de encuestas que se realicen será mayor).

$n$  = Tamaño de la muestra (es el número representativo del grupo de personas (población) que se desea estudiar y por tanto, el número de encuestas que se debe realizar o el número de personas que se debe encuestar).

### Datos

Nivel de confianza: 95%

Error: 5%

$$p = \frac{39}{50} = 0.78$$

$$q = \frac{11}{50} = 0.22$$

$$p = \frac{0.78}{1} \times 100 = 78 \%$$

$$q = \frac{0.22}{1} \times 100 = 22 \%$$

$$p + q = 78 \% + 22 \% = 100 \%$$

$$n = \frac{p * q * z^2}{e^2} \quad n = \frac{0.78 * 0.22 * 1.96^2}{0.05^2} \quad n = 264 \quad \text{Encuestas //}$$

Según los datos obtenidos la cantidad de personas a encuestarse serán de 264, con esta se obtendrán los resultados necesarios para seleccionar las muestras de bebidas a ser analizadas.

### 2.1.1 Recopilación y tratamiento estadístico de datos

En cuanto a la recopilación de los resultados se obtuvieron los que se muestran en las diferentes tablas y gráficos a continuación:

Ver (Anexo 1)

**PREGUNTA 1:** ¿Con qué frecuencia consume bebidas alcohólicas?

Opción	N° personas encuestadas	Porcentaje
A menudo (todos los días)	0	0%
Casi siempre (2 o 3 veces a la semana)	48	18,18%
Poco (una vez a la semana)	125	47,35%
Rara vez (una vez al mes)	57	21,59%
Nunca	34	12,88%

Tabla 2.1.1 Resultados de la pregunta 1 de la encuesta.

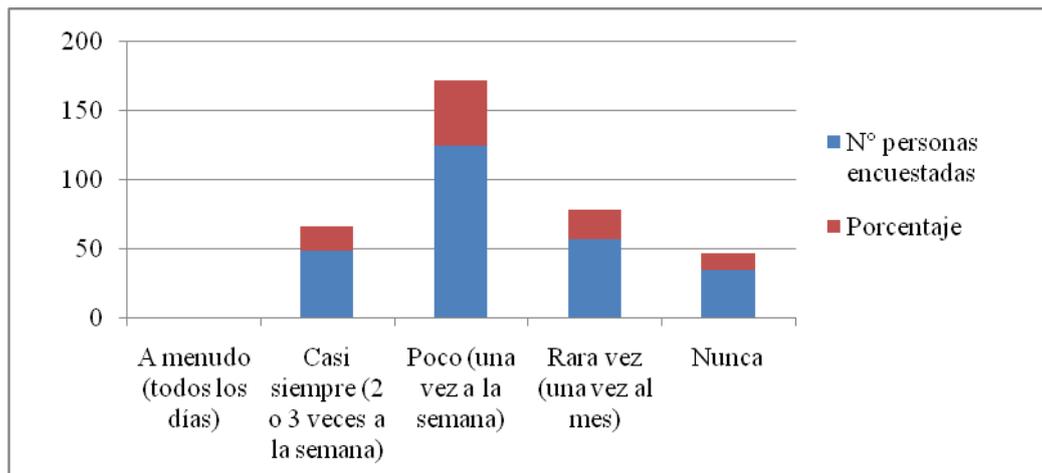


Gráfico 2.1.1 Resultado gráfico de la pregunta 1 de la encuesta.

**PREGUNTA 2:** ¿Cuál de estas marcas y tipos de AGUARDIENTE consume?

Opción	N° personas encuestadas	Porcentaje
Zhumir Aguardiente	148	56,06%
Zhumir Coco	1	0,38%
Zhumir Durazno	12	4,55%
Zhumir Limón	0	0%
Zhumir Maracuyá	4	1,52%
Zhumir Mango	7	2,65%
Zhumir Manzana	0	0%
Zhumir Sandía	9	3,41%
Zhumir Seco	21	7,95%
Cristal Durazno	11	4,17%
Cristal Seco	35	13,26%
Cristal Suave	5	1,89%
Trópico Seco	8	3,03%
Trópico Manzana	0	0%
Néctar Aguardiente	0	0%
Néctar Azul	0	0%
Néctar Club	0	0%
Cachaca 51	0	0%
Otros	3	1,14%

Tabla 2.1.1.1 Resultados de la pregunta 2 de la encuesta.

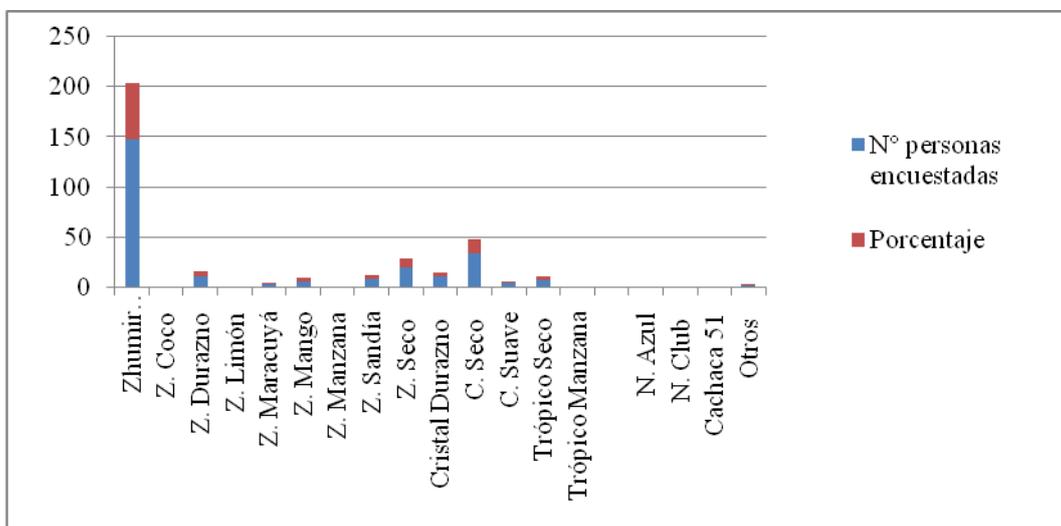


Gráfico 2.1.1.1 Resultado gráfico de la pregunta 2 de la encuesta.

**PREGUNTA 3:** ¿Cuál de estas marcas y tipos de RON consume?

Opción	N° personas encuestadas	Porcentaje
San Miguel Gold	32	12,12%
San Miguel Reserva Especial	3	1,14%
San Miguel Silver	22	8,33%
Ron Estelar Añejo	7	2,65%
Ron Estelar Oro Suave	12	4,55%
Ron Estelar Gold Añejo	15	5,68%
Ron Estelar	5	1,89%
Bacardi Añejo	27	10,23%
Bacardi Oro	11	4,17%
Bacardi Superior	13	4,92%
Bacardi Limón	4	1,52%
Ron Abuelo	113	42,80%
Otros	0	0%

Tabla 2.1.1.2 Resultados de la pregunta 3 de la encuesta

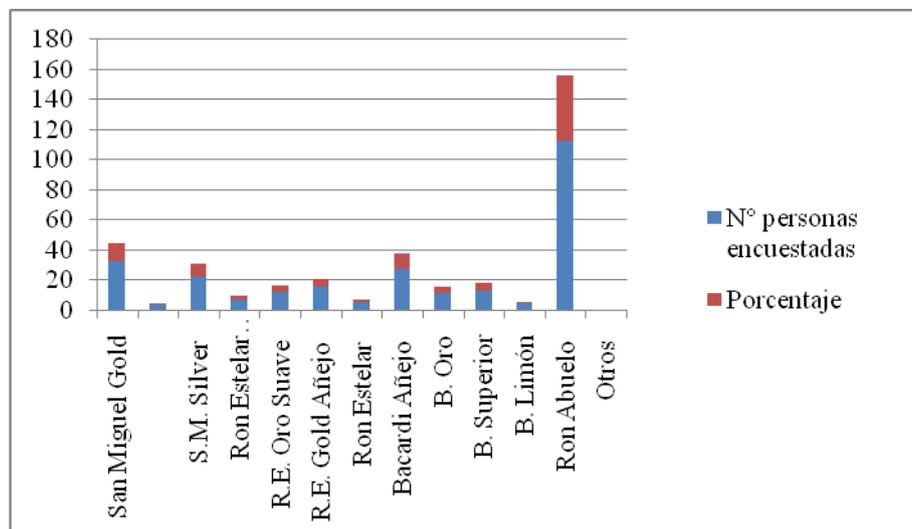


Gráfico 2.1.1.2 Resultado gráfico de la pregunta 3 de la encuesta.

**PREGUNTA 4:** ¿Cuál de estas marcas y tipos de VINO consume?

Opción	N° personas encuestadas	Porcentaje
Riunnite Durazno	11	4,17%
Riunnite Frambuesa	0	0%
Riunnite Lambrusco	1	0,38%
Riunnite Blanco	12	4,55%
Riunnite Rosado	9	3,41%
Riunnite Manzana	8	3,03%
Anthony´s Durazno	6	2,27%
Anthony´s Fresa	1	0,38%
Anthony´s Manzana	4	1,52%
Anthony´s Tropical Fruit	8	3,03%
Boones Daiquiri	0	0%
Boones Durazno	115	43,56%
Boones Mango	1	0,38%
Boones Manzana	7	2,65%
Boones Tropical Fresa	0	0%
Santa Lucía Blanco	28	10,61%
Santa Lucía Tinto	13	4,92%
Clos Blanco	27	10,23%
Clos Tinto	13	4,92%
Otros	0	0%

Tabla 2.1.1.3 Resultados de la pregunta 4 de la encuesta.

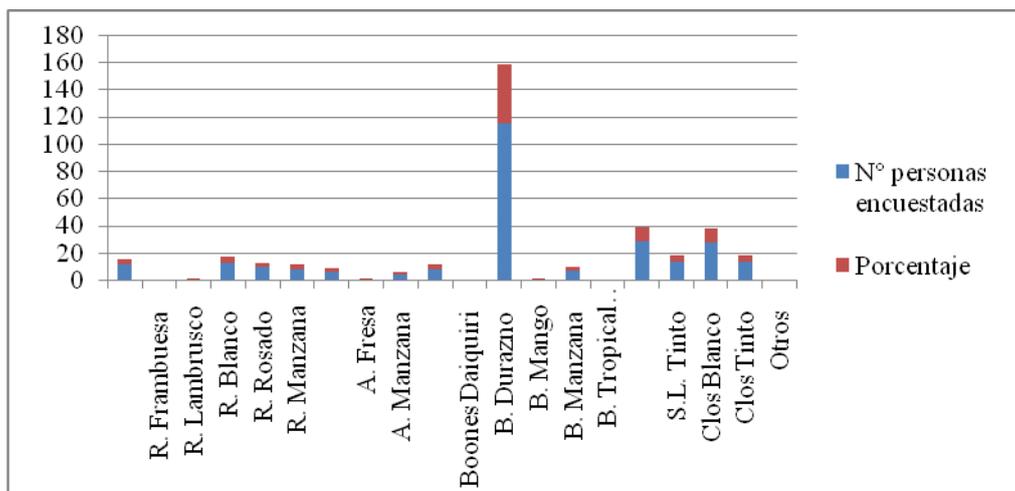


Gráfico 2.1.1.3 Resultado gráfico de la pregunta 4 de la encuesta.

**PREGUNTA 5:** ¿Cuál de estas marcas y tipos de VODKA consume?

Opción	N° personas encuestadas	Porcentaje
Absolut Vodka	158	59,85%
Absolut Vodka Raspberri	0	0%
Absolut Vodka Citron	7	2,65%
Absolut Vodka Vainilia	0	0%
Smirnoff Cranberry	0	0%
Smirnoff Manzana Verde	16	6,06%
Smirnoff Vodka	13	4,92%
Skyy Berry	0	0%
Skyy Melon	0	0%
Skyy Vodka	11	4,17%
Finlandia Cranberry	4	1,52%
Finlandia Limón	1	0,38%
Finlandia Mango	1	0,38%
Finlandia Vodka	13	4,92%
Russkaya Cranberry	0	0%
Russkaya Citron	14	5,30%
Russkaya Naranja	0	0%
Russkaya Manzana	6	2,27%
Russkaya Vodka	20	7,58%
Otros	0	0%

Tabla 2.1.1.4 Resultados de la pregunta 5 de la encuesta.

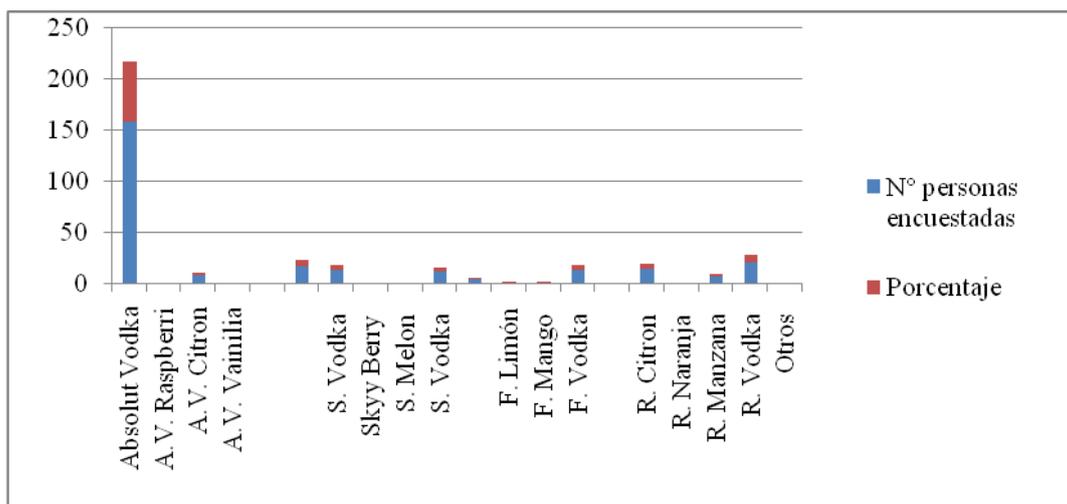


Gráfico 2.1.1.4 Resultado gráfico de la pregunta 5 de la encuesta

**PREGUNTA 6:** ¿Cuál de estas marcas y tipos de WHISKY consume?

Opción	N° personas encuestadas	Porcentaje
Grant´s	35	13,26%
Catto´s	9	3,41%
Clan Mac Gregor	101	38,26%
Chivas Regal	13	4,92%
Johnnie Walker Negro	47	17,80%
Johnnie Walker Rojo	59	22,35%
Otros	0	0%

Tabla 2.1.1.5 Resultados de la pregunta 6 de la encuesta.

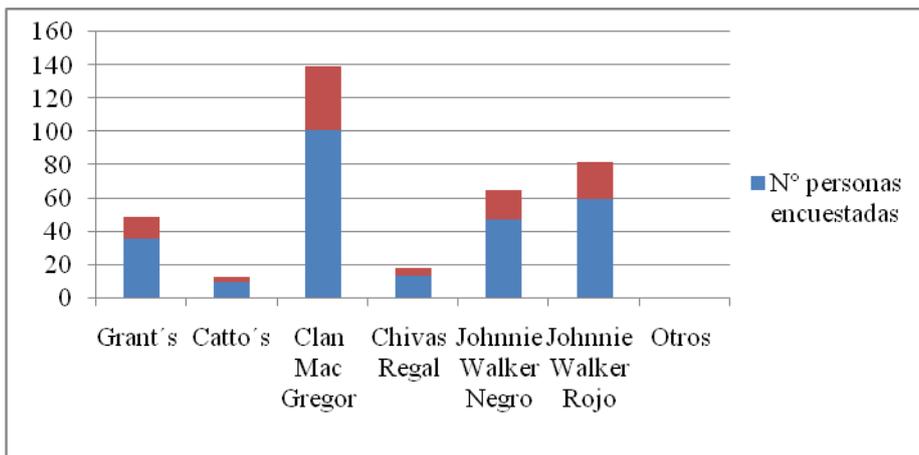


Gráfico 2.1.1.5 Resultado gráfico de la pregunta 6 de la encuesta.

## RESULTADO FINAL

Elección de las preguntas	Cantidad de personas que escogieron la pregunta	Porcentaje
Poco (una vez a la semana)	125	47,35%
Zhumir Aguardiente	148	56,06%
Ron Abuelo	113	42,80%
B. Durazno	115	43,56%
Absolut Vodka	158	59,85%
Clan Mac Gregor	101	38,26%

Tabla 2.1.1.6 Resultado final de las preguntas de la encuesta.

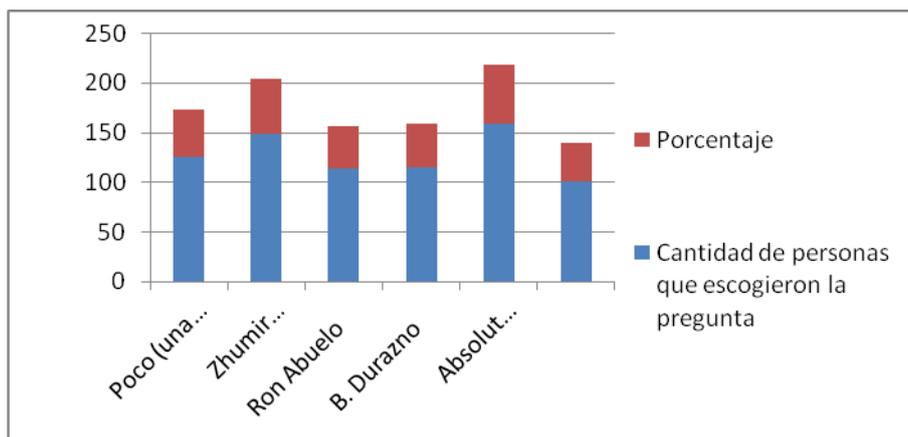


Gráfico 2.1.1.6 Resultado final de las preguntas de las encuestas.

### 2.1.2.Resultado y análisis de información

Por medio de las encuestas realizadas se pudo seleccionar que marca y tipo de bebidas alcohólicas se utilizaron para los diferentes análisis; en estos se obtuvieron los siguientes resultados:

- En cuanto a la frecuencia con la que las personas **CONSUMEN** bebidas alcohólicas se obtuvo un porcentaje del 47,35% que es “POCO”, considerando que lo consumen una vez a la semana.

- En el consumo de **AGUARDIENTE**, se obtuvo que la escogida por las personas es la marca “**ZHUMIR**”, en el que se obtuvo un porcentaje de 56,06%.
- En el **RON**, la marca más consumida por las personas es el “**RON ABUELO**”, con un porcentaje de 42,80%.
- En tanto al consumo de **VINOS** los resultados establecieron que la marca “**BOONES**” de durazno, es la que mayor consumo posee en el medio con un 43,56%.
- En lo que tiene que ver con **VODKA**, se obtuvo que el “**VODKA ABSOLUT**” es consumido en un 59,85% a comparación de otros tipos y marcas.
- Por último en los **WHISKY** es de mayor consumo es el “**CLAN MAC GREGOR**”, con el 38,26%.

Con los datos obtenidos por medios de las encuestas a las diferentes personas, se pudo determinar las muestras de las diferentes bebidas que van a ser utilizadas para los análisis respectivos; dentro de ello se seleccionó diferentes aspectos como la marca y el tipo de bebida alcohólica.

## **CAPÍTULO TRES**

### **3.1. Métodos analíticos clásicos para Bebidas Alcohólicas**

En este capítulo se aplicará tres métodos para el análisis de las diferentes bebidas alcohólicas seleccionadas, entre las cuales están; la determinación de alcohol mediante la Gascromatografía, la determinación de acidez mediante la titulación y azúcares mediante el método de Licor de Fehling.

#### **3.1.1 Determinación Acidez**

##### **3.1. Determinación Acidez**

##### **Fundamento:**

El método de la determinación de acidez en bebidas alcohólicas, se basa en determinar el volumen del Hidróxido de sodio (NaOH) necesario para neutralizar el ácido contenido en la alícuota que se titula, de esta manera se determina el punto final por medio del cambio del color que es producida por la presencia del indicador ácido-base que ha sido empleado.

##### **Reactivos:**

- Hidróxido de sodio (NaOH) al 0,1N.
- Fenolftaleína.

##### **Procedimiento:**

1. Medir 15ml de la muestra a analizar
2. Colocamos en el enlemeyer
3. Dejar caer la solución de sosa gota a gota hasta que haya una variación de color

4. Con los valores de los volúmenes adicionados determinamos la acidez de la solución.

**Cálculos:**

Calcular el mili equivalente del ácido tartárico y según los datos obtenidos aplicar la fórmula para conocer porcentaje de acidez.

**Meq del Ácido Tartárico = 0.050**

$$\% \text{ Acidez} = \frac{V_T \text{ NaOH} \times N \text{ NaOH} \times \text{Meq Ácido tartárico}}{V_m} \times 100$$

### **3.2. Azúcares reductores**

**Fundamento:**

Tanto los monosacáridos y los disacáridos poseen un poder reductor, esto se debe al grupo carbonilo que poseen en la molécula, esta característica se pone en manifiesto a través de una reacción redox que se da entre los mismos y el Sulfato de Cobre (II).

Las soluciones presentes en esta sal poseen un color azul, tras la reacción con el glúcido reductor se llega a formar el Óxido de cobre (I) le mismo que tiene un color rojo, de esta manera el cambio de coloración indica que se ha producido la reacción antes mencionada y que por tal razón el glúcido presente es reductor.

#### **Método para determinación de Azúcares Reductores**

##### **Licor de Fehling**

**Procedimiento:**

1. Se toman 5cc de Fehling A y 5cc de Fehling B, y se los coloca en un erlenmeyer de 100cc de capacidad.

2. Se agregan de 20 a 30cc de agua destilada y se somete a ebullición, y así se deja caer desde la bureta la solución de glucosa hasta que la solución del erlenmeyer pase de azul a incoloro, observándose un precipitado pardo rojizo de óxido de cobre, en el fondo del recipiente.

### **Determinación de azúcares**

#### **Procedimiento:**

1. Decolorar la muestra con carbón activo
2. Hidrolizar muestras: tomar 20ml de la muestra azucarada y 1ml de ácido clorhídrico concentrado.
3. Colocar en la estufa a 100°C por 15min
4. Enfriar
5. Aforar a 50ml con agua destilada
6. Se emplea 15ml del reactivo colocados en un frasco de erlenmeyer de 250ml.
7. Se calienta a ebullición sobre tela metálica
8. Cuando está en ebullición se vierte sobre el reactivo gota a gota (ni muy rápida ni muy lenta) la solución azucarada
9. El punto final de titulación es cuando el color vira del violeta al parduzco y luego al amarillo. (Monte Adolfo, 1966).

### **3.3. Gascromatografía**

#### **Cromatografía de gases**

La cromatografía de gases es una técnica cromatográfica química que se utiliza para la separación, determinación e identificación de los diferentes componentes químicos de mezclas complejas. Aquí la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución se produce por el flujo de una fase móvil de gas inerte. A diferencia de los otros tipos de cromatografía, la fase móvil no interacciona con las moléculas del analito; su única función es la de transportar el analito a través de la columna. Existen dos tipos de cromatografía de gases (GC): la cromatografía gas-sólido (GSC) y la cromatografía gas-líquido (GLC), siendo esta última la que se utiliza

más ampliamente, y que se puede llamar simplemente cromatografía de gases (GC). En la GSC la fase estacionaria es sólida y la retención de los analitos en ella se produce mediante el proceso de adsorción.

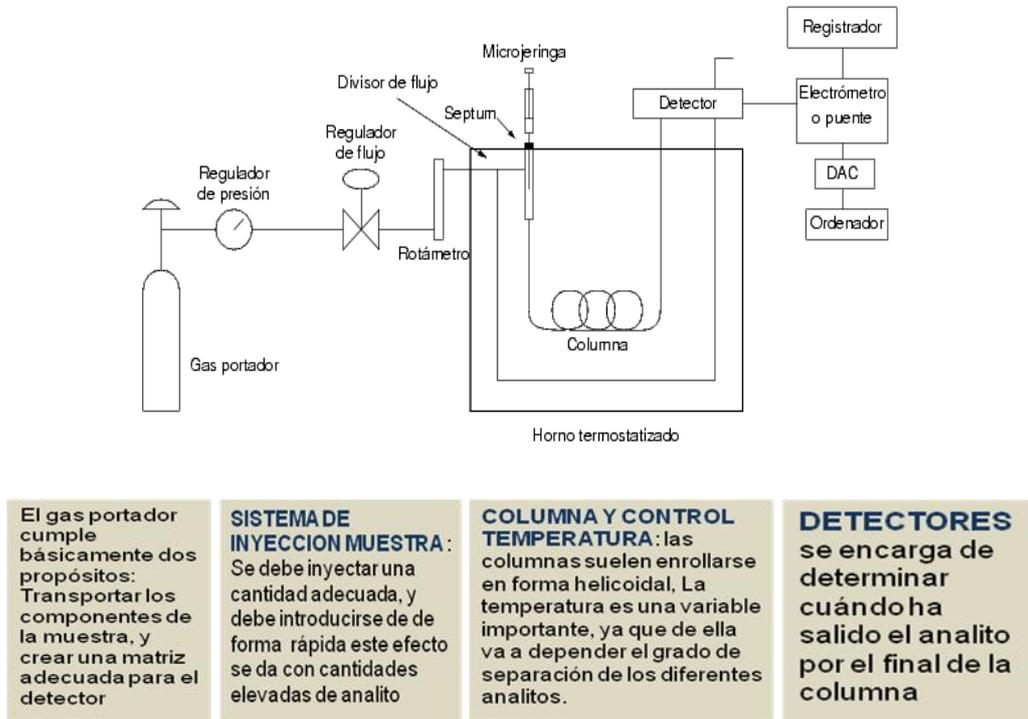


Figura 3.3. Diagrama de un cromatógrafo de gases

Fuente: SKOOG, DOUGAS A. Y LEARY, JAMES J, 1994, Análisis Instrumental, Armenia: MacGraw-Hill.

## Partes de un Cromatógrafo de gases

### Detectores

El detector es la parte del cromatógrafo que se encarga de determinar cuándo ha salido el analito por el final de la columna. Las características de un detector ideal son:

- **Sensibilidad.**
- **Respuesta lineal al analito.**
- **Tiempo de respuesta corto.**
- **Intervalo de temperatura de trabajo amplio.**
- **No debe destruir la muestra.**
- **Estabilidad y reproducibilidad.**

- **Alta fiabilidad y manejo sencillo.**
- **Respuesta semejante para todos los analitos**
- **Respuesta selectiva y altamente predecible** para un reducido número de analitos.

### **Clasificación de los detectores**

Los detectores se clasifican de la siguiente manera:

1. Detectores según su grado de selectividad.
  - Universales.
  - Específicos o Selectivos.
2. Detectores Destructivos y No Destructivos.
3. Detectores según su modo de respuesta
  - Dependientes del Flujo Másico.
  - Dependiente de la Concentración.
4. Detectores según el proceso de detección Ionización, Óptico-espectroscópico, Electroquímico, etc.

### **Gas portador**

El gas portador cumple básicamente dos propósitos:

1. Transportar los componentes de la muestra.
2. Crear una matriz adecuada para el detector.

Un gas portador debe reunir ciertas condiciones:

- Debe ser inerte para evitar interacciones.
- Debe ser capaz de minimizar la difusión gaseosa.
- Fácilmente disponible y puro
- Económico
- Adecuado al detector a utilizar

## Sistema de inyección de muestra

La inyección de muestra es un apartado crítico, ya que se debe inyectar una cantidad adecuada, y debe introducirse de tal forma (como un tapón de vapor) que sea rápida para evitar el ensanchamiento de las bandas de salida; este efecto se da con cantidades elevadas de analito. El método más utilizado emplea una microjeringa (de capacidades de varios microlitros) para introducir el analito en una cámara de vaporización instantánea. Esta cámara está a 50 °C por encima del punto de ebullición del componente menos volátil, y está sellada por una junta de goma de silicona septa o septum.

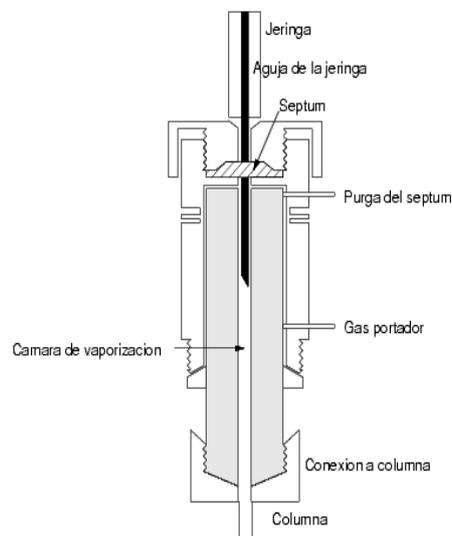


Figura 3.3.1. Inyector de muestra para un GC

Fuente: SKOOG, DOUGAS A. Y LEARY, JAMES J, 1994, Análisis Instrumental, Armenia: MacGraw-Hill.

Si es necesaria una reproducibilidad del tamaño de muestra inyectado se puede usar una válvula de seis vías o válvula de inyección, donde la cantidad a inyectar es constante y determinada por el tamaño del bucle de dicha válvula.

## Aplicaciones de la cromatografía de gases

La GC tiene dos importantes campos de aplicación. Por una parte su capacidad para resolver (separar) mezclas orgánicas complejas, compuestos organometálicos y sistemas bioquímicos. Otra aplicación es como método para determinar cuantitativa y cualitativamente los componentes de la muestra. Para el análisis cualitativo se suele emplear el tiempo de retención, que es único para cada compuesto dadas unas determinadas condiciones (mismo gas portador, rampa de temperatura y flujo), o el volumen de retención. En aplicaciones cuantitativas, integrando el área de cada compuesto o midiendo su altura, con los calibrados adecuados, se obtiene la concentración o cantidad presente de cada analito.



Gasromatógrafo de gases

## **CAPÍTULO CUATRO**

### **4. Espectroscopía Infrarroja**

#### **4.1. Introducción**

La espectroscopía infrarroja es un método analítico, probablemente el más utilizado para la investigación actual. Una de sus principales ventajas es que prácticamente cualquier muestra ya sea sólida, líquida o gaseosa puede ser estudiada identificando cualitativamente la estructura de un material desconocido así como, puede realizar mediciones cuantitativas de los componentes de una mezcla compleja.

La espectroscopía infrarroja es una técnica basada en las vibraciones de los átomos de una molécula, es decir, la molécula comienza a vibrar de una determinada manera debido a la energía que se le suministra mediante la luz infrarrojo.

Un espectro infrarrojo representa una huella digital de una muestra con picos de absorción que corresponden a las frecuencias de las vibraciones entre los enlaces de los átomos que componen el material.

Los espectrómetros de infrarrojo operan de manera semejante a la de los espectrómetros de la luz visible y ultravioleta. Se hace pasar un haz de luz infrarrojo a través de la muestra y dicho haz de luz se compara constantemente con un haz de referencia al variar la frecuencia de la radiación incidente. El espectrómetro grafica los resultados en términos de absorción contra frecuencia o longitud de onda.



### **Espectrofotómetro Infrarrojo**

#### **4.1.1. Radiación electromagnética**

La radiación electromagnética está formada por la combinación de campos eléctricos y magnéticos, que se propagan a través del espacio en forma de ondas portadoras de energía, transportando esta energía de un lugar a otro.

La radiación electromagnética se puede propagar en el vacío a diferencia de otros tipos de onda tales como el sonido que necesita un material para su propagación.

Formalmente el espectro electromagnético es infinito y continuo. El espectro electromagnético se extiende desde la radiación de menor longitud de onda, como los rayos gamma y los rayos X, pasando por la luz ultravioleta, la luz visible y los rayos infrarrojos, hasta las ondas electromagnéticas de mayor longitud de onda

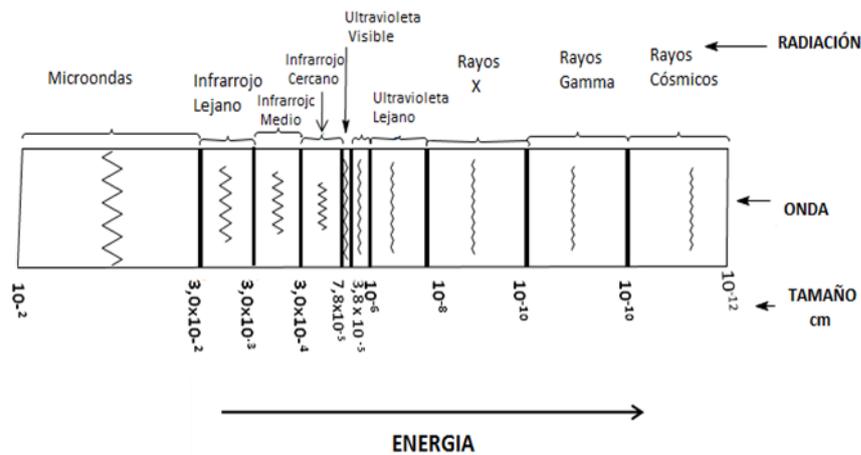


Figura 4.1.1. Radiación Electromagnética

Fuente: B. COLTHUP Norman, H.DALY Lawrence, E. WIBERLEY Stephen, 1975, Introduction to infrared and Raman spectroscopy.

El comportamiento de la radiación electromagnética depende de su longitud de onda. Las frecuencias más altas tienen longitudes de onda más cortas, y las frecuencias inferiores tienen longitudes de onda más largas. Cuando la radiación electromagnética interacciona con átomos y moléculas, su comportamiento también depende de la cantidad de energía por cuanto que transporta.

La onda electromagnética es la forma de propagación de la radiación electromagnética a través del espacio. Su propagación en el vacío es constante para todas las regiones del espectro.

Las ondas de radiación electromagnética se componen de crestas y valles, convencionalmente las primeras hacia arriba y las segundas hacia abajo. La distancia entre dos crestas o valles se denomina **longitud de onda** ( $\lambda$ ). La distancia que separa el pico de la cresta o valle de la línea se denomina **amplitud de onda**.

Las ondas electromagnéticas se propagan en línea recta, estas pueden sufrir reflexiones y difracciones.

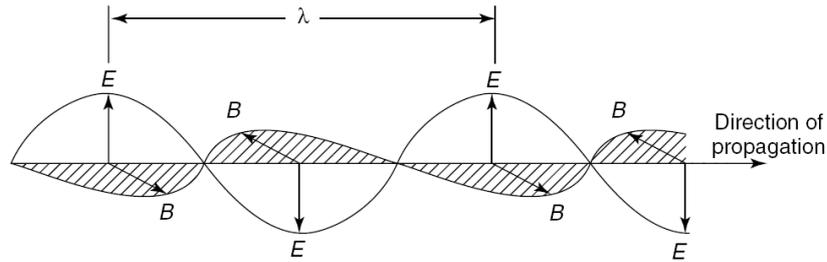


Figura 4.1.1.1. Ondas electromagnéticas.

Fuente: BARBARA STUART, 2004, *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*, John Wiley & Sons Ltda.

La velocidad de propagación en el vacío es constante para todas las regiones del espectro. Esto se conoce como la velocidad de luz,  $c$ , y tiene el valor  $2,997\,925 \times 10^8 \text{ms}^{-1}$ . Si una onda viaja a una distancia fija, se visualiza cada ciclo, observándose que la velocidad de esta onda es el producto de la longitud de onda  $\lambda$  (la distancia entre picos adyacentes), y la frecuencia  $\nu$  (el número de ciclos por segundo). (Stuart, 2004).

Las tres características principales de las ondas que constituyen el espectro electromagnético son:

1. Frecuencia ( $\nu$ )
2. Longitud ( $\lambda$ )
3. Amplitud ( $A$ )

La frecuencia de una onda responde a un fenómeno físico que se repite cíclicamente un número determinado de veces durante un segundo de tiempo. La frecuencia de esas ondas del espectro electromagnético se representan con la letra ( $f$ ) y su unidad de medida es el ciclo por segundo o hertz (Hz). El intervalo de frecuencia se extiende desde  $10$  a  $10^{24}$  Hz y las longitudes de onda de  $10^7$  y  $10^{-14}$  m respectivamente.

La amplitud es la máxima perturbación que alcanza un elemento respecto de su posición de equilibrio. Aquellos lugares donde la perturbación es máxima se denomina crestas o calles y donde es mínima se denomina nodos.

La longitud de onda es la distancia entre dos crestas consecutivas, es decir, describe lo larga que es la onda. Las ondas electromagnéticas con longitud de onda corta son altamente energéticas.

La energía de un fotón de una longitud de onda dada puede calcularse mediante la ecuación del Planck. En donde:

$$v = c / \lambda$$

$$E = h\nu = hc / \lambda$$

**Donde:**

E = energía del fotón

$h$  = constante de Planck =  $6.62 \times 10^{-34}$  J s

$c$  = velocidad de la luz =  $2.99 \times 10^{10}$  cm / s

$\lambda$  = longitud de onda de la radiación (cm)

$V$  = frecuencia de la radiación en hertz (ciclos / s)

Tabla 1. El espectro electromagnético

Región	Longitud de onda	Energía de excitación	Tipo de excitación
Rayos x, rayos cósmicos	<100 nm	> 286 (Kcal/mol)	
Ultravioleta	100 - 350 nm	286 - 82 Kcal	Electrónica
Visible	350 - 800 nm	82 - 36 Kcal	Electrónica
Infrarrojo próximo	0,8 - 2,0 $\mu\text{m}$	36 - 14,3 Kcal	Deformaciones de enlace
Infrarrojo	2 - 16 $\mu\text{m}$	14,3 - 1,8 Kcal	Deformaciones de enlace
Infrarrojo lejano	16 - 300 $\mu\text{m}$	1,8 - 0,1 Kcal	Deformaciones de enlace
Microondas	1 cm	$10^{-4}$ Kcal	Rotacional
Radiofrecuencia	metros	$10^{-6}$ Kcal	Transiciones de spin nuclear y electrónico

Tabla 4.1.1.2. Espectro electromagnético

Fuente: NORMAN B. COLTHUP, LAWRENCE H. DALY, STEPHEN E. WIBERLEY, 1975, Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy, second edition, Academy Press.

Los procesos de cambio, incluyendo las de vibración y rotación asociados con la espectroscopía infrarroja, se pueden representar en términos de niveles de energía  $E_0$ ,  $E_1$ ,  $E_2$ , etc. Cada átomo o molécula en un sistema debe existir en uno u otro de estos niveles.

Cada vez que una molécula interactúa con la radiación, la energía es emitida o absorbida. En cada caso, la energía de la radiación exactamente debe ajustarse a la brecha de energía  $E_1 - E_0$  ó  $E_2 - E_1$ , etc. La energía se relaciona con la frecuencia, de esta forma:

$$\Delta E = h\nu$$

Por lo tanto la frecuencia de emisión o absorción de radiación para una transición entre los estados de energía  $E_0$  y  $E_1$  viene dado por:

$$\nu = (E_1 - E_0)/h$$

Los espectros infrarrojos, como veremos, se expresan en unidades de longitud de onda con números fáciles de manejar, es decir micrómetros ( $\mu\text{m}$ ) o en unidades llamadas

número de ondas, definida como el número de ondas que habría en una unidad de longitud.

Por definición se tiene que si  $\tilde{U}$  es el número de ondas por centímetro, entonces:

$$\tilde{U} = 1/(\lambda [\text{cm}])$$

La relación que hay entre el número de ondas  $\tilde{U}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) y la longitud de onda de una de las señales del espectro (micrómetros) puede obtenerse al transformar los micrómetros a centímetros. Así, si la posición de una absorción (longitud de onda) que está expresada en micrómetros, (un micrómetro equivale a  $10^{-4}$  cm), entonces, la relación que hay entre estas dos unidades es:

$$\tilde{U} = 1 / \lambda * 10^4 \text{ cm}$$

Es decir:

$$\tilde{U} = (10^4 / \lambda) [\text{cm}^{-1}]$$

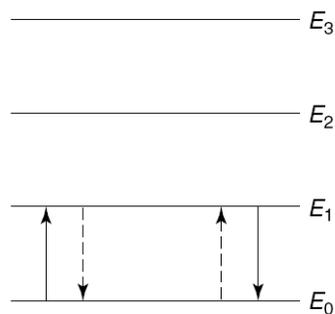


Figura 4.1.1.3. Ilustración de los niveles discretos de energía cuantizada

Fuente: BARBARA STUART, 2004, *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*, John Wiley & Sons Ltda.

#### 4.1.2. Absorción Infrarroja

La espectroscopía de absorción de infrarrojo es una técnica analítica de gran importancia para los químicos. Está basada en las vibraciones de los átomos en las moléculas. Un espectro de infrarrojo consiste en un espectro de absorción que implica transiciones entre niveles vibracionales. Para que una vibración dé lugar a una absorción de infrarrojo, debe causar un cambio en el momento dipolar de la molécula. Así, la

intensidad de una banda de infrarrojo será mayor cuanto mayor sea el cambio en el momento dipolar con la vibración. (Norman B. 1975.).

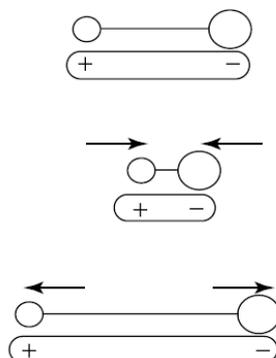


Figura 4.1.2. Cambio en el momento dipolar de la molécula

Fuente: BARBARA STUART, 2004, *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*, John Wiley & Sons Ltda.

El campo eléctrico de la radiación interactúa con las fluctuaciones en el momento dipolar de la molécula. Si la frecuencia de la radiación coincide con la frecuencia vibratoria de la molécula, entonces la radiación se absorbe provocando un cambio en la amplitud de la vibración molecular.

La frecuencia de la vibración depende de las masas de los átomos y de la rigidez del enlace. Los átomos más pesados vibran más lentamente que los más ligeros. En un grupo de enlaces con energías de enlace similares la frecuencia disminuye al aumentar la masa atómica.

Los enlaces más fuertes generalmente son más rígidos requiriéndose más fuerza para alejarlos o comprimirlos. Los enlaces mas fuertes generalmente vibran más deprisa que los enlaces más débiles.

No todas las vibraciones moleculares absorben radiación infrarroja. Uno de los componentes de una onda electromagnética es un campo eléctrico rápidamente reversible que comprime y alarga alternativamente a un enlace polar. Cuando el campo eléctrico se encuentra en el mismo sentido que el momento bipolar, el enlace se comprime y el momento bipolar disminuye. Cuando el campo eléctrico es opuesto al

momento bipolar, el enlace se alarga y el momento bipolar aumenta. Si esta compresión y alargamiento alternativo de enlace se produce a una frecuencia que corresponde a una velocidad natural de vibración de la molécula, se puede absorber energía. Las vibraciones de enlace con movimientos bipolares generalmente dan lugar a absorciones en el IR y se dice que son activas en el IR. (Norman B. 1975.).

En general, si un enlace tiene un momento dipolar, su frecuencia de tensión produce una absorción en el espectro IR. Si un enlace está simétricamente sustituido y su momento dipolar es cero producen absorciones generalmente débiles porque las colisiones moleculares, rotaciones y vibraciones hacen que estos enlaces sean asimétricos parte del tiempo.

#### **4.1.3. Modelos Normales de Vibración**

Las moléculas poseen movimiento vibracional continuo. Las vibraciones suceden a valores cuantizados de energía. Las frecuencias de vibración de los diferentes enlaces en una molécula dependen de la masa de los átomos involucrados y de la fuerza de unión entre ellos.

Los átomos que constituyen una molécula están unidos entre sí por fuerzas de origen electrostático que semejan uniones elásticas y en consecuencia sus movimientos son periódicos o cuasiperiódicos. Todos los movimientos relativos de los átomos en una molécula son en realidad la superposición de los llamados modos normales de vibración, en los cuales todos los átomos se encuentran vibrando con la misma fase y frecuencia normal.

El número de modos normales de vibración define el espectro vibracional de cada molécula. Estos espectros también dependen de las masas de los átomos involucrados, su arreglo geométrico dentro de la molécula y la “elasticidad” de los enlaces químicos.

En las moléculas poliatómicas podemos clasificar a las vibraciones, de forma aproximada, de acuerdo a los parámetros geométricos que cambian esencialmente durante las mismas.

Los movimientos vibracionales de una molécula poliatómicas pueden parecer complejos e irregulares, sin embargo existen vibraciones básicas que llevan a la molécula a oscilaciones periódicas en las cuales sus núcleos se mueven en fase, es decir, todos ellos pasan por una posición de desequilibrio al mismo tiempo. Estas oscilaciones periódicas son llamadas normales de vibración. Cualquier vibración arbitraria de la molécula puede ser descrita por una superposición de los modos normales.

Todos los movimientos relativos de los átomos en una molécula son en realidad la superposición de los llamados modos normales de vibración, en los cuales todos los átomos se encuentran vibrando con la misma fase y frecuencia normal.

En términos generales las vibraciones pueden ser de dos tipos stretching (estiramiento) y bending (flexión).

Las vibraciones stretching son aquellas en las que los átomos de un enlace oscilan alargando y acortando la distancia del mismo sin modificar el eje ni el ángulo de enlace.

Las vibraciones bending son aquellas que modifican continuamente el ángulo de enlace.



Figura 4.1.3. Vibraciones de tensión y vibraciones de flexión.

Esta es una descripción de los movimientos de estiramiento y flexión que se conocen colectivamente como las vibraciones.

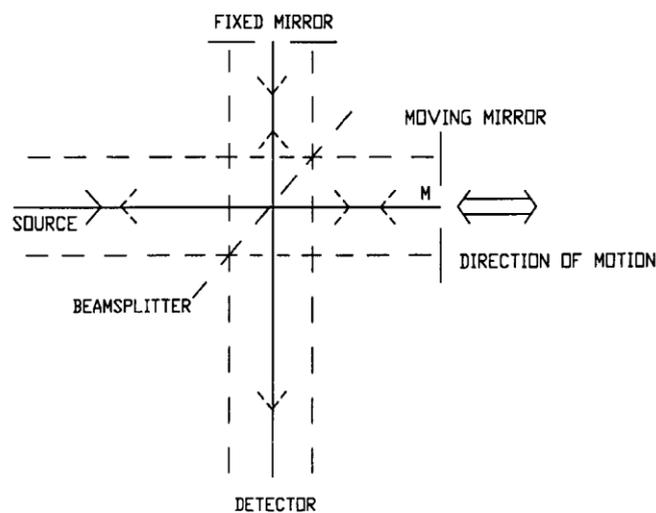
Las vibraciones de flexión (bending) también contribuyen a los espectros infrarrojos por lo que es mejor considerar la molécula a través de los átomos de hidrógeno y el átomo de carbono. Los átomos de hidrógeno se pueden mover en la misma dirección o en direcciones opuestas en este plano. Para moléculas más complejas el análisis se simplifica debido a que los átomos de hidrógeno pueden estar de forma aislada.

## 4.2. Método Experimental

### 4.2.1. Fourier-método de reflexión

Un espectrofotómetro de infrarrojo de transformada de Fourier (FT-IR), es capaz de identificar materiales desconocidos determinando la calidad o consistencia de una muestras, al igual que determina los componentes en una mezcla.

Un espectrómetro por transformada de Fourier consta de tres elementos básicos: una fuente luminosa, un interferómetro de Michelson y un detector.



**Figure 4:** Schematic diagram of a Michelson interferometer.

Fuente: R CHANG, 1971, Basic principles of Spectroscopy, Mc-Graw-Hill, New York.

El interferómetro más comúnmente utilizado es el interferómetro de Michelson, el cual consiste en tres componentes: un espejo móvil, espejo fijo y un divisor de luz, los dos espejos son perpendiculares entre sí.

La luz infrarroja va desde la fuente incandescente hasta un separador de haz luminoso, colocado a un ángulo de  $45^\circ$  con respecto al haz, una parte de la luz atraviesa el separador y otra parte es reflejada con un ángulo de  $90^\circ$ . La luz reflejada incide sobre un espejo estacionario, mientras que la transmitida sobre uno que se mueve a velocidad constante. Los rayos retornan de los espejos para recombinarse en el separador, los rayos del espejo móvil han recorrido una distancia diferente a la recorrida por los del espejo fijo y los dos tipos de rayos se combinan para crear un modelo de interferencia denominado interferograma. El interferograma es una señal analógica en el detector que tiene que ser digitalizada con el fin que la transformación de Fourier en un espectro convencional se lleve a cabo. (Stuart, 2004).

El espejo en movimiento es un componente crucial del interferómetro, el mismo que debe estar alineado con precisión y debe ser capaz de escanear dos distancias de modo que la diferente trayectoria corresponde a un valor conocido.

Otro componente fundamental para la espectroscopía infrarroja es la computadora, ésta controla el instrumento, permitiendo leer el espectro dentro de la memoria del computador, es decir el espectro es digitalizado.

### **3.2.3. Métodos de reflectancia**

Este método puede ser utilizado para muestras que son difíciles de analizar por métodos de transmisión convencional. El método de reflectancia se puede dividir en dos categorías. Medidas de reflectancia interna, que puede usar una reflectancia total atenuada de células en contacto con la muestra. También hay una variedad de las mediciones de reflectancia externa el cual implica un haz de luz infrarroja reflejando directamente de la superficie de la muestra.

### **Reflectancia atenuada total (ATR)**

La reflectancia atenuada ATR es una técnica de muestreo más versátil, se produce cuando un haz de radiación entra por un medio más denso (con un mayor índice de refracción), en un medio menos denso (con un índice de refracción más bajo). (Sherman, 2003).

El componente principal en los aparatos de ATR es el componente de reflectancia interna, que es generalmente un prisma o un material que transmite en el infrarrojo con un alto índice de refracción. La luz se focaliza en una de las caras del prisma y penetra en el material. La luz llega con un ángulo tal que impida la reflexión de la luz, de modo que llega a la interfase con un ángulo predeterminado.

La fracción incidente del haz se refleja cuando el ángulo de incidencia aumenta. Toda la radiación incidente se refleja totalmente en la interfaz cuando el ángulo de incidencia es mayor que el ángulo crítico. Esta penetración se llama onda evanescente y por lo general es una profundidad de unos pocos micrómetros.

Los cristales utilizados en las células de ATR son fabricados con materiales que tienen una baja solubilidad en agua y son de un índice refractario muy alto. (Stuart, 2004.).

### **Reflectancia Difusa**

En la reflectancia externa, la radiación incidente se focaliza sobre la muestra produciéndose dos formas de reflexión: difusa y especular.

La energía que penetra en una o más partículas se refleja en todas las direcciones y este componente se llama Reflexión Difusa.

La técnica de reflectancia difusa es una de las más utilizadas para el análisis de sólidos y de muestra divididas en forma de partículas y generalmente no requiere preparación de muestra o esta es mínima. (Stuart, 2004.).

### **Reflectancia Especular**

Este es un método no destructivo de medidas de superficie utilizando la reflexión de una superficie mate o brillante de una muestra como si se tratara de un espejo. . La reflectancia especular se produce cuando los ángulos de incidencia y de reflexión son iguales.

La cantidad de luz reflejada depende, del ángulo de incidencia, el índice de refracción, la rugosidad de la superficie y de las propiedades de absorción de la muestra.

El cambio del ángulo de incidencia modifica la profundidad de la penetración y, al mismo tiempo, el paso de luz. A mayor ángulo de incidencia menor penetración y mayor paso de luz. (Stuart, 2004).

## **CAPITULO CINCO**

### **5. MÉTODOS DE CALIBRACIÓN**

#### **5.1 MÉTODOS DE CALIBRACIÓN MULTIVARIANTE APLICADAS A TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS**

La calibración es un conjunto de operaciones que establecen, en unas condiciones especificadas, la relación que existe entre los valores indicados por un instrumento o sistema de medida, o los valores representados por una medida materializada y los correspondientes valores conocidos de una magnitud de medida. (Leardi, R, 2003).

El objetivo de los métodos de calibración es predecir la propiedad de interés a partir de múltiples medidas instrumentales. Nos ayuda a cuantificar a partir de medidas no selectivas (es decir, en presencia de interferencias) y nos permite detectar muestras discrepantes en predicción. Estos modelos son especialmente útiles para el análisis cuantitativo mediante técnicas espectroscópicas. (Leardi, R, 2003).

El resultado de la calibración se puede expresar mediante un factor de calibración o de un conjunto de factores que puede tomar la forma de una curva de calibración.

Muchos de los métodos de calibración multivariante funcionan de manera similar.

Se pueden distinguir dos tipos de calibración: directa e indirecta.

Los procesos de calibración directos son aquellos en los que el valor conocido o generado (por ejemplo a partir de un patrón físico o de un material de referencia certificado) se expresa en la misma magnitud que mide el equipo. La relación entre este valor conocido o generado y el valor del instrumento de medida (valor encontrado), suele expresarse como una diferencia denominada corrección. (Ramos, 2001)

$$\text{corrección} = \text{valor generado} - \text{valor encontrado}$$

En las calibraciones indirectas, el equipo o instrumento de medida mide una magnitud que no coincide con la del patrón o material de referencia certificado.

Los parámetros del modelo se obtienen en forma de un vector de regresión de los datos de calibración de métodos de regresión como la regresión de componentes principales (PCR) o mínimos cuadrados parciales (PLS).

### **5.1.1. Preparación de la matriz de datos**

Para la realización de los análisis se preparó 9 muestras de soluciones de azúcar, ácido y alcohol. Se ha obtenido los espectros infrarrojos utilizando un espectrofotómetro FTIR\_ATR Thermo-Nicolet, y promediando sobre 64 corridas, con una longitud de onda de 700 a 1800  $\text{cm}^{-1}$  cubriendo de esta manera las huellas digitales del espectro.

Los espectros han sido digitalizados y pre tratados mediante suavización automática de la línea de base, luego normalizados mediante técnica SNV (Standar Normal Variate).

Se han obtenido un total de 54 espectros. Sucesivamente se ha seleccionado las bandas de absorción más útiles para la construcción del modelo de calibración inversa utilizando algoritmos genéticos. En la técnica de selección de las variables mediante algoritmos genéticos se codifican las variables con 1 (presencia) ó cero (ausencia) en el modelo. El conjunto de estos bits se denomina cromosoma y con estos cromosomas se construye la población inicial casual de la misma que sufre el algoritmo de evolución genética constituido de etapas iterativas de acoples entre cromosomas y mutaciones de bits en los cromosomas. Los mejores cromosomas siguen perteneciendo a la población mientras que los peores se extinguen este procedimiento ha sido realizado mediante el programa MOBYDIGS.

### **Autoscaling y normalización**

El pre-tratamiento de datos espectrales es de importancia para obtener de esta manera una clasificación de datos o una buena construcción de modelos de predicción.

Los espectros fueron normalizados mediante Autoscaling, luego se procedió a la selección de las variables significativas.

La ecuación básica para el Autoscaling de corrección tiene la siguiente fórmula:

$$X_{corr} = \frac{X_{org} - a_0}{a_1}$$

En donde:

$a$  = coeficiente de corrección para SNV y normalización

$x_{org}$  = espectro original simple

$x_{corr}$  = Espectro simple corregido

Para la normalización,  $a_0$  se igualará siempre el cero, mientras  $a_1$ , depende del tipo de normalización realizado. Hay dos tipos de normalización usados en los dos datos espectrales: el total de la suma absoluta (Distancia del Taxi) y la raíz cuadrada del total de la suma al cuadrado (Distancia Euclideana). (Da-Wen Sun, 2009).

### Distancia del Taxi

$$a_1 = \sum_{i=1}^m |X_i(org, m)|$$

En donde:

$m$  = variable index

$M$  = number of variables (or wavelengths)

### Distancia Euclideana

Para la técnica de SNV (Variable normal estándar), el  $a_0$  es el valor medio del espectro, mientras el  $a_1$  es la desviación normal del espectro.

$$a_0 = \frac{\sum_{m=1}^M X_{org,m}}{M} = X_{org}$$

$$a_1 = \frac{\sqrt{\sum_{m=1}^M [(X)_{org,m}^2]}}{M-1} = SX_{org}$$

En donde:

S= matriz de los espectros de la fuente

a0, a1, a2 =vector de parámetros de MSC estimado por mínimos cuadrados

x= matriz de espectros (n\_x p)

En comparación con MSC (multiplicative signal correction) la técnica SNV no necesita un espectro de referencia, y así ninguna decisión del usuario para el cómputo. Sin embargo, la variación normal estándar es más propensa al ruido que el MSC más robusto.

En general, el SNV y los MSC originales llevan los resultados muy similares; es decir los resultados del espectro y los resultados de regresión.

Como en el caso para el MSC y EMSC (extended multiplicative signal correction), el SNV ha transformado los datos de una manera tal, que los datos corregidos generalmente tienen una relación más lineal. La base de la distancia de Euclidean da a menudo los resultados similares a SNV ya que está basada en la raíz cuadrada de la suma al cuadrado como en SNV (Da-Wen Sun, 2009).

### 5.1.2 Métodos de construcción de modelos de predicción

Debido a que la espectroscopía es una técnica relativa las muestras utilizadas para la calibración deben ser previamente analizadas con exactitud y precisión adecuada. Esto

implica un modelo lo suficientemente capaz de conservar su capacidad de predicción para nuevas muestras a periodos más largos.

Por lo general es posible preparar mezclas de acuerdo a los principios de diseño experimental, donde las concentraciones de todos los ingredientes son muy variadas en una adecuada área de distribución.

El proceso de obtención de un modelo, presenta los siguientes pasos: elección de la muestra para su inclusión en el conjunto de calibración, determinar un método apropiado para medir las muestras, obtención de la analítica espectral de la señal, construcción del modelo, validarlo y finalmente utilizarlo para predecir muestras desconocidas.

## **5.2 REGRESIÓN DE COMPONENTES PRINCIPALES**

### **5.2.1 Calibración mediante regresión en componentes principales PCR**

La regresión de componentes principales (PCR) se refiere a un método de análisis de datos para la construcción de modelos lineales multivariantes de conjuntos de datos complejos. Este procedimiento es utilizado para superar los problemas que surge cuando las variables de exploración están cerca de ser colineales. Su objetivo es predecir las concentraciones constituyentes de un material en función de su espectro.

Este tipo de calibración se puede dividir en tres pasos:

1. Primero, se ejecuta un análisis de componentes principales en la tabla de variables explicativas.
2. El segundo paso consiste en ejecutar una simple regresión por mínimos cuadrados de los componentes seleccionados: se seleccionaran los factores que más correlacionada este con la variable dependiente.
3. Finalmente los parámetros del modelo se calculan para las variables explicativas seleccionadas. (Da Wen Sun, 2009)

### **5.2.2 Método de calibración por regresión partial least squares PLS**

La regresión por mínimos cuadrados parciales es un método estadístico que tiene una relación con la regresión de componentes principales (PCR).

La regresión PLS es un método para construcción de modelos de predicción cuando los factores son muchos y altamente colineales. El método de PLS es una herramienta útil cuando el objetivo es a predicción y no existe una necesidad práctica de limitar el número de factores medidos.

El método obtiene, a partir de la matriz  $\mathbf{X}$  (variables independientes), una matriz  $\mathbf{T}$  (variables latentes) cuyos vectores son linealmente independientes, definiendo un sistema ortogonal.

Desde el punto de vista matemático, el método PLS utiliza –interactivamente– copias del componente principal  $\mathbf{X}$  y  $\mathbf{Y}$  (cuando  $\mathbf{Y}$  contiene más de una respuesta variable) y entre estos la máxima correlación posible. (Todeschini, 1998).

### **5.2.3 Selección de las mejores longitudes de onda mediante algoritmo genético y posterior regresión por mínimos cuadrados ordinarios**

Los algoritmos genéticos ofrecen un enfoque de la función desde el punto de vista de la selección del proceso, no como un paso separado, sino como una manera integral para hacer el análisis de datos.

En la técnica de selección de las variables mediante algoritmos genéticos se codifican las variables con 1 (presencia) o cero (ausencia) en el modelo. El conjunto de estos bits se denomina cromosoma y con estos cromosomas se construye la población inicial casual la misma que sufre el algoritmo de evolución genética.

Los algoritmos genéticos como herramientas para la selección de características han sido investigados por una serie de grupos. El enfoque puede ser muy efectivo cuando la función se utiliza en condiciones físicas adecuadas. Los algoritmos genéticos no deben ser utilizados para identificar longitudes de onda específicas sino que debe utilizarse para etiquetar las regiones en el infrarrojo cercano propicio para la calibración.

El método de regresión de mínimos cuadrados es un método muy popular en aplicaciones industriales de modelación suave.

En términos de matrices, el problema de la regresión lineal con el método de mínimos cuadrados es representado en el siguiente modelo:

$$y = \mathbf{X} \boldsymbol{\beta} + e$$

Donde  $\boldsymbol{\beta}$  es el valor del coeficiente verdadero a calcular,  $\mathbf{X}$  es la matriz del modelo y  $e$  es el vector de los errores.

En términos no matriciales, podemos describir explícitamente la relación entre la respuesta  $y$  del  $i$ -ésimo objeto y su descripción de la variable independiente con la combinación lineal:

$$y = b_0 + b_1 x_{i1} + b_2 x_{i2} + \dots + b_p x_{ip}$$

La varianza del vector del coeficiente es una medida de estabilidad del modelo de regresión y es dado en la expresión:

$$V(b_{OLS}) = \sigma^2 \cdot \text{tr}(\mathbf{X}^T \mathbf{X})^{-1} = \sum_{j=1}^p (1/\lambda_j)$$

Donde  $\sigma^2$  es la varianza debido al error experimental,  $\mathbf{X}$  es la matriz de dispersión del modelo. Se observa que la varianza del coeficiente depende del producto de dos contribuciones separadas, el primero ( $\sigma^2$ ) que depende solo de la respuesta, y el segundo que depende solo del espacio de los predictores. Una vez calculado el coeficiente del modelo, es posible determinar el vector de la respuesta calculado  $\hat{y}$ .

$$\hat{y} = \mathbf{X} \mathbf{b}$$

Esta última expresión forma el modelo de regresión, construido entonces de los descriptores definidos en la matriz del modelo y del coeficiente de regresión  $\mathbf{b}$  obtenidos.

$$b'_j = \frac{b_j}{s_y} \cdot s_j$$

Donde  $s_y$  y  $s_j$  son la desviación estándar de la respuesta y del  $j$ -ésimo predictor. Este coeficiente corresponde al coeficiente de la regresión calculado por la variable, escalado y representado los pesos de cada variable del modelo de regresión. Estos coeficientes da entonces una medida de importancia de cada variable en el modelo y la suma de sus cuadrados puede ser consideradas una medida de la complejidad del modelo.

Los elementos interesantes de una matriz son los elementos diagonales  $h_{ii}$ , llamadas también función de varianza del objeto  $i$ -ésimo, para los cuales valen la siguiente propiedad.

$$h_{ii} = 1/n \quad \sum_i h_{ii} = p' \quad n = p' / n \quad h^* > 3p' / n$$

Donde  $h$  es el valor de control más allá del cual el dato puede ser considerado influyente en determinar el parámetro del modelo. El valor de  $h$  para el  $i$ -ésimo objeto es dado de:

$$h_{ii} = X_i^T (X^T X)^{-1} X_i$$

El valor mínimo de influencia (*leverage*) se encuentra en correspondencia al centro del espacio del modelo, mientras el valor máximo es relativo al punto más distante del centro del modelo. Esta propiedad de influencia es de gran importancia en cuanto permite utilizar el valor de  $h$  para valorar la distancia de cada objeto al centro del espacio del modelo y decidir si el punto experimental es bueno para construir el modelo. (Todeschini, 1998).

## **CAPITULO SEIS**

### **6. MÉTODO DE SELECCIÓN DE MUESTRAS PARA TEST SET**

#### **6.1. MÉTODOS DE VALIDACIÓN**

##### **6.1.1. Definición y tipos de métodos de validación**

La validación de un modelo de calibración multivariada es un paso crítico que debe tener lugar antes del uso del modelo de calibración.

Una vez que el modelo de calibración se ha desarrollado, su capacidad para predecir si las muestras desconocidas no están presentes en el conjunto de calibración (es decir, no utiliza para construir el modelo) debe ser evaluados.

Los resultados proporcionados por el modelo son comparados directamente con los valores de referencia, si los dos son esencialmente idénticos, el modelo se presta a predicciones precisas y es útil para determinar la propiedad de destino en el futuro (es decir, muestras desconocidas). La calidad del modelo puede evaluarse a través de la estadística antes descrita.

Las técnicas de validación más comunes son:

- Método de Leave-one-out (validación interna).
- Método de Leave-more-out (validación externa).
- Método training/evaluation splitting. (Todeschini, 1998).

### **6.1.2. Método interno y externo de validación**

La validación de un modelo consiste generalmente en la búsqueda de la estructura de un modelo que maximiza la capacidad predictiva, existe dos métodos de validación; la validación interna y la validación externa.

Los métodos de validación interna son procesos para verificar si la estructura de la agrupación de datos se ajusta, utilizando solo la información inherente a los datos. Esta es una forma de estimación sin supervisión, utilizando nada más que los datos disponibles.

Cuando se desarrolla un método nuevo mediante procedimientos aceptables de investigación o se modifica un método existente con el fin de reunir requisitos especiales, se precisa de un procedimiento de validación en tres etapas: determinación de la exactitud y la precisión de un operador único, análisis de muestras desconocidas preparadas de formas independientes y la determinación de la rigurosidad del método (ALPHA, 1992).

Para realizar el procedimiento de la validación interna de un método se debe realizar las operaciones de laboratorio por un analista único el cual debe determinar los siguientes parámetros: límites de cuantificación, la exactitud, y la precisión. Para realizar estas determinaciones se analizan mínimo 6 muestras. Se recomienda el empleo de varias concentraciones de la sustancia analizada para determinar la precisión y la exactitud la cual revelará la naturaleza de las relaciones existentes entre las características del método y la concentración de la sustancia analizada (ALPHA, 1992).

### **6.1.3. Método de Bootstrap**

El Bootstrap es una técnica de validación que utiliza solo el conjunto de datos formados. Una fracción de las muestras se elige al azar de los datos y un discriminante es desarrollado a partir de ellos. El discriminante es entonces validado con todas las muestras en el conjunto original de datos y la fracción de las muestras, correctamente clasificadas, es computarizada. Este mismo procedimiento se repite 100 veces y el promedio de clasificación correcta de la tasa de éxito obtenido para el conjunto de validación es igual a la tasa de reconocimiento para el clasificador. (Bradley, 1993).

Este método es utilizado solo si se dispone de cálculos suficientemente poderosos en cuanto es necesario proceder a la extracción de muchos  $n$ -dimensionales (por lo menos mil), para tener una estimación fiable del valor medio del parámetro predictivo seleccionado.

En general se cree que un modelo bueno tiene que conservar un buen poder predictivo aun cuando se sometió a una gran perturbación. Es necesario tener presente que la eliminación del training set de un número excesivo de objetos en la construcción de los modelos pueden extraviar completamente una parte de información fundamental en la construcción del modelo mismo y que por consiguiente esto inevitablemente no puede prever conductas correctamente características de objetos presentes en el juego de la evaluación. (Todeschini, 1998).

#### **6.1.4. Determinación del coeficiente de regresión cross validado mediante el set sintético externo**

Este método de validación cruzada, es el que tolera una mínima perturbación, en cuanto, cada modelo siempre es calculado utilizando los datos  $n-1$  y es lo que proporciona una comparación en predicción entre el modelo obtenido con métodos diversos y los descriptores diferentes. El límite de este método de validación es que extiende al valor de  $R^2$  en fitting al crecimiento de número  $n$  de las muestras; por este motivo el método leave –one-out puede acomodar los valores predictivos fijos si el número de muestras es bastante elevado. (Todeschini, 1998).

#### **6.1.5. Determinación del coeficiente de regresión cross validado mediante un set real externo**

La regresión cross validada es utilizada para estimar la capacidad predictiva de un modelo de calibración. La cross validación se realiza mediante la estimación de  $n$  modelos de calibración, donde cada una de las  $n$  muestras de calibración se queda fuera a su vez de uno en uno.

Este método es una generalización del método leave-one-out. Los datos vienen subdivididos en  $G$  grupos de cancelación en modo tal que  $k$  objeto para un  $n/G$  es asignado a la evaluación entera y por consiguiente se excluye del training set: el modelo

estimado de un training set constituido de  $n-k$  objetos, es utilizado para predecir la respuesta de  $k$  excluido el objeto del modelo. Los objetos de  $k$  se escogen al azar y cíclicamente se excluyen de los cálculos.

## 6.2. Resultados y Discusión

Se ha preparado 9 soluciones patrones sintéticas que contienen: etanol, sacarosa y ácido tartárico, cuyos datos experimentales se han obtenido utilizando un espectrofotómetro FTIR\_ATR Thermo-Nicolet.

A continuación se indica los porcentajes utilizados para la preparación de las muestras sintéticas.

MUESTRAS	ÁCIDO TARTÁRICO	ETANOL	SACAROSA
	%	%	%
1	0,5	10	0,8
2	1,5	15	1,8
3	2,5	20	2,8
4	3,5	25	3,8
5	4,5	30	4,8
6	5,5	35	5,8
7	6,5	40	6,8
8	7,5	45	7,8
9	8,5	50	8,8

Tabla 6.2. Porcentajes para la preparación de muestras sintéticas

La lectura de las diferentes muestras en el espectrofotómetro infrarrojo se realizó de la siguiente manera:

- Se coloca una pequeña muestra sobre la placa, la cual debe cubrir hasta la parte superior de la misma.
- Luego de esto se coloca la placa en el soporte del espectrofotómetro y se realiza la lectura.
- Los valores obtenidos mediante la espectroscopía infrarroja se miden en relación de la longitud de onda y de la absorbancia, la cual se representa por medio de curvas.
- Los espectros recogidos han sido pretratados corrigiendo la línea de base, suavización y sucesivo autoscaling.

- Los modelos de calibración se han construido utilizando estas soluciones sintéticas, para determinar cual es la mejor opción para análisis de acidez, azúcares y alcohol en bebidas alcohólicas.
- Se han recogido un total de 54 espectros. La selección de las bandas se ha realizado mediante software MOBY-DIGS.

El siguiente gráfico presenta los espectros de las respectivas muestras sintéticas.

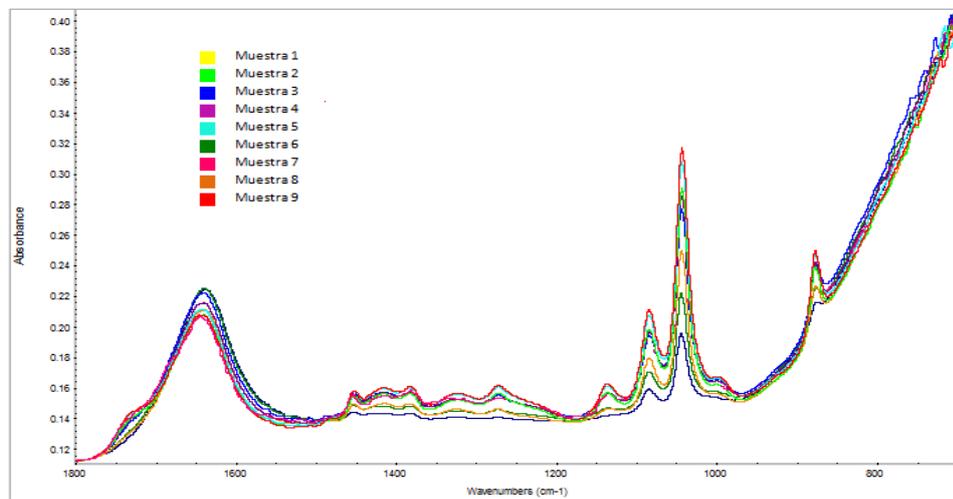


Gráfico 6.2.1. Espectros recogidos de muestras de soluciones sintéticas

Fuente: Autoras

### 6.3. ALGORITMO GENETICO

#### 6.3.1. MODELO DE CALIBRACIÓN PARA LA ACIDEZ

El algoritmo genético ha seleccionado como mejor modelo el siguiente:

Nº		Coficiente Regresión	Error Coef. Reg	Intervalos Confianza (.95)	Coef. Reg. Estand.
----	--	----------------------	-----------------	----------------------------	--------------------

-	<b>Intercept</b>	-1.5721	0.30273	0.62786	-
	<b>Cte. (cm<sup>-1</sup>)</b>				
1	1060	33.79492	5.40951	11.21933	2.09431
2	1080	-14.01625	4.62291	9.58792	-1.06079
3	1190	-98.84645	7.60879	15.78063	-5.44451
4	1240	81.73059	7.32988	15.20216	4.83689

**Tabla 6.3.1.** Bandas seleccionadas por el algoritmo genético en la determinación de acidez

### Fórmula de calibración

$$\% \text{ Concentración de acidez} = -1.5721 + 33.79492 \times A(1060) - 14.01625 \times A(1080) - 98.84645 \times A(1190) + 81.73059 \times A(1240)$$

Donde:

A= Es la absorbancia autoescalada

Siendo una regresión multivariante con 4 variables independientes no se puede representarla gráficamente.

La presente tabla indica que la banda más influyente de forma positiva con el modelo de regresión es 1240 cm<sup>-1</sup> presentando el mayor valor del coeficiente estandarizado (4.83689).

La segunda banda que influye positivamente es la de 1060 cm<sup>-1</sup>.

La primera banda que influye de manera negativa es 1080cm<sup>-1</sup>, cuyo coeficiente estandarizado es -1.06079. La segunda banda negativa se ubica en 1190cm<sup>-1</sup>. La presencia de valores negativos en la regresión no es de fácil interpretación ya que pueden ser interpretados como correcciones del valor calculado con la banda principal para la obtención de un ajuste primitivo óptimo.

Los parámetros de calidad del modelo de interpolación y predicción del modelo de calibración para la acidez se presentan en la siguiente tabla:

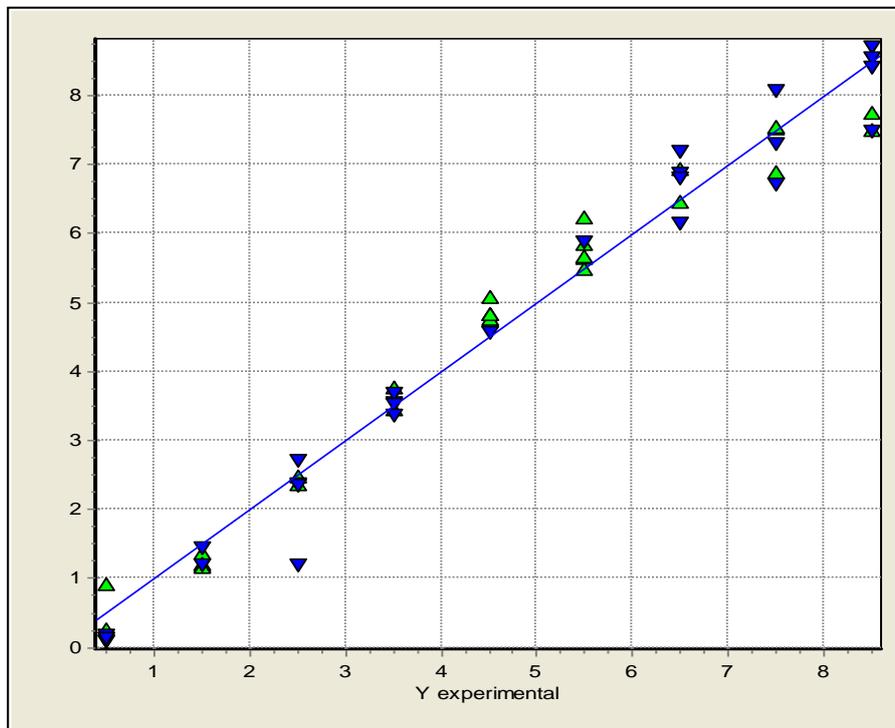
<b>Q2loo</b>	<b>R2</b>	<b>R2adj</b>
97.24	98.38	98.08

**Tabla 6.3.1.1.** Parámetros de calidad del modelo en la determinación de acidez

El valor de  $R^2$  Bootstrap confirma la estabilidad del modelo en predicción con un valor del 98.38 %.

El índice de la regresión en predicción  $Q^2_{100}$  ha sido calculado por el programa Moby Digs,  $R^2$  y  $R^2_{adj}$  son respectivamente el porcentaje de varianzas explicadas por el modelo tal cual en el primer caso y corregida por la complejidad del modelo en el segundo caso.

En el gráfico 6.3.1. Se indica la correlación entre el porcentaje de acidez experimental y el predicho por el modelo propuesto

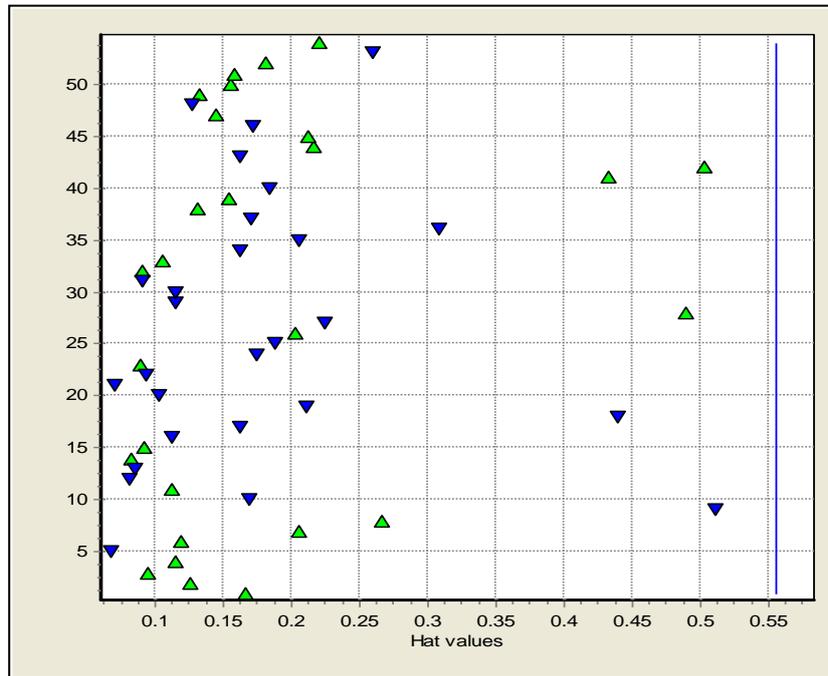


**Gráfico 6.3.1.** Correlación entre el contenido experimental y predicho por el modelo en la determinación de acidez

Fuente: Autores

Los triángulos azules representan en el gráfico al test set y los triángulos verdes corresponden al training set. Con el gráfico propuesto se puede indicar que la predicción del modelo es buena.

En el gráfico 6.3.1.1. Se representa la distribución de los residuos normalizados vs. la respuesta experimental.



**Gráfico 6.3.1.1.** Distribución de muestras patrón vs Distribución de residuos normalizados en la determinación de acidez

Fuente: Autores

En este gráfico se puede apreciar la estabilidad de modelo ya que todos los valores están sobre la línea de control.

En el gráfico 6.3.1.2. Se representa la distribución de los residuos normalizados vs. la respuesta experimental.

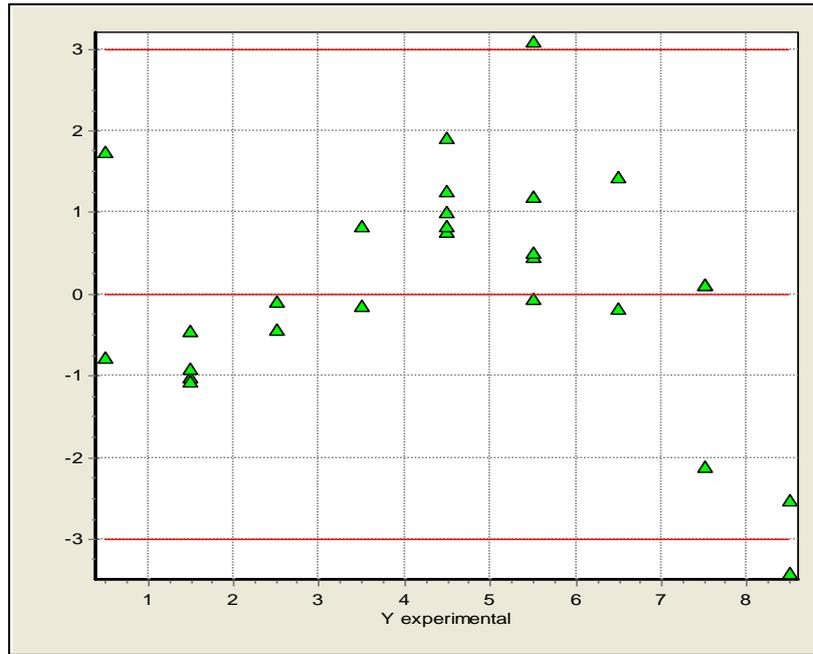


Gráfico 6.3.1.2. Distribución de los Residuos Normalizados en la determinación de acidez

Fuente: Autores

Los residuos se distribuyen en forma casual con tendencia uniforme indicando que el modelo aplicado es bastante bueno ya que presenta solo 2 valores que se encuentran fuera de la línea de control.

### 6.3.2. MODELO DE CALIBRACIÓN PARA EL ALCOHOL

El algoritmo genético ha seleccionado como mejor modelo el siguiente:

Nº		Coefficiente Regresión	Error Coef. Reg	Intervalos Confianza (.95)	Coef. Reg. Estandarizado
-	<b>Intercept</b>	-9.41558	1.68276	3.50013	-
	<b>Cte. (cm<sup>-1</sup>)</b>				
1	1070	81.5951	8.44233	17.56005	0.8542
2	1240	-1205.38405	274.3468	570.6413	-9.66858
3	1250	1625.64507	192.123	399.6158	13.24554
4	1310	-1400.55495	336.9711	700.8998	-12.02464
5	1370	910.28048	229.2213	476.7803	8.07868

Tabla 6.3.2. Bandas seleccionadas por el algoritmo genético en la determinación de alcohol

### Fórmula de calibración

$$\% \text{ Concentración de alcohol} = -9.41558 + 81.5951 \times A(1070) - 1205.38405 \times A(1240) + 1625.64507 \times A(1250) - 1400.55495 \times A(1310) + 910.28048 \times A(1370)$$

Donde:

A= Es la absorbancia autoescalada

Siendo una regresión multivariante con 5 variables independientes no se puede representarla gráficamente.

La banda más influyente el modelo de regresión es la de  $1250 \text{ cm}^{-1}$  presentando el mayor valor del coeficiente estandarizado (13.24).

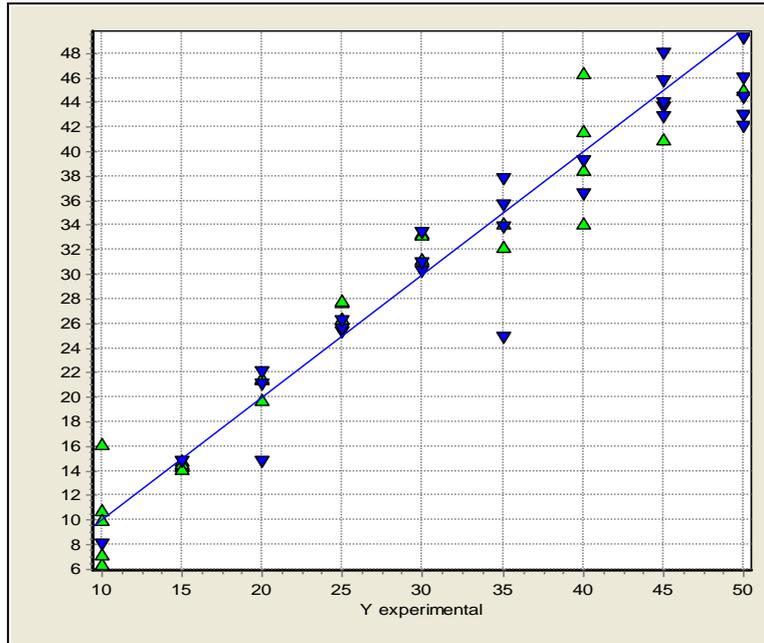
La siguiente tabla presenta los parámetros de calidad del modelo de interpolación y predicción del modelo de calibración para el alcohol.

<b>Q2loo</b>	<b>R2</b>	<b>R2adj</b>
93.99	97.7	97.15

**Tabla 6.3.2.1.** Parámetros de calidad del modelo en la determinación de alcohol.

Con el modelo de R2 Bootstrap cuyo valor es de 97.7%.confirmamos la estabilidad del modelo en predicción.

En el gráfico 6.3.2.Se indica la correlación entre el porcentaje de alcohol experimental y el predicho por el modelo propuesto.

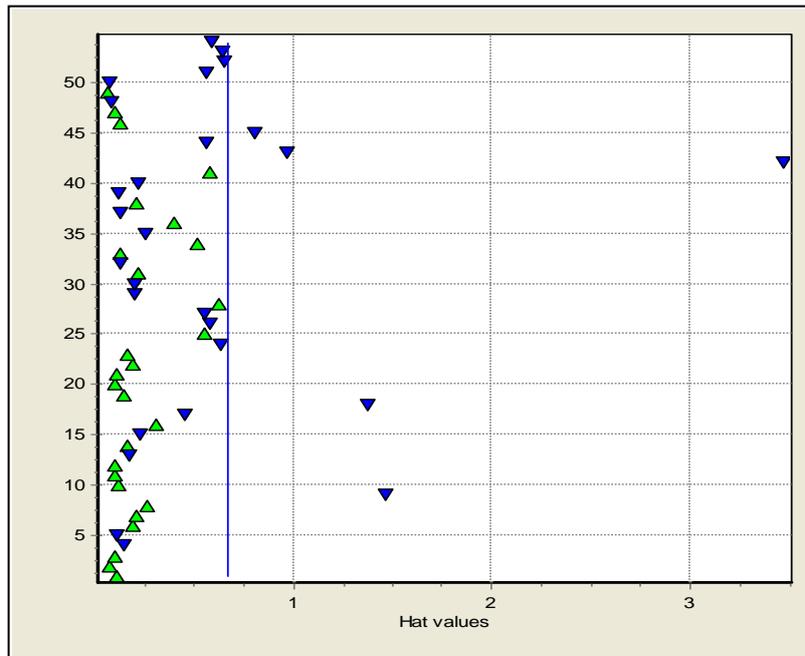


**Gráfico 6.3.2.** Correlación entre el contenido experimental y predicho por el modelo en la determinación de Alcohol

Fuente: Autores

En este gráfico la predicción del modelo indica que es buena, solo un valor se encuentra fuera de la línea de corrección.

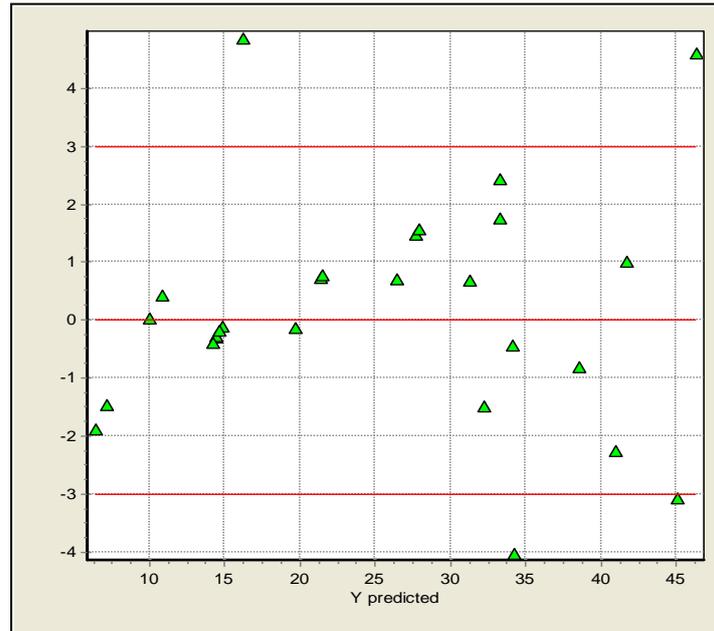
En el gráfico 6.3.2.1. Se observa la distribución de los residuos normalizados vs. la respuesta experimental en la determinación de alcohol.



**Gráfico 6.3.2.1.** Distribución de muestras patrón vs Distribución de residuos normalizados en la determinación de Alcohol

Fuente: Autores

En este gráfico a comparación con el de la determinación de acidez, presenta menos estabilidad del modelo, debido a la presencia de una mayor cantidad de valores fuera de la línea de corrección, pero debido a que es un bajo porcentaje se considera también como un modelo bueno.



**Gráfico 6.3.2.2.** Distribución de los Residuos Normalizados en la determinación de Alcohol

Fuente: Autoras

A pesar de la presencia de más valores fuera de la línea de control en comparación con los valores determinados en la acidez, se considera a este modelo aplicado como óptimo ya que los residuos se distribuyen en forma casual con tendencia uniforme.

### 6.3.3. MODELO DE CALIBRACIÓN PARA AZÚCARES

El algoritmo genético ha seleccionado como mejor modelo el siguiente:

Nº		Coefficiente Regresión	Error Coef. Reg	Intervalos Confianza (.95)	Estandar Coef. Reg.
-	<b>Intercept</b>	-0.89045	0.41904	0.8691	-
	<b>Cte. (cm<sup>-1</sup>)</b>				
1	1060	40.02546	7.86965	16.32166	2.4897
2	1090	-31.00169	11.56378	23.98328	-1.89568
3	1180	-66.80375	2.90389	6.02267	-3.57403
4	1240	59.31977	5.4646	11.33357	3.44901

**Tabla 6.3.3.** Bandas seleccionadas por el algoritmo genético en la determinación de azúcares

### Fórmula de calibración

$$\% \text{ Concentración de azúcares} = -0.89045 + 40.02546 \times A(1060) - 31.00169 \times A(1090) - 66.80375 \times A(1180) + 59.31977 \times A(1240)$$

Donde:

A= Es la absorbancia autoescalada

Siendo una regresión multivariante con 4 variables independientes no se puede representarla gráficamente.

El modelo de regresión indica que la banda más influyente es la de 1240  $\text{cm}^{-1}$  presentando el mayor valor del coeficiente estandarizado (3.44), en el caso de azúcares. La segunda banda más influyente en forma positiva es 1060  $\text{cm}^{-1}$ , presentando 2.4897 como coeficiente de regresión.

Las bandas que influyen negativamente se ubican en 1090  $\text{cm}^{-1}$ , 1180  $\text{cm}^{-1}$ , cuyos coeficientes estandarizados son -1.89568, -3.57403, respectivamente.

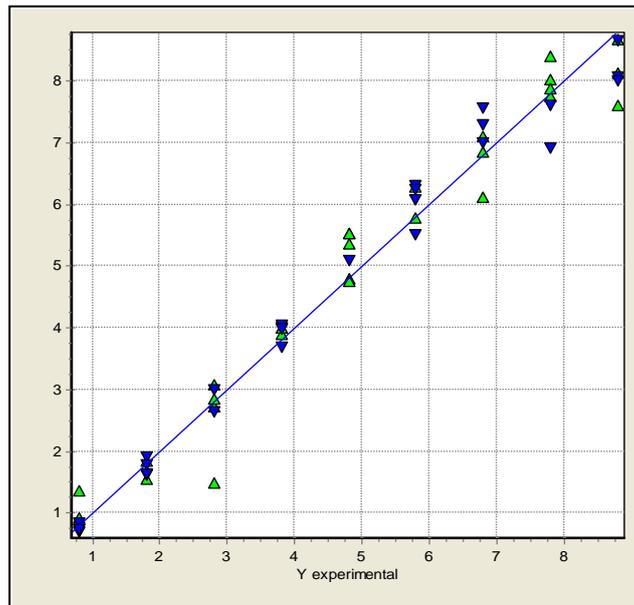
Los parámetros de calidad del modelo de interpolación y predicción del modelo de calibración en azúcares es la siguiente:

Q2loo	R2	R2adj
95.85	97.34	96.86

**Tabla 6.3.3.1.** Parámetros de calidad del modelo en la determinación de azúcares

El valor de R2 Bootstrap confirma la estabilidad del modelo en predicción con un valor del 97.34%.

En el gráfico 6.3.3. Se indica la correlación entre el porcentaje de azúcar experimental y el predicho por el modelo propuesto.

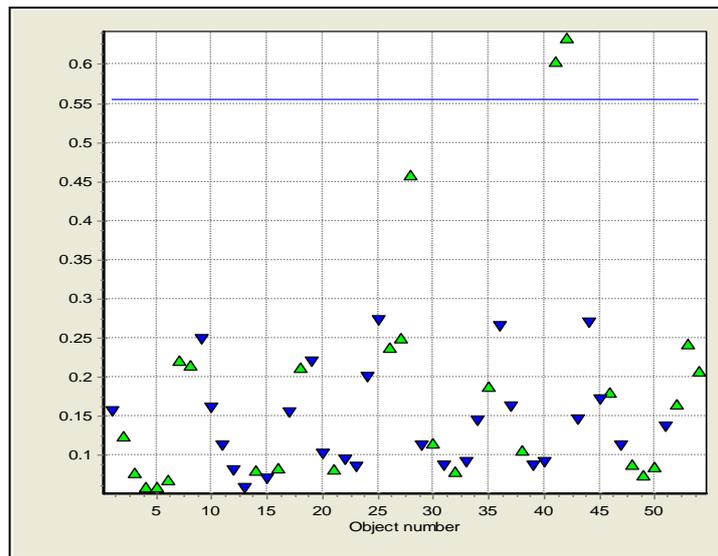


**Gráfico 6.3.3.** Correlación entre el contenido experimental y predicho por el modelo en la determinación de azúcares

Fuente: Autores

En cuanto al modelo en la determinación de azúcares tanto el training set como el test set presenta un modelo bueno como indica el gráfico.

En el gráfico 6.3.3.1. Se representa la distribución de los residuos normalizados vs. la respuesta experimental en la determinación de azúcares.

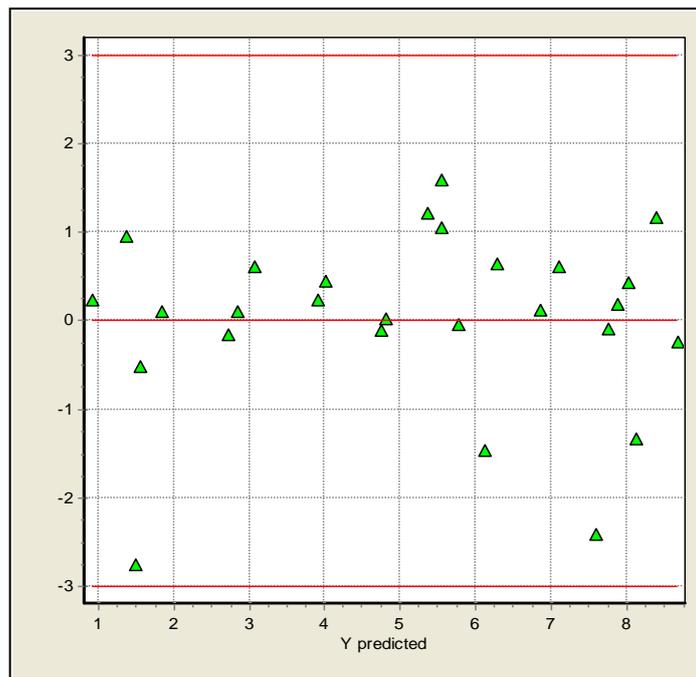


**Gráfico 6.3.3.1.** Distribución de muestras patrón vs Distribución de residuos normalizados en la determinación de Alcohol

Fuente: Autores

En este gráfico se puede apreciar la estabilidad de modelo ya que la mayor cantidad de datos están dentro de la línea de control.

En el gráfico 6.3.3.2. Se representa la distribución de los residuos normalizados vs. la respuesta experimental.



**Gráfico 6.3.3.2.** Distribución de los Residuos Normalizados en la determinación de Alcohol

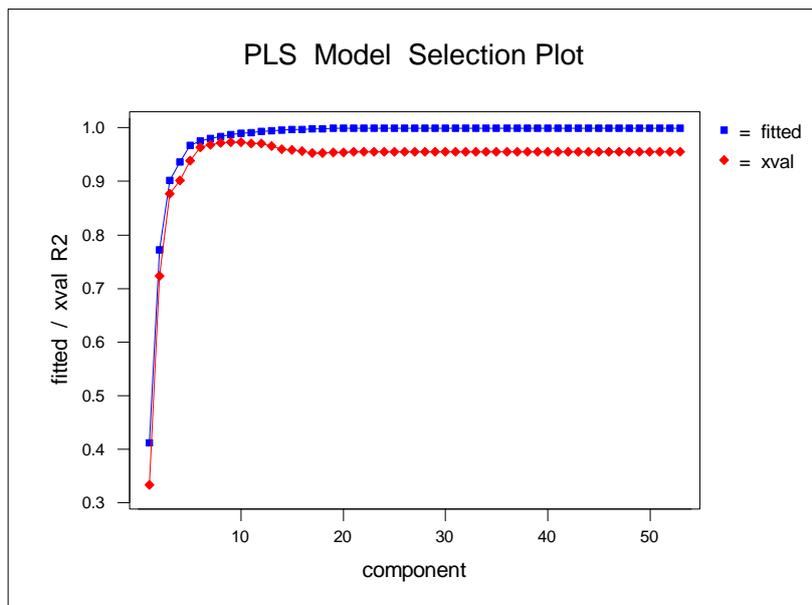
Fuente: Autores

En cuanto en la determinación de azúcares se observa en el gráfico que los residuos se distribuyen con tendencia prácticamente uniforme indicando un buen modelo.

### 6.3.4. MÉTODO PLS (PARTIAL LEAST SQUARES)

#### 6.3.4.1. MODELO DE CALIBRACIÓN PARA ACIDEZ

El siguiente gráfico representa el modelo de selección, indicando cuantos componentes se utilizaron para obtener el mejor modelo.

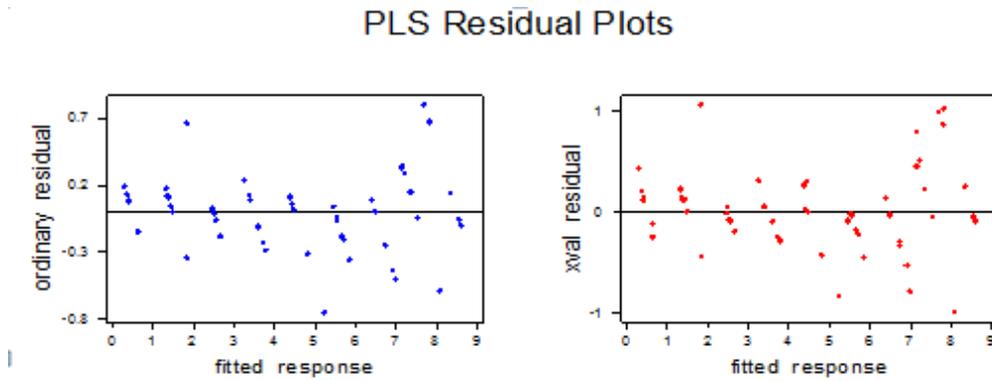


**Gráfico 6.3.4.1.** Modelo de Selección PLS en acidez

Fuente: Autores

El gráfico indica que el mejor modelo de PLS es el de 9 combinaciones lineales de longitudes de onda, debido a que se observa la correlación entre la respuesta experimental y el componente en estudio, observando que el modelo de calidad del modelo de validación llega muy lentamente hasta el componente 10 y luego se estabiliza.

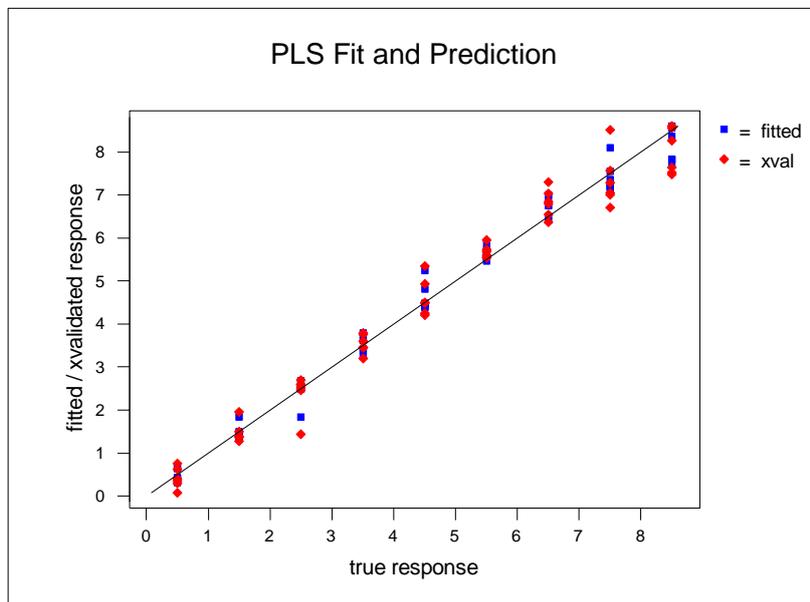
El siguiente gráfico determina el residuo normal de PLS, el cual se denota si los residuos del valor x son distribuidos según el residuo ordinario el modelo es válido.



**Gráfico 6.3.4.2.** Residuo Normal en PLS en acidez

Fuente: Autoras

En el gráfico 6.3.4.3. Se muestra la correlación entre valores experimentales y calculados con el modelo de 9 componentes.

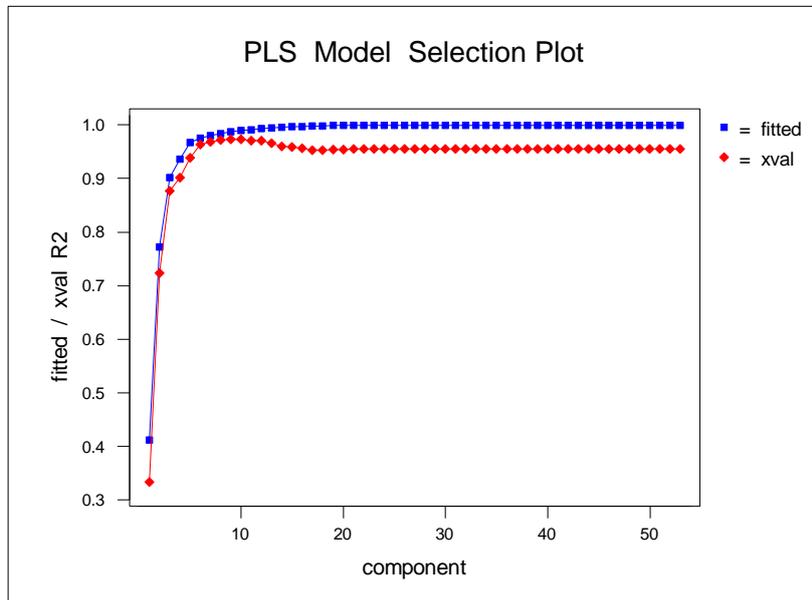


**Gráfico 6.3.4.3.** Respuesta experimental vs Respuesta Predictiva en acidez

Fuente: Autoras

### 6.3.5. MODELO DE CALIBRACIÓN PARA ALCOHOL

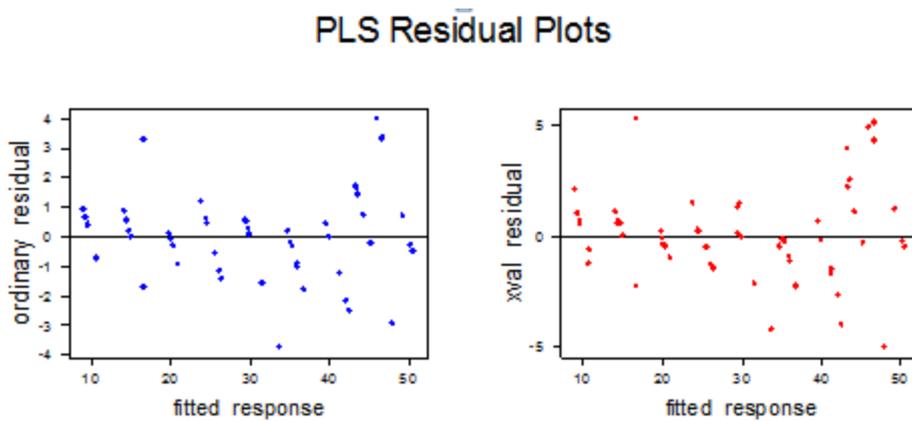
En el caso del alcohol el mejor modelo de seleccion en PLS es el de 9 componentes ya que a partir de este se estabiliza.



**Gráfico 6.3.5.** Modelo de Selección PLS en alcohol

Fuente: Autoras

En el gráfico 6.3.5.1. Determina el residuo normal de PLS, el cual se denota si los residuos del valor x son distribuidos según el residuo ordinario el modelo es válido.



**Gráfico 6.3.5.1.** Residuo Normal en PLS en alcohol

Fuente: Autoras

En el gráfico 6.3.5.2. Se nota la correlación entre valores experimentales y calculados con el modelo de 9 componentes.

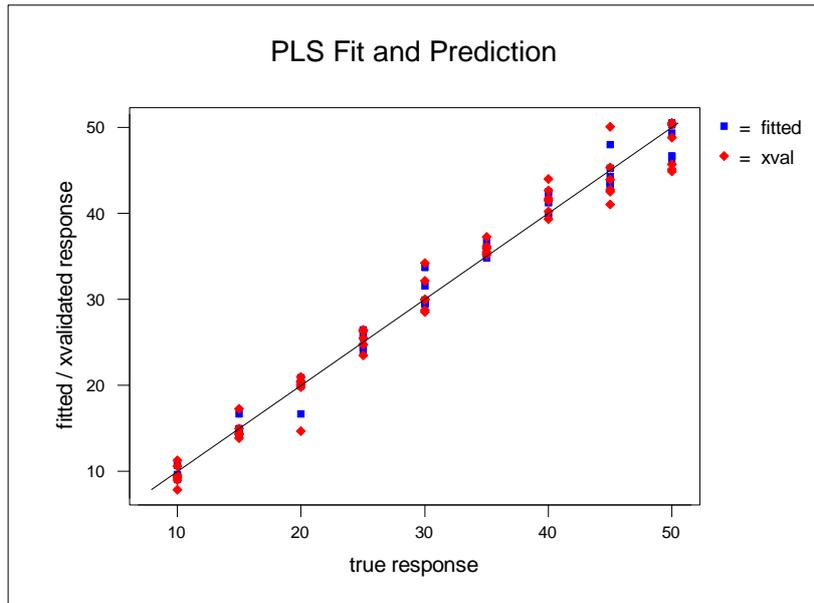


Gráfico 6.3.5.2. Respuesta experimental vs Respuesta Predictiva en alcohol

Fuente: Autores

### 6.3.6. MODELO DE CALIBRACIÓN PARA AZÚCARES

El mejor modelo de selección en PLS para azúcares es el de 9 componentes ya que a partir de este se estabiliza.

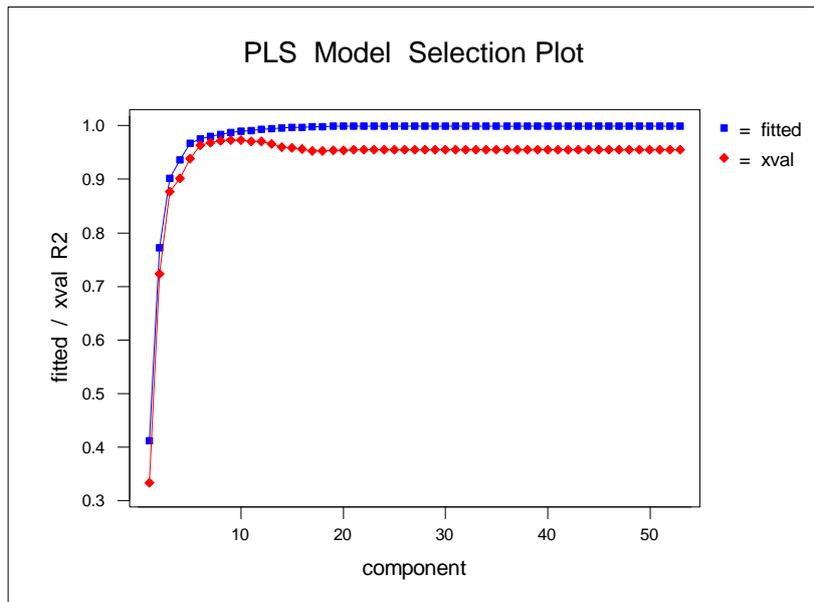
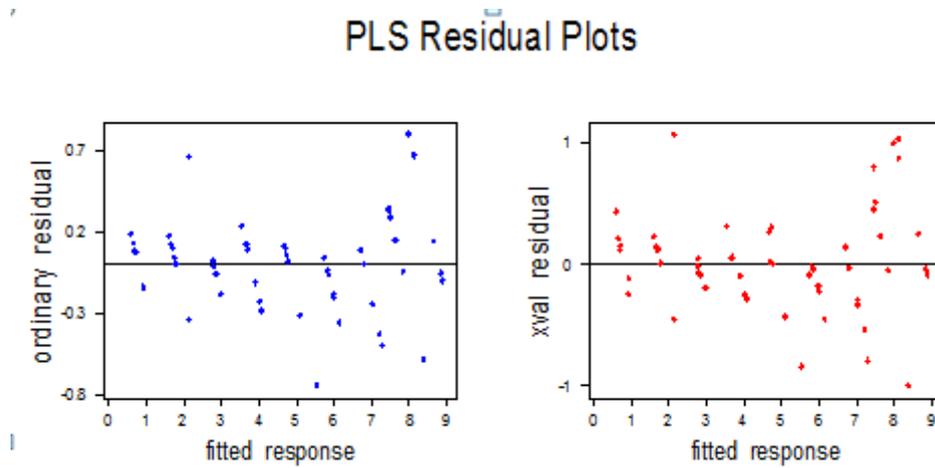


Gráfico 6.3.6. Modelo de Selección PLS en azúcares

Fuente: Autores

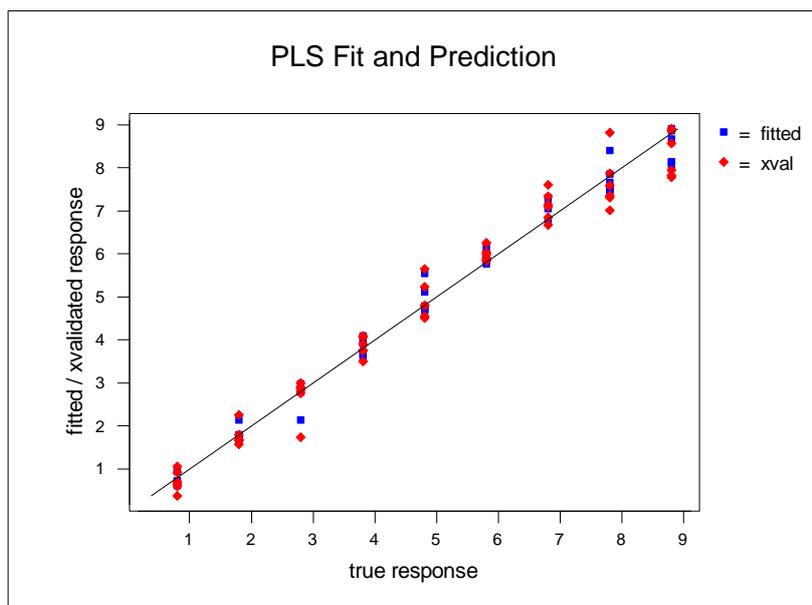
En el gráfico 6.3.6.1. Determina el residuo normal de PLS, el cual se denota si los residuos del valor x son distribuidos según el residuo ordinario el modelo es válido.



**Gráfico 6.3.6.1.** Residuo Normal en PLS en azúcares

Fuente: Autoras

En el gráfico 6.3.6.2. Se nota la correlación entre valores experimentales y calculados con el modelo de 9 componentes.

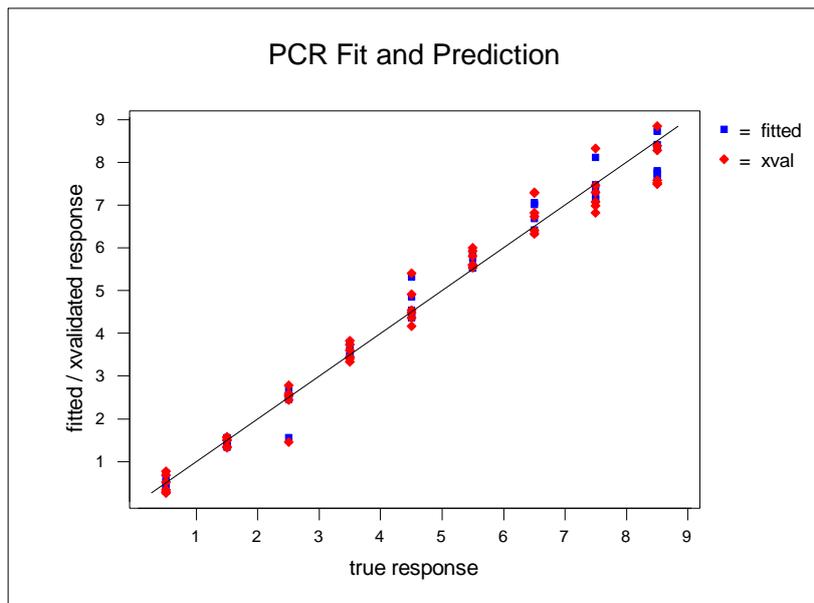


**Gráfico 6.3.6.2.** Respuesta experimental vs Respuesta Predictiva en azúcares

Fuente: Autores

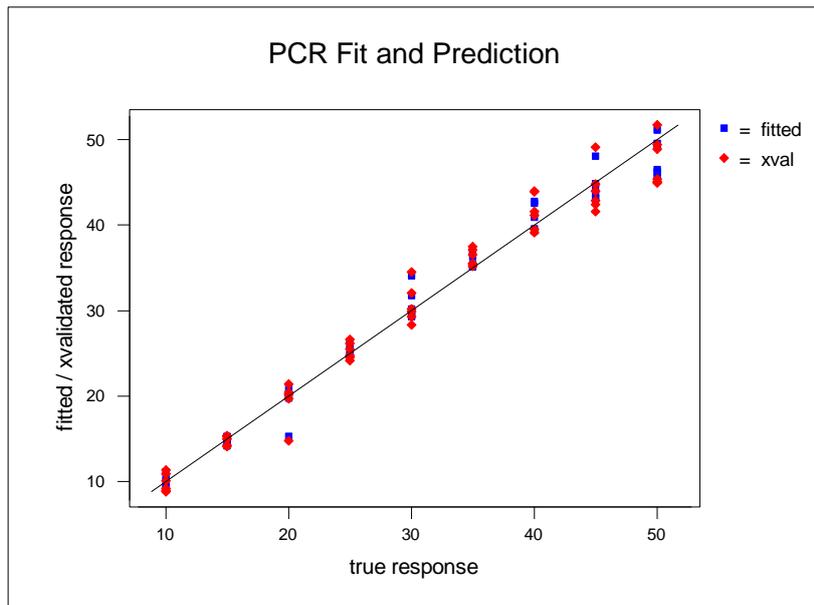
### 6.3.7. MÉTODO PCR (PRINCIPAL COMPONENTS REGRESSION)

El método PCR permite observar la relación entre el modelo propuesto y el componente en predicción; que indica cuantos componentes se utilizan para obtener el mejor modelo.



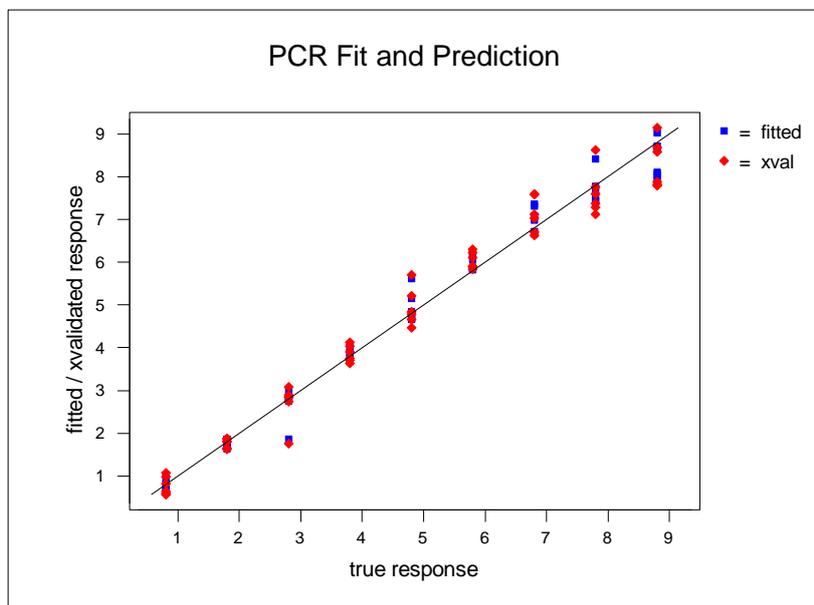
**Gráfico 6.3.7.** Respuesta Experimental vs Respuesta en Predicción en acidez

Fuente: Autores



**Gráfico 6.3.7.1.** Respuesta Experimental vs Respuesta en Predicción en alcohol

Fuente: Autores



**Gráfico 6.3.7.2.** Respuesta Experimental vs Respuesta en Predicción en azúcares

Fuente: Autores

En los 3 gráficos anteriores se observa la correlación entre los valores experimentales y calculados con el modelo de 9 componentes.

La correlación en validación es muy buena tanto en la determinación de acidez, alcohol y azúcares como indica  $R^2_{cv}$  que dio 0.9737.

#### 6.4. Comparación de las muestras reales seleccionadas entre los Métodos Clásicos y los Métodos de calibración que son obtenidos por curvas mediante la Espectroscopia infrarroja.

##### ACIDEZ

MÉTODOS	Aguardiente	Ron	Vino	Vodka	Whisky
	%	%	%	%	%
<b>Algoritmo Genético</b>	1,150	1,449	0,617	0,910	0,987
<b>Titulación (Acidez Titulable)</b>	0,837	0,915	0,368	0,645	0,781
<b>Regresión Parcial de Mínimos Cuadrados (PLS)</b>	6,868	7,552	7,994	5,876	7,112
<b>Regresión de Componentes Principales (PCR)</b>	9,531	9,949	10,151	8,716	9,573

Tabla 6.4. Valores de acidez de las bebidas alcohólicas seleccionadas

Los valores representados en la tabla 6.4., nos demuestran que en la determinación de acidez, el método de algoritmos genéticos es comparable con el método de titulación (Acidez titulable), cuyos resultados presenta un porcentaje mínimo de error.

##### ALCOHOL

MÉTODOS	Aguardiente	Ron	Vino	Vodka	Whisky
	%	%	%	%	%
<b>Algoritmo Genético</b>	40,456	48,808	6,233	29,323	42,667
<b>Método Clásico Gascromatografía</b>	39,980	38,621	12,075	31,906	41,101
<b>Regresión Parcial de Mínimos Cuadrados (PLS)</b>	41,844	45,267	47,476	36,886	43,062
<b>Regresión de Componentes Principales (PCR)</b>	55,152	57,241	58,251	51,077	55,358

Tabla 6.4.1. Valores de alcohol de las bebidas alcohólicas seleccionadas

Los valores expuestos en la tabla 6.4.1., nos indican al método de algoritmos genéticos como el más adecuado en la determinación de alcohol, debido a que sus resultados son más próximos en comparación con el método clásico gascromatográfico.

## AZÚCARES

<b>MÉTODOS</b>	<b>Aguardiente</b>	<b>Ron</b>	<b>Vino</b>	<b>Vodka</b>	<b>Whisky</b>
	%	%	%	%	%
<b>Algoritmo Genético</b>	2,700	3,337	1,564	2,274	2,505
<b>Método químico clásico (Licor de Fehling)</b>	0	2,100	1,912	1,008	2,009
<b>Regresión Parcial de Mínimos Cuadrados (PLS)</b>	7,168	7,852	8,294	6,176	7,412
<b>Regresión de Componentes Principales (PCR)</b>	9,831	10,249	10,451	9,016	9,873

Tabla 6.4.2. Valores de azúcares de las bebidas alcohólicas seleccionadas

En la tabla 6.4.2., exponenuevamente los resultados del método de algoritmos genéticos para el análisis de azúcares en este tipo de bebidas, cuyos valores presenta un menor porcentaje de error en comparación con los valores del método de analítico para la determinación de azúcares aplicadas en las diferentes bebidas alcohólicas analizadas.

La tabla de valores de azúcares de las bebidas alcohólicas seleccionadas, indica que el valor obtenido mediante regresión de algoritmo genético en la muestra de aguardiente da un porcentaje de 2,700% con el Método químico clásico (Licor de Fehling), cuyo valor es 0%; presentando un margen de error considerable; debido a diferentes circunstancias que pueden influenciar en la preparación de muestras (falta de calibración de los equipos, factores como el tiempo, calor, etc).

## CONCLUSIONES

Se logró con el presente proyecto aplicar una técnica simple, fiable y rápida, para la determinación de los componentes principales presentes en las bebidas alcohólicas, señaladas previamente, todo esto se logró mediante la aplicación del espectro infrarrojo FTIR\_ATR Thermo-Nicolet.

Para los resultados de las muestras analizadas en el espectrofotómetro se aplicaron ecuaciones como se representan bajo las tablas 6.3.1, 6.3.2 y 6.3.3, respectivas a los modelos de calibración utilizados. Estas por ser regresiones multivariantes de 4 y 5 variables independientes no pueden ser representadas gráficamente.

Sobre la base de la tabla número 6.4, 6.4.1, 6.4.2, se puede notar como el método infrarrojo presentado y la selección genética de las longitudes de onda producen resultados que son más cercanos a los resultados químicos clásicos. Sin embargo el método presentado en este trabajo, posee ventajas de tiempos de análisis más breves (la lectura del espectro dura 2 minutos y el cálculo de los resultados utilizando las ecuaciones no duran más de 10 minutos).

Mediante los resultados del análisis de datos se puede verificar que el modelo sugerido por el algoritmo genético, presenta características de ser el mejor predictor de todos, cuyos resultados experimentales son coherentes a comparación de los resultados obtenidos por los métodos clásicos tanto en porcentajes de acidez, alcohol y azúcares en las bebidas seleccionadas (aguardiente, ron, vodka, vino y whisky) para este proyecto. A parte de las ventajas mencionadas anteriormente este método se lo considera rápido, no daña el ambiente y en su aplicación no se utiliza reactivos.

## BIBLIOGRAFÍA

- B. COLTHUP Norman, H. DALY Lawrence, E. WIBERLEY Stephen, 1975, Introduction to infrared and Raman spectroscopy. Second Edition. Academy Press.
- CHANG R, 2001, Basic principles of Spectroscopy. Mc-Graw-Hill. New York.
- DA-WEN Sun, 2009, Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control. First Edition.
- D.L. MASSART, B.G.M. VANDEGINSTE, L.M.C. BUYDENS, S. DE JONG, P.J. LEWI, J. SMEYERS-VERBEKE, 1997, Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A, Elsevier.
- ELIZONDO Leticia, 2001, Nuestra Salud, Editorial LIMUSA S.A, México.
- ESPANTALEÓN Rafael, DE JUANA Manuel, 2002, Bar y Cafetería, Ediciones NORMA, España.
- GARCÍA Francisco, MUELA Mario, GARCÍA Pedro, 2003, Bebidas, Thomson Ediciones PARANINFO S.A, Madrid España.
- GEISSMAN T.A., 1994, Principios de Química Orgánica, Segunda edición, Editorial Reverté, S.A.
- GEMPERLINE Paul, 2006, Practical Guide to Chemometrics. CRC Press Taylor & Francis Group. Second Edition. London.
- HSU Sherman, Ph.D., 2003, Infrared Spectroscopy, Mallinckrodt. Inc.
- <http://es.wikipedia.org/wiki/Alcohol>
- <http://www.textoscientificos.com/quimica/alcoholes>.
- KALIVAS, 1999, J. H., Calibration Methodologies.
- KUKLINSKY Claudia, Nutrición y Bromatología, Ediciones OMEGA S.A., Plató, Barcelona.
- LEARDI, R., 2003, Genetic Algorithms in Chemometrics and Chemistry.
- LÓPEZ Agustín, GARCÍA GARIBAY Mariano, QUINTERO RAMÍREZ Rodolfo, 2004, Biotecnología Alimentaria, Editorial LIMUSA, S.A. DE C.V. Grupo Noriega Editores, Balderas 95, México, D.F.

- MADRID CENZANO Javier, MADRID Vicente Antonio, MORENO TEJERO Gema, 2003, Análisis de vinos, mostos y alcoholes, AMV Ediciones, Primera edición.
- MARK BERG Jeremy, STRYER Lubert, L Jhon, TYMOCZKO, 2007, Bioquímica. Editorial REVERTÉ, S.A., Barcelona-España.
- PARE J.R.J, BELANGER J.M.R, 1997, Instrumental Methods in food analysis. Elsevier Science B.V.
- PREZ Laura, DE RINCÓN Sandi, 2001, El vino, el arte que se puede beber, Panorama Editorial, S.A. de C.V., México D.F.
- RAMIS RAMOS Guillermo, GARCIA ALVAREZ COQUE Ma. Celia, Quimiometria. Editorial Sintesis S.A., España.
- SÁNCHEZ M.T., DE LAS INFANTAS Pineda, 2003, Procesos de Elaboración de Alimentos y Bebidas, IRAGRA, S.A. Madrid-España.
- ROCA-PARDIN J, CADARSO-SUAREZ C, 2009, Regression Models with Environmetrical Applications.
- STUART Barbara, 2004, Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications. John Wiley & Sons Ltda.
- TODESCHINI Roberto, 1998, Introduzione alla Chemiometria. Editorial Edises. Milano, Italia.
- VALENCIA DÍAZ Félix, 2008, Enología: Vinos, Aguardientes y Licores, Editorial Vértice S.L., España.
- WHIESENTHAL Mauricio, 2004, La cultura del vino, Editorial Amat SI., Barcelona.

## ANEXOS

### ANEXO 1: ENCUESTA

**Esta encuesta tiene como propósito conocer sobre las preferencias de consumo de diferentes bebidas alcohólicas y sus tipos en la ciudad de Cuenca.**

#### DATOS GENERALES

**FECHA:** .....

#### INDICACIONES:

Lea cuidadosamente todas las alternativas de la encuesta y elíjalas por favor con absoluta sinceridad.

#### PREGUNTAS

**1. ¿Con qué frecuencia consume bebidas alcohólicas?**

- A menudo (todos los días) ( )
- Casi siempre (2 o 3 veces a la semana) ( )
- Poco (una vez a la semana) ( )
- Rara vez (una vez al mes) ( )
- Nunca ( )

**2. ¿Cuál de estas marcas y tipos de AGUARDIENTE consume?**

#### ZHUMIR

- |                 |            |             |
|-----------------|------------|-------------|
| Aguardiente ( ) | Coco ( )   | Durazno ( ) |
| Limón ( )       | Mango ( )  | Manzana ( ) |
| Maracuyá ( )    | Sandía ( ) | Seco ( )    |

#### CRISTAL

- |             |          |           |
|-------------|----------|-----------|
| Durazno ( ) | Seco ( ) | Suave ( ) |
|-------------|----------|-----------|



**RIUNNITE**

Manzana	( )	Lambrusco	( )
Durazno	( )	Rosado	( )
Frambruesa	( )	Blanco	( )

**ANTHONY'S**

Durazno	( )	Fresa	( )
Manzana	( )	Tropical Fruit	( )

**BOONES**

Mango	( )	Durazno	( )
Tropical Fresa	( )	Manzana	( )
Daiquiri	( )		

**SANTA LUCIA**

Blanco	( )	Tinto	( )
--------	-----	-------	-----

**CLOS**

Blanco	( )	Tinto	( )
--------	-----	-------	-----

**OTROS** ( ) **Especifique:** .....

**5. ¿Cuál de estas marcas y tipos de VODKA consume?**

**ABSOLUT VODKA**

Absolut Vodka	(    )	Citron	(    )
Raspberri	(    )	Vainilia	(    )

**SMIRNOFF**

Manzana Verde	(    )	Smirnoff Vodka	(    )
Cranberry	(    )		

**SKYY**

Berry	(    )	Skyy Vodka	(    )
Melon	(    )		

**FINLANDIA**

Cranberry	(    )	Mango	(    )
Limon	(    )	Finlandia Vodka	(    )

**RUSSKAYA**

Naranja	(    )	Citron	(    )
Manzana	(    )	Russkaya Vodka	(    )
Cranberry	(    )		

**OTROS**                    (    )                    **Especifique:** .....

**6. ¿Cuál de estas marcas y tipos de WHISKY consume?**

GRANT'S ( ) CLAN MAC GREGOR ( )

CATTO'S ( ) CHIVAS REGAL ( )

JOHNNIE WALKER Rojo ( ) Negro ( )

**OTROS** ( ) **Especifique:** .....

**7. Comentarios y recomendaciones**

.....  
.....  
.....  
.....

**GRACIAS POR SU COLABORACIÓN**

Recuerde que con su colaboración ha contribuido con la culminación de nuestra investigación