



Universidad de Sevilla
Facultad de Química
Departamento de Química Analítica

Tesis Doctoral

Caracterización analítica de destilados de
Agave tequilana **mediante**
técnicas de análisis multivariante

Silvia Guillermina Ceballos Magaña

Septiembre 2007

D. Alfonso Guiraúm Pérez, Catedrático Director del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Sevilla.

CERTIFICA: Que el presente trabajo de investigación ha sido realizado en los laboratorios del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Sevilla y del Departamento de Química Analítica de la Universidad Complutense de Madrid, y reúne las condiciones exigidas a los trabajos de tesis doctoral.

Y para que conste, expido y firmo el presente certificado en Sevilla
2 de junio de 2007.

Fdo. Dr. D. Alfonso Guiraúm Pérez

DIRECTORES

Fdo.: D. Fernando de Pablos Pons
Profesor Titular del Departamento
de Química Analítica de la
Universidad de Sevilla

Fdo.: Dña. M^a Jesús Martín Valero
Profesor Titular del Departamento
de Química Analítica de la
Universidad de Sevilla

Memoria presentada para aspirar al grado de Doctor en Estudios
Avanzados en Química.

Fdo. Silvia Guillermina Ceballos Magaña
Ldo. Ciencias especialidad en Química

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a:

Los doctores D. Fernando de Pablos Pons y Dña. María Jesús Martín Valero por confiar en mí desde el principio y haberme aceptado para realizar la tesis doctoral bajo su tutela. Y sobre todo, por su entera dedicación y ayuda en la obtención y discusión de los resultados, así como en la elaboración del presente manuscrito.

El Dr. D. Alfonso Guiraúm Pérez, Director del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Sevilla, por haberme dado la oportunidad de realizar la tesis en este departamento.

El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) del Gobierno de México y a la Fundación Carolina, por la beca otorgada.

El Dr. D. Roberto Izquierdo Hornillos por darme la oportunidad de realizar parte del trabajo experimental en su laboratorio, así como a Dra. Dña. Raquel Gonzalo Lumbreras por su amistad y ayuda durante dicha estancia.

Roberto por su apoyo incondicional durante este periodo.

Mi familia, especialmente a mis padres Silvia y Raúl por creer en todos mis proyectos ayudándome a conseguirlos y a mi hermano Raúl.

Ángela y Marcos porque desde que llegue han estado conmigo, por sus consejos y sobre todo por su gran amistad.

Carmen y Manolo González por hacerme parte de su familia y porque sin su interés no estaría aquí.

A mis compañeros de Departamento de Química Analítica por las enseñanzas y tiempo compartido. Así como al personal administrativo y de servicios del departamento por facilitarme el trabajo.

A Roberto,
mis padres y hermano.

ÍNDICE

ABREVIATURAS

OBJETIVOS

I. INTRODUCCIÓN	1
I.1 <i>Agave tequilana</i> Weber	4
I.2 Tequila	9
I.2.1 Zonas geográficas de cultivo	11
I.2.2 Elaboración de tequila	13
I.2.3 Tipos y categorías	19
I.3 Mezcal	21
I.4 Especificaciones fisicoquímicas y composición química del tequila	25
I.5 Composición química de bebidas alcohólicas	33
I.5.1 Determinación de metales en bebidas alcohólicas	36
I.5.2 Determinación de componentes orgánicos en bebidas alcohólicas	38
I.5.2.1 Cromatografía de gases	38
I.5.2.2 Cromatografía líquida	45
I.5.2.3 Otras técnicas	48
I.6 Aplicación del análisis multivariante para la clasificación de bebidas	50
II. MÉTODOS DE RECONOCIMIENTO DE PATRONES	57
II.1 Conceptos básicos en el reconocimiento de patrones	61
II.1.1 Espacio de modelos	61
II.1.2 Distancias en el espacio patrón	62
II.1.3. Preprocesado de los datos	63

II.1.4 Criterios de ponderación y selección de variables	64
II.2 Métodos de visualización de datos	67
II.2.1. Análisis en componentes principales	67
II.2.2. Biplots	72
II. 3 Reconocimiento de patrones no supervisado	73
II.3.1. Análisis cluster	73
II.4 Reconocimiento de patrones supervisado	76
II.4.1 Métodos paramétricos	81
II.4.1.1 Análisis discriminante lineal	83
II.4.1.2 Modelado suave de análisis independiente por analogía de clases	90
II.4.2 Métodos no paramétricos	91
II.4.2.1 Método de los K vecinos más próximos	91
II.5 Redes neuronales artificiales	93
II.5.1 Neuronas y redes	94
II.5.2. Aprendizaje no supervisado	98
II.5.3 Aprendizaje supervisado	99
II.5.3.1. Aprendizaje por retropropagación	100
II.5.3.2 Perceptrones multicapa	103
II.5.3.3 Sobreentrenamiento	107
II.5.3.4 Algoritmos neuronales probabilísticos y estimación bayesiana	111
III. PARTE EXPERIMENTAL	119
III. 1 Materiales y reactivos	119
III.1.1 Aparatos y equipos	119
III.1.2 Reactivos y disoluciones	120
III.1.2.1 Reactivos	120
III.1.2.2 Disoluciones	122
III.1.3 Muestras	123

III.2 Procedimientos	127
III.2.1 Determinación de Na, K, Ca, S, Mg, Mn, Cu, Ba, Fe, Zn, Al y Sr por ICP-OES	127
III.2.2 Determinación de n-propanol, acetato de etilo, 2-metil-propanol, 3-metil-butanol, 2-metil-butanol mediante HS-SPME-GC-MS	130
III.2.2.1 Microextracción en fase sólida	130
III.2.2.2 Determinación cromatográfica	131
III.2.3 Determinación de furfural y 5-hidroximetilfurfural mediante HPLC	132
III.2.4 Determinación de extracto seco y ceniza	133
III.2.5 Determinación de azúcares reductores directos y totales	134
III.2.5.1 Estandarización de las disoluciones de Fehling	134
III.2.5.2 Determinación de azúcares reductores directos	135
III.2.5.3 Determinación de azúcares reductores totales	135
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	139
IV.1 Determinación de Na, K, Ca, S, Mg, Mn, Cu, Ba, Fe, Zn, Al y Sr por ICP-OES	139
IV.1.1 Optimización del método de mineralización de las muestras	139
IV.1.2 Parámetros de calidad del método	165
IV.1.3 Contenido metálico de tequila y mezcal	171
IV.1.4 Diferenciación de tequilas y mezcal según su perfil metálico	181
IV.1.4.1 Análisis en componentes principales	181
IV.1.4.2 Análisis discriminante lineal	182
IV.1.4.3 Algoritmos neuronales artificiales	185
IV.2 Determinación de compuestos volátiles mediante HS-SPME- GC-MS	188

IV.2.1 Optimización del procedimiento de microextracción en fase sólida	188
IV.2.2 Optimización de las condiciones de GC-MS	190
IV.2.3 Efecto matriz	196
IV.2.4 Validación del método	197
IV.2.5 Determinación de n-propanol, acetato de etilo, 2-metil-propanol, 3-metil-butanol y 2-metil-butanol en muestras de tequila y mezcal	202
IV.2.6 Identificación de otros compuestos volátiles y semivolátiles	213
IV.2.7 Diferenciación de tequilas y mezcal según su perfil volátil	227
IV.2.7.1 Análisis en componentes principales	227
IV.2.7.2 Análisis discriminante lineal	228
IV.2.7.3 Algoritmos neuronales artificiales	231
IV.3 Determinación de furfural y 5-hidroximetilfurfural mediante HPLC	234
IV.3.1 Contenido de 5-hidroximetilfurfural y furfural en muestras de tequila y mezcal	238
IV.4 Determinación de extracto seco y ceniza	243
IV.4.1 Contenido de extracto seco y cenizas en muestras de tequila y mezcal	243
IV.5 Determinación de azúcares reductores directos y totales	246
IV.5.1 Contenido de azúcares reductores en muestras de tequila y mezcal	246
IV.6 Diferenciación de tequila y mezcal según su perfil orgánico	247
IV.6.1 Análisis en componentes principales	247
IV.6.2 Análisis discriminante lineal	248

IV.6.3 Modelado suave de análisis independiente por analogía de clases	251
IV.6.4 Algoritmos neuronales artificiales	252

V. RESUMEN Y CONCLUSIONES	259
----------------------------------	-----

VI. BIBLIOGRAFÍA	265
-------------------------	-----

APÉNDICE I. CONCENTRACIONES DE METALES EN TEQUILA Y MEZCAL

APÉNDICE II. CONCENTRACIONES DE COMPUESTOS VOLÁTILES EN TEQUILA Y MEZCAL

APÉNDICE III. CONCENTRACIONES DE FURFURAL Y 5-HIDROXIMETILFURFURAL EN TEQUILA Y MEZCAL

APÉNDICE IV. CONCENTRACIONES DE EXTRACTO SECO Y CENIZA EN TEQUILA Y MEZCAL

ABREVIATURAS

- AAS. Espectroscopía de absorción atómica (Atomic Absorption Spectroscopy)
- ANN. Redes neuronales artificiales (Artificial Neural Networks)
- ASV. Voltamperometría de redisolución anódica (Anodic Stripping Voltametry)
- BA. Análisis bayesiano (Bayesian Analysis)
- CA. Análisis cluster (Cluster Analysis)
- CAR/PDMS. Carboxeno / polidimetilsiloxano (Carboxen / polydimethylsiloxane)
- GC. Cromatografía de gases (Gas Chromatography)
- DF. Funciones discriminantes (Discriminant Functions)
- ECD. Detector de captura electrónica (Electron Capture Detector)
- ESI-MS. Espectroscopía de masas con ionización por electroespray (Electrospray Ionization Mass Spectrometry)
- FAAS. Espectroscopía de absorción atómica de llama (Flame Atomic Absorption Spectrometry)
- FID. Detector de ionización de llama (Flame Ionization Detector)
- FTIR. Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (Fourier Transform Infrared spectroscopy)
- GC-FID. Cromatografía de gases con detector de ionización de llama (Gas Chromatography Flame Ionization Detector)
- GC-MS. Cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas (Gas Chromatography Mass Spectrometry)
- GFAAS. Espectroscopía de absorción atómica con cámara de grafito (Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry)
- HPAEC. Cromatografía líquida de intercambio aniónico (High Performance Anion Exchange Chromatography)

HPAEC-CD. Cromatografía líquida de intercambio aniónico con detector conductimétrico (High Performance Anion Exchange Chromatography Conductivity Detector)

HPLC. Cromatografía líquida de alta resolución (High Performance Liquid Chromatography)

HPLC-F. Cromatografía líquida de alta resolución con detector de fluorescencia (High Performance Liquid Chromatography Fluorescence Detector)

HPLC-UV. Cromatografía líquida de alta resolución con detector ultravioleta visible (High Performance Liquid Chromatography Ultraviolet Visible)

HRGC-C/P-IRMS. Cromatografía de gases acoplado con detector de espectrometría de masas de relación isotópica, en el modo de combustión y pirólisis (Gas chromatography Isotope Ratio Mass Spectrometry in the Combustión and Pyrolysis modes)

HS. Espacio de cabeza (Head Space)

HS-GC-MS. Cromatografía de gases por espacio de cabeza con detector de espectrometría de masas (Head Space - Gas Chromatography - Mass Spectrometry)

HS-SPME. Microextracción en fase sólida por espacio de cabeza (Head Space Solid Phase Microextraction)

HS-SPME-GC-MS. Microextracción en fase sólida por espacio de cabeza cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas (Head Space Solid Phase Microextraction Gas Chromatography Mass Spectrometry)

HS-SPME-GC-MS-MS. Microextracción en fase sólida por espacio de cabeza cromatografía de gases con dos detectores de espectrometría de masas (Head Space - Solid Phase Microextraction - Gas Chromatography - Mass Spectrometry - Mass Spectrometry)

ICP-OES. Espectroscopía de emisión atómica de plasma inducido acoplado (Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy)

ICP-MS. Espectroscopía de emisión atómica de plasma inducido acoplado con espectrometría de masas (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry)

IE. Impacto electrónico (Electronic Impact)

KNN. K-vecinos más próximos (K-Nearest Neighbours)

LDA. Análisis discriminante lineal (Linear Discriminant Analysis)

MLP. Red perceptrón multicapa (Multilayer Perceptron)

MS. Espectrometría de masas (Mass Spectrometry)

NIPALS. Mínimos cuadrados iterativos no lineales (Nonlinear Iterative Partial Least Squares)

NIR. Espectrometría de infrarrojo cercano (Near Infrared Spectrometry)

NOM. Norma Oficial Mexicana

PCA. Análisis en componentes principales (Principal Component Analysis)

PDA. Análisis discriminante procrustes (Procrustes Discriminant Analysis)

PDF. Función de densidad de probabilidad (Probability Density Function)

PLS. Mínimos cuadrados parciales (Partial Least Squares)

PLS-DA. Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (Partial Least Squares Discriminat Analysis)

PNN. Redes neuronales probabilísticas (Probabilista Neural Network)

PRESS. Error residual predicho de suma de cuadrados (Predicted Residual Error Sum of Squares)

PRIMA. Reconocimiento de patrones por análisis independiente multivariante (Pattern Recognition by Independent Multicategory Analysis)

PRM. Métodos de reconocimiento de patrones (Pattern Recognition Methods)

QDA. Análisis discriminante cuadrático (Quadratic Discriminant Analysis)

PR. Reconocimiento de patrones (Pattern Recognition)

SBSE. Extracción por barra adsorptiva (Stirbar Sorptive Extraction)

SCD. Detector de quimioluminiscencia de azufre (Sulfur Chemiluminescence Detector)

SIMCA. Modelado suave de análisis independiente por analogía de clases (Soft Independent Modeling of Class Analogy)

SNIF-NMR. Resonancia magnética nuclear con fraccionamiento isotópico específico natural (Site-specific Natural Isotopic Fractionation Studied by Nuclear Magnetic Resonance)

SPE. Extracción en fase sólida (Solid Phase Extraction)

SPME. Microextracción en fase sólida (Solid Phase Microextraction)

SPME-GC-FID. Microextracción en fase sólida cromatografía de gases con detector de ionización de llama (Solid Phase Microextraction Gas Chromatography Flame Ionization Detector)

TXRF. Fluorescencia de reflexión total de rayos X (Total Reflection X-ray Fluorescence)

UNEQ. Varianzas de clases desiguales (Unequal Class Variances)

UV-V. Espectroscopía ultravioleta visible (Ultraviolet Visible Spectroscopy)

OBJETIVOS

Con el presente trabajo se han pretendido cubrir diversos objetivos. En primer lugar realizar un estudio sobre la capacidad de los componentes químicos del tequila para su uso como parámetros diferenciadores de tipos de tequila. Debido a la falta de datos en la bibliografía sobre el análisis de metales en destilados de *Agave tequilana* Weber, uno de los objetivos de este trabajo de investigación es proponer un método para la mineralización y posterior determinación de metales en estas bebidas. Se considerarán métodos de digestión de las muestras para la determinación por ICP-OES.

Otro objetivo es el estudio y puesta a punto de métodos de análisis que permitan llevar a cabo la determinación de alcoholes superiores y otros compuestos volátiles en tequila. Se consideró el uso de la cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas. Para la extracción de estos compuestos se empleará la microextracción en fase sólida.

También se estudian otras variables incluidas en la norma oficial mexicana que incluye las especificaciones del tequila, como furfural, azúcares reductores libres y directos, extracto seco y ceniza.

Los datos de concentración obtenidos para cada uno de los compuestos antes mencionados se usarán como descriptores químicos con el fin de establecer una clasificación de los distintos tipos de destilados de *Agave tequilana*. Para ello se emplearán técnicas de reconocimiento de patrones, como análisis en componentes principales, modelado suave de análisis independiente por analogía de clases, análisis discriminante lineal, análisis cluster y redes neuronales artificiales.

I. INTRODUCCIÓN

En México existen una gran variedad de bebidas alcohólicas hechas a partir de la fermentación y destilación del agave. Dicha planta crece en todo el territorio mexicano existiendo diferentes variedades dependiendo de la región donde se cultiva. De este tipo de bebidas las más consumidas son el tequila y el mezcal.

Según la tradición el origen del tequila se remonta a más de 10.000 años. Los pueblos recolectores-cazadores empezaron a cocer los quites y cabezas de los agaves en hornos, para preparar el mexcalli, que utilizaban como alimento (figura 1). Posteriormente, llevaron a cabo una fermentación y la bebida resultante fue muy consumida en el occidente de México. Sin embargo, en el Altiplano Central se desarrolló más la cultura del aguamiel y el pulque [1]. Existen varias versiones para el origen de la destilación del mezcal. La primera sostiene que el origen es prehispánico mientras que la otra afirma que fue una técnica traída por los españoles. Existe otra tercera que dice que fue introducida por los filipinos que llegaron a Colima en la Nao de China, y que producían tuba, destilado de coco.



Figura1. Dibujo de indígenas recolectando agaves

Según el Consejo Regulador del Tequila [2], las bebidas elaboradas en México a partir de algún tipo de los diferentes agaves

reciben el nombre genérico de mezcal y toman el apellido de la población donde se cultivan. De esta manera tenemos el mezcal de Oaxaca, el de Cotija, el de Tonaya, etc. Pero el mas famoso de todos es el mezcal de Tequila, cuyo apelativo se debe a la antigua población que se encuentra en el estado de Jalisco. El primer permiso para su elaboración fue concedido por el virrey, quien otorgó en 1785 un permiso al señor José Cuervo para que comercializara el tequila. Cien años después también se concedieron permisos a los señores Sauza y Herradura, iniciando así el despliegue de la industria tequilera en México. En 1821, con la consumación de la independencia los licores españoles empezaron a tener dificultades para llegar a México, lo cual dio oportunidad a los fabricantes de tequila de incrementar las ventas de este destilado a más estados del país [1]. A partir de 1950 la producción de tequila aumentó considerablemente y se mejoraron las técnicas de elaboración. Por otra parte se descubrió que la región de cultivo del agave azul podría extenderse a otras regiones sin perjuicio del producto.

En la actualidad, la Norma Oficial Mexicana (NOM) [3] referente a Bebidas Alcohólicas-Tequila-Especificaciones publicada en el Diario Oficial de la Federación por la Secretaría de Comercio y Fomento Industrial regula la zona de producción y tipo de agave utilizado para la fabricación de tequila, así como el proceso de producción y almacenaje. El Tequila esta protegido bajo el acuerdo entre la Comunidad Europea y los Estados Unidos Mexicanos donde se reconocen mutuamente y se protege las denominaciones en el sector de las bebidas espirituosas [4]. Las adulteraciones con otros tipos de alcohol o la mezcla de diferentes tipos de tequila son una violación a la NOM.

En los últimos años la demanda de tequila ha aumentado no sólo en México, sino también en otros países. De acuerdo con los datos

proporcionados por el Consejo Regulador del Tequila [2] presentados en la tabla 1, se puede observar que la producción actual es superior al doble de la que había hace 10 años. Prácticamente, la mitad de la producción, más de 100 millones de litros, se destina a la exportación. Según el boletín del Consejo Regulador del Tequila publicado en julio del 2006, las exportaciones de tequila se incrementaron un 17% en tequila mixto y un 47% en tequila 100% agave. Las principales exportaciones son a Estados Unidos, aunque se exporta a más de 100 países en todo el mundo.

Tabla 1. Producción de tequila y exportaciones del periodo comprendido entre 1995-2006.

Año	Millones de litros	
	Producidos	Exportados
1995	85,7	56,6
1996	109,2	65
1997	129,2	73,6
1998	138,5	73,2
1999	159	82
2000	152,2	83
2001	120,2	63,7
2002	118,7	76,7
2003	113,9	88,1
2004	146,7	90,8
2005	177,4	101
2006	205	102

I.1 *Agave tequilana* Weber

Agave es el nombre científico que le dio al maguey el naturalista sueco Carlos de Linneo a mediados del siglo XVIII a partir del vocablo grecolatino agavus. La familia de las agavaceas incluye 20 géneros y cerca de 300 especies, de las cuales alrededor de 200 se encuentran en México [5]. Taxonómicamente el *Agave tequilana* Weber se clasifica como un miembro de la familia de las *Agavaceas*, del género *Agave* y especie *tequilana*. Existen diferentes variedades de *Agave tequilana*: azul, azul listado, sigüín, moraleño, chato, bermejo, manso, pata de mula, hoja delgada. Las diferencias entre variedades de planta son mínimas. Gil et al. [6] describen sus características. En la tabla 2 se incluyen algunas de ellas.

Los Agaves han sido cultivados en la altiplanicie centro oeste de México desde hace al menos 400 años [7]. El botánico Franz Weber, a quien debe su nombre, a principios de 1900 estudió las diferentes variedades de agave. Comprobó que el *Agave tequilana* Weber variedad azul (figura 2) era la más abundante, siendo el preferido para la producción de tequila debido a su, relativamente, corto ciclo de vida y la capacidad de acumular inulina [6, 8, 9]. La planta de *Agave tequilana* debe ser cortada para la producción de tequila entre los 6 y 12 años. La NOM establece que se pueden utilizar otras fuentes de azúcares, sin embargo no debe ser mayor al 49%; en este sentido la fuente alternativa más usada es la caña de azúcar.

Tabla 2. Características de las diferentes variedades de *Agave tequilana* Weber

Variedad de <i>Agave tequilana</i>	Descripción
Azul	Color azul intenso y mejores cualidades industriales
Sigüín	Hojas azul verdes, precoces, menos hojas que la variedad azul
Azul listado	Similar al azul, con una raya amarilla a lo largo del borde o en el medio de las hojas
Manso	Color azul sin espinas en los bordes de las hojas
Chato	Hojas verde-amarillento pálido, gruesas, cortas y fibras resistentes
Hoja delgada	Hojas verde oscuro, pocas y más delgadas que la variedad azul
Pata de mula	Hojas verde oscuro, pequeñas y lineales y cabeza redonda
Bermejo	Hojas verde-azules, vástago alto, pesado y rojizo.
Moraleño	Hojas verde azules amarillentas, y en mayor cantidad que la variedad azul.



Figura 2. Planta de *Agave tequilana* Weber variedad azul.

Debido a sus adaptaciones únicas al medio ambiente, y a que se recolecta cada 6-12 años, los cultivos de *Agave tequilana* no agotan los niveles de nutrientes del suelo dedicado a la agricultura comercial. La productividad está asociada a los niveles de nitrógeno, fósforo, potasio y boro [10] que hay en el suelo, que se pueden mantener fácilmente.

Los agaves pueden crecer en las regiones donde otros cultivos tradicionales anuales no pueden hacerlo. Debido a su sistema de raíces bajo y morfología suculenta soportan las condiciones ambientales extremas [10]. Por otro lado, el metabolismo de la planta permite conservar el agua, contribuyendo así al éxito de los cultivos de *Agave tequilana* Weber variedad azul para la producción de tequila [11-13]. López et al. [14] demostraron que el principal producto fotosintético de este metabolismo en plantas de agave son los fructanos. Estos azúcares consisten en una compleja mezcla de fructooligosacáridos. Los fructanos del *Agave tequilana* Weber variedad azul no son un tipo de inulina como

se creía anteriormente. La molécula está compuesta por tres tipos de bases distintas: inulina, levano y neoinulina, cuya estructura se muestra en la figura 3.

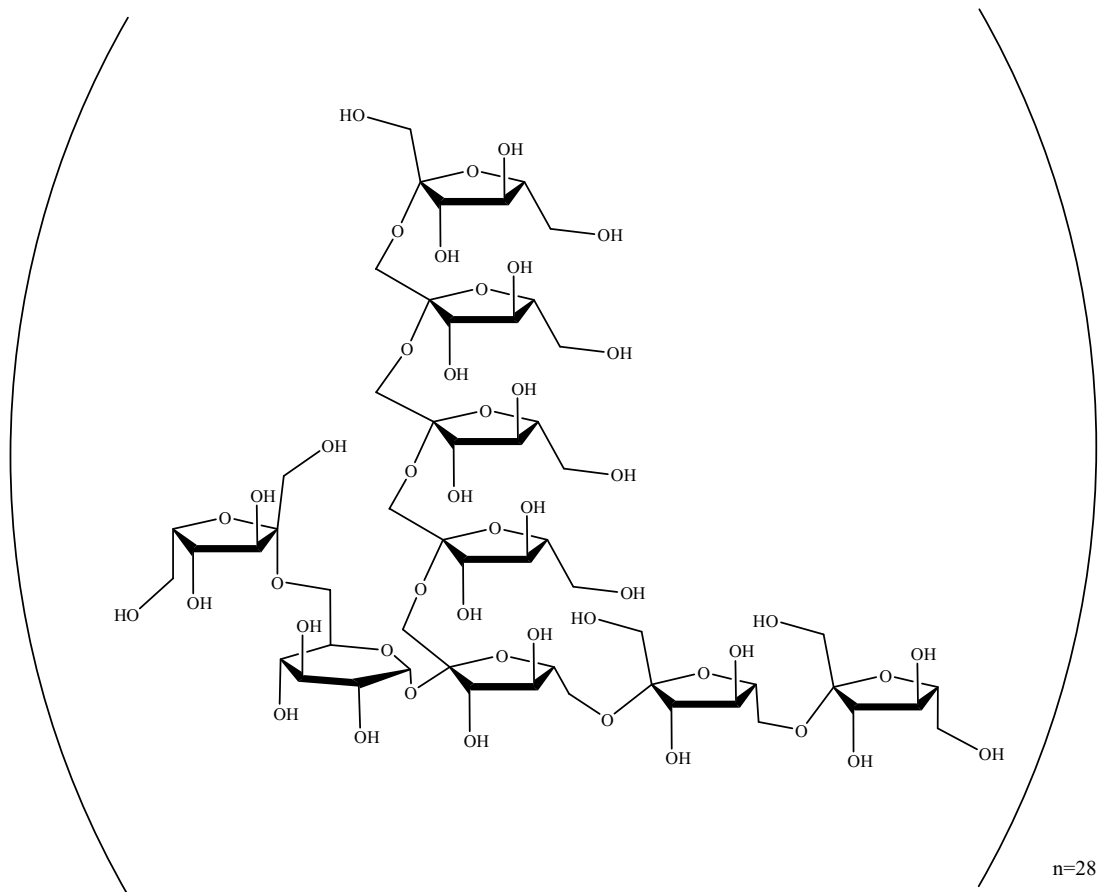


Figura 3. Estructura de fructano presente en *Agave tequilana* Weber.

Peña et al. [5] ha estudiado la fracción lipídica de la planta de *Agave tequilana* detectando la presencia de diversos ésteres etílicos de ácidos grasos como laúrico, mirístico, pentadecílico, palmítico, palmitoleico, margárico, esteárico, oleico, linoleico y linolénico. También identificaron 32 terpenos, entre los que se encuentran el α -felandreno, α -terpineno, p -cimeno, limoneno, β -*trans*-ocimeno, β -*cis*-ocimeno,

sabineno, linalol, 2,4,6-octatrieno, 4-terpineol, α -terpineol, nerol, formiato de bornilo, geraniol, α -cubebeno, copaeno, antrastrepteno, bergamoteno, β -farneseno, germacreno, α -curcumeno, α -muroleno, α -bisaboleno, cadineno, α -pirovetiveno, cedrol, *trans*-nerolidol, cardeleno, cadinol, alcohol patchuli, y α -bisabolol. En la figura 4 se presentan las estructuras de algunos de los terpenos más abundantes en la planta de *Agave tequilana*.

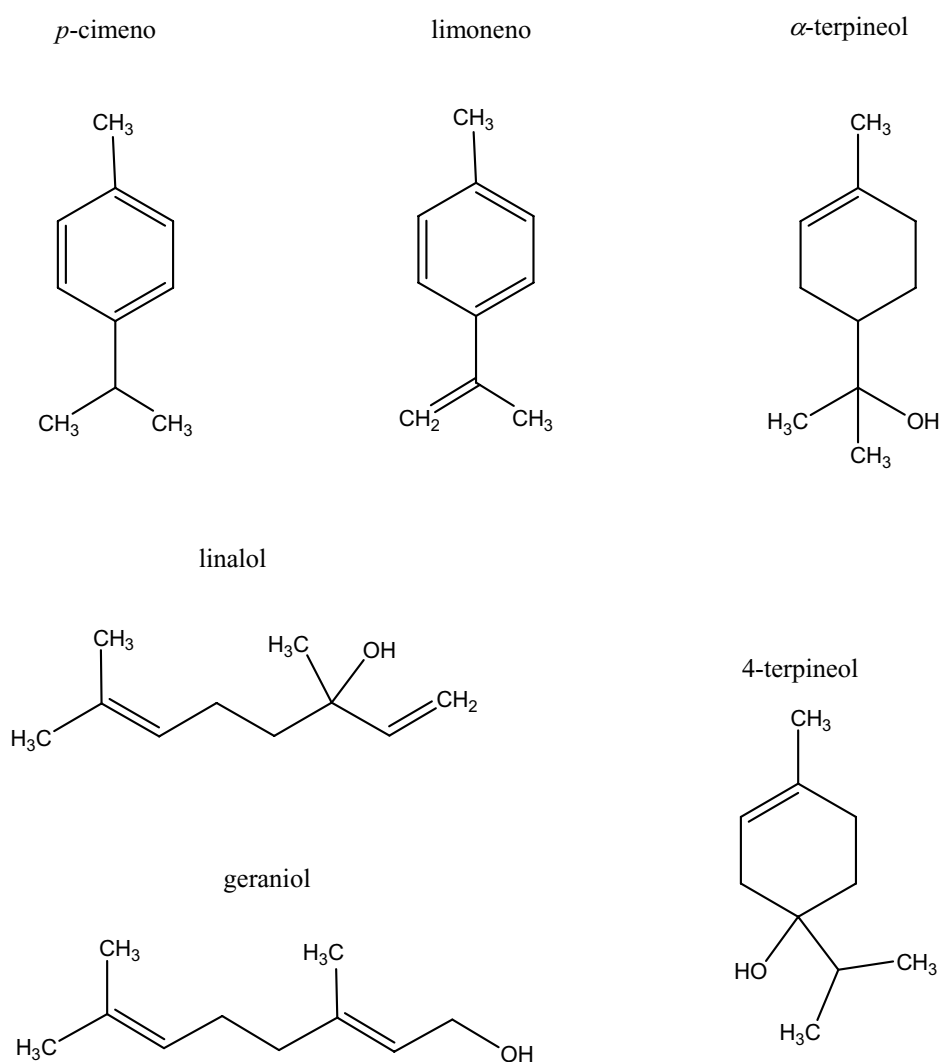


Figura 4. Estructura de terpenos encontrados en el *Agave tequilana* Weber

I.2 Tequila

Según la NOM [3] el tequila se define como “Una bebida alcohólica regional obtenida por destilación de mostos, preparados directa y originalmente del material extraído, en las instalaciones de las fábricas de un productor autorizado la cual debe estar ubicada en el territorio comprendido en la declaración, derivados de las cabezas de *Agave tequilana Weber variedad azul*, previa o posteriormente hidrolizadas o cocidas, sometidos a fermentación alcohólica con levaduras, cultivadas o no, siendo susceptibles los mostos de ser enriquecidos y mezclados conjuntamente en la formulación con otros azúcares hasta en una proporción no mayor de 49% de azúcares reductores totales expresados en unidades de masa, en los términos establecidos por esta norma y en la inteligencia de que no están permitidas las mezclas en frío. El tequila es un líquido que, de acuerdo a su clase, es incoloro o coloreado cuando es madurado o cuando es abocado sin madurarlo. El tequila puede ser añadido de edulcorantes, colorantes, aromatizantes y/o saborizantes permitidos por la Secretaría de Salud, con objeto de proporcionar o intensificar su color, aroma y/o sabor”. En la figura 5 se muestran diferentes tipos y productos de una marca elaboradora de tequilas.



Figura 5. Tipos de tequila

La NOM se aplica a todos los procesos y actividades relacionadas con el abastecimiento de agave, producción, envasado, comercialización, información y prácticas comerciales vinculadas a la bebida alcohólica destilada. También especifica el tipo de agave usado para la elaboración del tequila y dónde debe cultivarse. Se definen los tipos y categorías dependiendo del tratamiento que se le da durante y después de la producción. Así mismo, indica cuáles deben ser las especificaciones fisicoquímicas de la bebida y el método de análisis que se debe utilizar para determinar cada uno de los parámetros incluidos en el control de calidad. Existe un Consejo Regulador del Tequila, que se encarga de todo lo referente a la calidad de esta bebida. Tiene como objetivos asegurar la verificación, el cumplimiento de la NOM del tequila, garantizar la autenticidad del producto y salvaguardar la denominación de origen en México y en el extranjero [2].

I.2.1 Zonas geográficas de cultivo

La producción de tequila está restringida por la ley no sólo a una planta específica, sino también a una región geográfica donde la planta debe crecer, para que no se alteren las características del tequila. En la declaración de la denominación de origen del tequila [3] se reconocen las siguientes zonas geográficas de México (figura 6) en las cuales se debe cultivar la planta de *Agave tequilana* para su producción:

- ❖ Estado de Jalisco, todos los municipios.
- ❖ Estado de Guanajuato, los municipios: Abasolo, Manuel doblado, Cuerámara, Huanímaro, Pénjamo y Purísima del Rincón.
- ❖ Estado de Michoacán, los municipios: Briseñas de Matamoros, Cabinda, Chilchota, Churintzio, Cotija, Ecuandureo, Jacona, Jiquilpan, Maravatío, Marcos Castellanos, Nuevo Parangaricutiro, Numarán, Pajacuarán, Peribán, La Piedad, Régules, Los Reyes, Sahuayo, Tánctitaro, Tangamandapio, Tangancícuaro, Tanhuato, Tinguindín, Tocumbo, Venustiano Carranza, Villa Mar, Vista Hermosa, Yurécuaro, Zamora y Zináparo.
- ❖ Estado de Nayarit, los municipios: Ahuacatlán, Amatlán de Cañas, Ixtlán del Río, Jala, Jalisco, San Pedro de Lagunillas, Santa María del Oro y Tepic.
- ❖ Estado de Tamaulipas, los municipios: Aldana, Altamira, Antiguo Morelos, Gómez Farías, González, Llera, Mante, Nuevo Morelos, Ocampo, Tula y Xicotencatl.



Figura 6. Estados mexicanos productores de *Agave tequilana*

I.2.2 Elaboración de tequila

La elaboración de tequila parte del cultivo de agave en el territorio de denominación de origen. La primera tarea es la selección de hijuelos de la especie *Agave tequilana* *Weber variedad azul*, para ser plantados únicamente en el territorio de denominación, zona protegida por la Declaración General de Protección a la denominación de origen. Estos hijuelos deben estar libres de enfermedades y con una altura aproximada de 50 cm. El resto de las plantas son utilizadas para la elaboración del tequila. La recolección se lleva a cabo cuando la planta alcanza su plena madurez, es decir, cuando es capaz aportar las mejores mieles, y está lista para la jima. La jima (figura 7) consiste en cortar las hojas de la planta al ras de la base de manera manual, para dejar únicamente la cabeza o corazón de agave, que es la materia prima para la elaboración de la bebida.



Figura 7. Jima de *Agave tequilana*

Una vez que se corta del agave el corazón leñoso o piña se lleva a la fábrica, donde sigue un proceso de elaboración, que se puede dividir en los siguientes pasos [2, 3]:

a) Cocción: las piñas se parten y se introducen en un horno. El proceso de cocción dura alrededor de 48 horas y durante este tiempo se

le inyecta vapor de agua al horno. Se usan hornos de mampostería o autoclaves. La cocción permite la descomposición de los azúcares y de esta manera el mosto (jugo del agave) queda listo para la fermentación.

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

c) Fermentación: el mosto se inocula con levadura (*Saccharomyces cerevisiae*), comenzando la fermentación para producir el alcohol y otros componentes característicos del tequila. La temperatura se mantiene entre 30 °C y 45 °C durante un periodo de 12 a 72 horas.

d) Destilación: Se llevan a cabo dos destilaciones consecutivas del mosto. Generalmente se utilizan alambiques (cobre, acero inoxidable o acero inoxidable con refrigerante de cobre), y aunque es menos común, destilación en columnas. En la primera destilación, se obtiene tres productos: las cabezas, que generalmente se reciclan con el fermentado para ser redestilado; la cola, llamada vinaza que se elimina del proceso y el *ordinario* (cuyo contenido de etanol está entre el 20-30% (v/v) de alcohol). Posteriormente el *ordinario* se pasa a otro alambique para llevar a cabo la segunda destilación. En este paso se obtienen también tres productos: la cabeza, que se elimina, la cola, que puede ser reciclada y el destilado, que es el producto final de la destilación, cuyo contenido en etanol es de alrededor del 55 % (v/v). Después se diluye con agua hasta, aproximadamente, un 38% de alcohol. Una vez obtenido el producto final se envasa o almacena, y dependiendo de la maduración se le asigna un nombre característico. En la figura 8 se presenta un diagrama del proceso de elaboración.



Figura 8. Diagrama del proceso de elaboración de tequila.

En relación a los procesos químicos que tienen lugar durante las etapas de la elaboración, se han hecho diversos estudios. Mancilla et al. [15] determinaron azúcares, pH, color y algunos de los compuestos que se forman en la reacción de Maillard que tiene lugar durante la cocción de las piñas de agave. Analizaron el jugo a diversos intervalos de tiempo. Debido a la formación de ácidos orgánicos durante la cocción, el pH del jugo disminuye de 4,95 a 4,55. El contenido de azúcares reductores aumenta como consecuencia de la hidrólisis de polisacáridos. El color se intensifica por la generación de compuestos de Maillard, que son el resultado de la reacción entre compuestos aminados, usualmente aminoácidos o proteínas con los azúcares. En esta reacción se forman compuestos importantes para que el flavor del producto final sea característico. Los compuestos de Maillard encontrados durante el proceso de cocción fueron ácidos, alcoholes y furanos, junto con aldehídos, cetonas, compuestos aromáticos, terpenos, piranos y compuestos de nitrógeno y azufre. La concentración de algunos volátiles como 3-hidroxi-2-butanona y 1,2-butenodiol decrecen con el tiempo. Por lo tanto, polioles y cetonas hidroxiladas pueden ser considerados como precursores de compuestos como piridina, furfural, 2-furanmetanol, 5-metil-furfural, metil-2-furoato y 5-hidroximetilfurfural, cuyas concentraciones aumentan conforme transcurre el proceso de cocción. La presencia de compuestos heterocíclicos, es además una evidencia de que la reacción de Maillard tiene lugar durante la cocción de las piñas de agave. También aparecen compuestos importantes para el flavor final del tequila, como terpenos, entre otros.

Pinal et al. [16] estudiaron el proceso de fermentación del tequila. La variedad de levadura, la temperatura (30 – 35 °C) y la relación de concentración carbono-nitrógeno tienen una influencia significativa en la producción de alcoholes superiores. Sin embargo, otros parámetros como

la fuente de nitrógeno y las cantidades de levadura inoculadas tienen poca o nula influencia en la producción de los compuestos responsables de algunas de las propiedades organolépticas del tequila. De acuerdo con el estudio cinético que realizaron, concluyeron que la producción de etanol empieza en las primeras horas del proceso de fermentación. También se encontró que los alcoholes superiores que determinaron, isoamílico e isobutílico, empiezan a formarse cuando los niveles de azúcar han disminuido considerablemente, y continúan produciéndose durante varias horas una vez que la fermentación alcohólica ha finalizado.

Prado et al. [17] han estudiado la influencia del proceso de destilación en la calidad del tequila. Las concentraciones en el producto final de los compuestos que considera la NOM, tales como metanol, etanol, alcoholes superiores (isoamílico, isobutílico y n-propílico), acetato de etilo, acetaldehído y furfural, así como otros compuestos como alcohol fenílico y ácido acético son similares independientemente del tipo de alambique utilizado. En la figura 9 se presenta un cromatograma correspondiente al análisis por cromatografía de gases con los compuestos presentes en el producto final de destilación llevada a cabo en alambique de acero inoxidable. Las concentraciones encontradas para los compuestos considerados por la NOM se encuentran dentro de los rangos permitidos. Cuando la destilación se lleva a cabo en alambiques de Cu, éste le da al destilado mayor flavor, aunque el contenido de cobre excede el máximo permitido para el tequila.

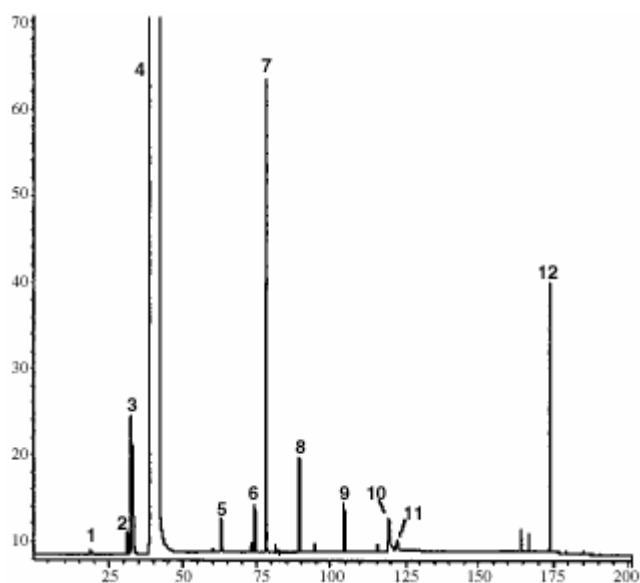


Figura 9. Análisis por GC-FID del producto de destilación. 1:acetaldehído, 2: acetato de etilo, 3: metanol, 4: etanol, 5: propanol, 6: alcohol isobutílico, 7: 2 pentanol (patrón interno), 8: alcohol isoamílico, 9: lactato de etilo, 10: acetato de etilo, 11: furfural, 12: alcohol fenético.

Arrizon et al. [18] han caracterizado las levaduras utilizadas en el proceso de fermentación y sus propiedades. Han realizado un estudio comparativo de las levaduras de diferentes orígenes utilizadas en las industrias del tequila. En su estudio realizaron fermentaciones a concentraciones altas y bajas de azúcares de jugo de *Agave tequilana*. Comprobaron que las diferentes levaduras utilizadas tenían un comportamiento diferente a altas y bajas concentraciones de azúcar. De ello se deduce que es importante utilizar un tipo específico de levadura para el tequila para obtener resultados óptimos.

En otro estudio realizado por Fiore et al. [19] llevaron a cabo varias combinaciones entre especies de agave y variedades de levadura durante el proceso de fermentación. Estudiaron la influencia del SO_2 , la

resistencia al cobre, tolerancia al etanol y actividad enzimática (β -glucosidasa y β -xilosidasa). Todas las especies de agave entre ellas el *Agave tequilana* fueron resistentes a la presencia de SO₂. Para el estudio de la tolerancia a etanol y resistencia al cobre utilizaron jugo de *Agave tequilana*, en el caso del etanol la levadura *Saccharomyces cerevisiae* fue la mas tolerante y la menos resistente a la presencia de cobre.

Gobeille et al. [10] realizaron un estudio de tierras fertilizadas con vinaza, encontrando que la aplicación del efluente de la destilería a las tierras de labranza aumenta los niveles en la tierra de K, P, Mg, Ca y B.

I.2.3 Tipos y categorías

Una vez obtenido el producto final se embotella o almacena para su maduración en barricas de roble o encina. La NOM establece una clasificación de los tequilas atendiendo al proceso de envejecimiento. Según este criterio hay cuatro tipos de tequila:

- Tequila blanco: envasado inmediatamente después de su producción, no se le aplica proceso de maduración.
- Tequila añejo: producto susceptible de ser abocado, sujeto a un proceso de maduración de por lo menos un año en barricas de roble o encina.
- Tequila reposado: producto susceptible de ser abocado, sujeto a un proceso de maduración de por lo menos dos meses en barricas de madera de roble o encina. El resultado de las mezclas de tequila reposado con tequila añejo se considera tequila reposado.

- Tequila joven u oro: producto susceptible de ser abocado. El resultado de las mezclas de tequila blanco con tequilas reposados y/o añejos debe considerarse como tequila joven u oro.

Recientemente se ha definido una nueva categoría llamada tequila extra-añejo, que se obtiene cuando se envejece por lo menos tres años en barricas de roble o encina. Por otra parte, atendiendo al porcentaje de azúcares provenientes del agave, los tequilas se clasifican en dos categorías:

- ❖ “Tequila 100% agave”, es el producto que no es susceptible de ser enriquecido con otros azúcares distintos a los obtenidos del *Agave tequilana Weber variedad azul*. Cultivado en el territorio mencionado en el apartado 1.2.1. Debe ser envasado en la planta que controle el propio productor autorizado, que debe estar ubicada dentro del territorio comprendido por la declaración de denominación de origen.
- ❖ “Tequila”, es el producto tal y como se explica en la definición del tequila según la NOM, en el que los mostos son susceptibles de ser enriquecidos y mezclados conjuntamente en la formulación con otros azúcares hasta una proporción no mayor del 49% de azúcares reductores totales expresados en unidades de masa. No se puede realizar con azúcares provenientes de cualquier especie de agave. Sólo se podrá incrementar el 51% de azúcares reductores totales provenientes de *Agave tequilana Weber variedad azul*. Este producto puede ser envasado en plantas ajenas a un productor autorizado, siempre y cuando los envasadores cumplan con las condiciones establecidas en la norma.

I.3 Mezcal

El mezcal es una bebida mexicana elaborada artesanalmente, que se obtiene a partir de la destilación y rectificación de mostos preparados directamente de los azúcares extraídos de las cabezas maduras del agave. Las cabezas son cocidas y sometidas a fermentación alcohólica con levadura previa a la destilación. En la figura 10 se muestran algunos de los tipos de mezcal.



F

Figura 10. Tipos de mezcal

Es una bebida que cuenta con denominación de origen [20]. Se establece como región geográfica para su cultivo la comprendida por los estados de: Oaxaca, Guerrero, San Luis Potosí, Zacatecas y Durango. Así como los municipios de San Felipe del Estado de Guanajuato y San Carlos, San Nicolás, Burgos, Miquihuana, Bustamante, Palmillas, Jaumave, Tula, Cruillas, Jiménez y Méndez del Estado de Tamaulipas. Los estados se pueden ver en la figura 11.



Figura 11. Estados mexicanos productores de mezcal

Se elabora con agaves de las especies: *Agave angustifolia* Haw, *Agave esperrima jacobi*, *Agave weberi* cela y *Agave salmiana*, los cuales son conocidos coloquialmente como maguey espadín, de cerro, de mezcal y verde, respectivamente (figura 12). A parte de los tipos de agaves mencionados se pueden utilizar otras especies para su elaboración siempre y cuando no sean utilizadas como materia prima de otras bebidas con denominación de origen dentro del mismo estado. El *Agave salmiana*, *Agave augustifolia*, y *Agave potatorum* se suelen utilizar en el sur y el *Agave salmiana* en el altiplano de México [21].



Agave salmiana



Agave angustifolia Haw



Agave potatorum



Agave weberi



Agave esperrima

Figura 12. Variedades de agave utilizadas en la producción de mezcal.

El mezcal es un líquido de olor y sabor de acuerdo con su tipo. Es incoloro o ligeramente amarillento cuando es añejado en recipientes de roble o encina, o cuando se aboque sin necesidad de reposarlo. Se clasifica en tres categorías basándose en el proceso de envejecimiento después de la destilación [20]:

- Mezcal joven: cuando es envasado después de su producción. Puede ser abocado.
- Mezcal reposado: susceptible a ser abocado y es envejecido en barricas de roble o encina al menos dos meses.
- Mezcal añejo: producto sujeto a ser abocado y a maduración de por lo menos un año en recipientes de madera de roble o encina.

Por otro lado, también se diferencian según el porcentaje de azúcares provenientes del agave:

- Mezcal 100% agave, producto en el que los azúcares se obtienen a partir de mostos preparados a partir de los agaves establecidos por la normativa. Puede ser joven, reposado o añejo.
- Mezcal, producto en el que los azúcares de los mostos proceden de agaves permitidos por la normativa, a los que se le han adicionado hasta un 20% de otros azúcares.

I.4 Especificaciones fisicoquímicas y composición química del tequila

La primera normativa data del año 1994 [22] donde se establecen los métodos de ensayo que se le deben realizar a la bebida, los cuales son: azúcares reductores libres y totales, determinación de ceniza, extracto seco, porcentaje de alcohol, determinación de aceites de fusel (excepto n-propanol), metanol, ésteres, aldehídos totales y furfural. Recientemente se ha actualizado la normativa publicada en el año 1994 con una nueva que tiene fecha de 30 de noviembre de 2005, publicada en el Diario Oficial de la Federación el día 6 de enero de 2006 [3].

Los cambios más significativos son en primer lugar añadir un tipo más de tequila. Además, se proponen nuevos métodos de análisis para la determinación de azúcares reductores directos y totales [23], extracto seco y ceniza [24], furfural [25], contenido alcohólico [26], alcoholes superiores, aldehídos, ésteres y metanol [27] cancelando así los métodos anteriores. Según la NOM existen una serie de especificaciones fisicoquímicas que establecen diversos parámetros químicos cuyas concentraciones deben encontrarse dentro de un determinado rango según el tipo de tequila del que se trate. Estos parámetros son: porcentaje de alcohol, contenido de extracto seco, alcoholes superiores, metanol, aldehídos, ésteres y furfural. A continuación, en la tabla 3 se describen los rangos permitidos para cada uno de estos parámetros.

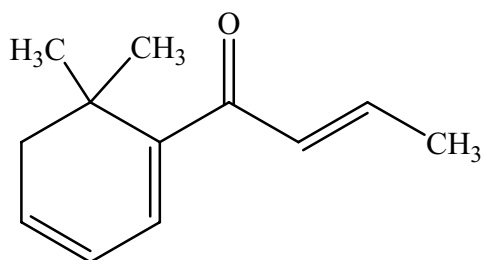
Tabla 3. Especificaciones fisicoquímicas establecidas por la NOM

Parámetros	Blanco	Oro	Reposado	Añejo
Contenido alcohólico a 293 K (%)	35-55	35-55	35-55	35-55
Extracto seco (g/l)	0-0,30	0-5	0-5	0-5
Alcoholes superiores ^a	20-500	20-500	20-500	20-500
Metanol ^a	30-300	30-300	30-300	30-300
Aldehídos ^{a, b}	0-40	0-40	0-40	0-40
Ésteres ^{a, c}	2-200	2-200	2-250	2-250
Furfural ^a	0-4	0-4	0-4	0-4

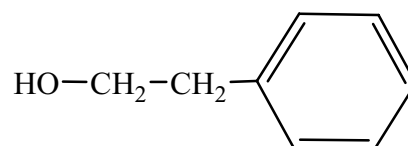
^a Valores expresados en mg/100 ml de alcohol. ^b Expresado como acetaldehído. ^c Expresado como acetato de etilo.

Las bebidas alcohólicas también deben cumplir con las normas establecidas por la Secretaría de Salud [28], la cual especifica las concentraciones máximas de metales permitidas. Cu, Pb, As y Zn no deben superar los 2, 0,5, 0,5 y 1,5 mg/l respectivamente.

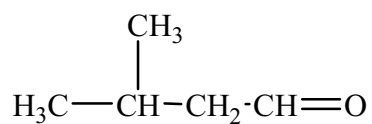
En la bibliografía pueden encontrarse diversos estudios acerca de la composición química del tequila tanto desde el punto de vista cualitativo como cuantitativo. Se han identificado más de 175 componentes en el extracto del tequila, entre los que se encuentran: acetales, ácidos, alcoholes, aldehídos, ésteres, furanos, cetonas, fenoles, pirazinas, compuestos de azufre y terpenos. La tabla 4 muestra una relación de los compuestos encontrados. De entre todos estos componentes, destacan los principales responsables del flavor de la bebida que son: isovaleraldehído, alcohol isoamílico, β -damascenona, 2-fenil-etanol y vainillina [29], cuya estructura química se detalla en la figura 13.

β -damascenona

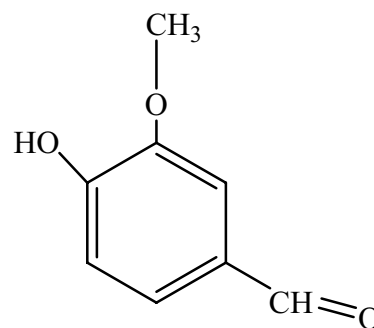
2-fenil etanol



Isovaleraldehído



Vainillina



Alcohol isoamílico

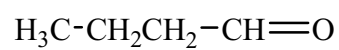


Figura 13. Estructuras de componentes responsables del flavor del tequila.

Tabla 4. Componentes encontrados en el extracto del tequila.

Componente	Nivel relativo (%)
Acetales	
Dietil acetaldehído	2,86
Dietil isobutiraldehído	0,07
Etil isobutil acetaldehído	0,03
Dietil 2-metilbutanal	0,01
Dietil 3-metilbutanal	0,01
Etil 2-metilbutil acetaldehído	0,03
Etil 3-metilbutil acetaldehído	0,14
Ácidos	
2-metil propanoico	0,03
2-metil butírico	0,03
Hexanoico	0,04
Octanoico	0,29
Decanoico	0,62
Dodecanoico	0,21
Tetradecanoico	0,02
Hexadecanoico	0,03
Hexadecenoico	0,03
Alcoholes	
Etanol	0,53
Propanol	0,61
Isobutílico	8,93
Butanol	0,47
2-metilbutanol y 3-metilbutanol	77,07
3-metil, 3-buten-1-ol	0,03
Pent-4-en-1-ol	0,06
Hexanol	0,03
2-feniletílico	0,6
Tetradecanol	0,06
Hexadecanol	0,06

Tabla 4. (Continuación)

Componente	Nivel relativo (%)
Aldehídos	
2-metil-butanal y 3-metil-butanal	0,03
Ésteres	
Acetato de etilo	2,34
Propionato de etilo	0,02
Acetato de butilo	0,02
Butirato de etilo	0,02
Acetato de 2-metilbutil y acetato de 3-metilbutil	0,25
Hexanoato de etilo	0,05
Lactato de etilo	0,15
Octanoato de etilo	0,19
Decanoato de etilo	0,42
Feniletil acetona	0,26
Dodecanoato de etilo	0,13
Furanos	
Tetrahidrofuran 3-ona 2-metil	0,25
Furfuril etil éter	0,03
Furfural	0,27
2 –acetil-furano	0,14
5-metilfurfural	0,11
5-hidroximetilfurfural	0,05
Cetonas	
Diacetil	0,07
Acetilpropionil	0,01
Ciclopentanona	0,12
Fenoles	
Vanilina	0,04
Siringilaldehído	0,09
Pirazinas	
2,5-dimetilpirazina	0,04
Trimetilpirazina	0,01

Tabla 4. (Continuación)

Componente	Nivel relativo (%)
Terpenoides	
<i>cis</i> -linalol óxido	0,05
Linalol	0,11
α -terpineol	0,18
Citronelol	0,04
<i>cis</i> -neridol	0,09
6(E)-dihidrofarnesol	0,03
<i>trans, trans</i> - α -farnesol	0,14
Acetoina	0,03

Las determinaciones cuantitativas se han realizado, fundamentalmente, por técnicas cromatográficas. Los aldehídos tales como: 5-hidroximetilfurfural, formaldehído, siringaldehído, acetaldehído, furfural, 5-metilfurfural [30] y los aniones cloruro, acetato, sulfato, nitrato y oxalato [31, 32] se han determinado mediante cromatografía líquida. Los dos principales aldehídos presentes en el tequila son furfural y 5-hidroximetilfurfural, cuyas estructura se presenta en la figura 14.

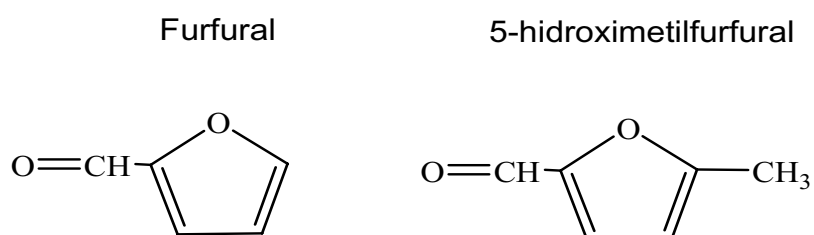


Figura 14. Estructura del furfural y 5 hidroximetilfurfural.

La cromatografía de gases ha sido la técnica empleada para determinar los principales componentes volátiles del tequila, como metanol, alcoholes superiores, ésteres, terpenos y aldehídos [33]. Los principales terpenos encontrados en el tequila son linalol, terminen-4-ol, α -terpineol, β -cotronellol, eugenol, *cis*-nerolidol y *trans*-farnesol [34]. La estructura química de estos compuestos se muestra en la figura 15. Se han determinado los ésteres etílicos de los ácidos octanoico, decanoico, tetradecanoato, hexadecanoato y octadecanoato de etilo [35]. También se han analizado alcoholes como: etanol, metanol, 1-propanol, isobutanol, 1-butanol, 2-butanol, 2-fenil-etanol, 1-hexanol, bencílico, 2-metil-butanol y 3-metil-butanol. Otros compuestos determinados son: acetatos de etilo, metilo y bencilo, además de lactato, caprilato, benzoato de etilo y benzaldehído [31, 32].

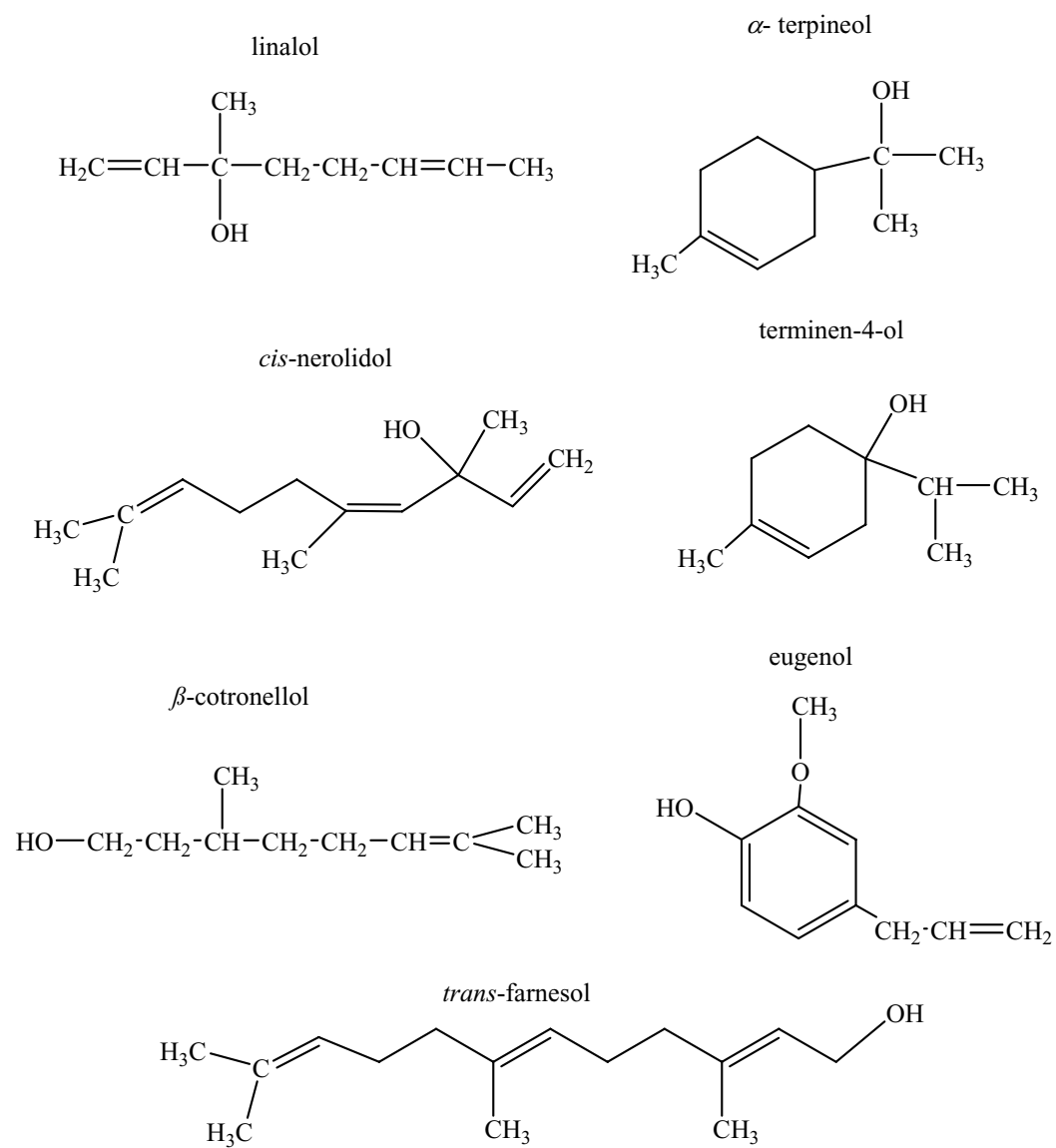


Figura 15. Estructura química de los principales terpenos del tequila

I.5 Composición química de bebidas alcohólicas

Las bebidas alcohólicas destiladas se han caracterizado por la presencia de componentes volátiles procedentes de la materia prima utilizada durante alguna de las etapas del proceso de producción, principalmente la fermentación, destilación y envejecimiento [36]. Estos compuestos son alcoholes, ácidos grasos, y ésteres responsables de las características organolépticas. Los aceites de fusel, que se encuentran en cantidades relativamente elevadas, han sido estudiados para la identificación y autenticación de varios tipos de whiskies [37]. Los ésteres, que se encuentran en menor concentración, también permiten detectar adulteraciones. Los compuestos carbonílicos, especialmente aldehídos junto con otros como metanol, alcoholes superiores, ésteres y ácidos orgánicos son productos secundarios del proceso de fermentación en bebidas alcohólicas. Pueden producir sabor y olor desagradable en el producto alcohólico final, debido a que su concentración depende principalmente de la calidad de las materias primas, condiciones del proceso de producción, tipo y cantidad de levadura utilizada y, en menor medida, del grado de corrosión de los tanques de fermentación [38]. En los destilados, los ésteres tienen especial influencia en el aroma y juegan un papel importante en la calidad de la bebida. Los ésteres se originan a partir de la reacción entre ácidos y alcoholes producidos durante el proceso de fermentación [39]. Se ha comprobado que algunas cetonas como 2-heptanona, 2-nonanona, 2-undecanona y 2-tridecanona juegan un papel importante en el carácter rancio del coñac, aunque probablemente no son los únicos. Los productos de oxidación de la lignina, lignanos y lactonas en madera de roble contribuyen el componente balsámico del carácter rancio [40].

Los compuestos no volátiles también son importantes en las características de las bebidas alcohólicas. Durante el envejecimiento se modifican las propiedades organolépticas de las bebidas haciéndolas más o menos intensas [41]. Existe una interacción química entre la bebida y la madera durante el proceso de envejecimiento, que en el caso del brandy cambia su sabor y color debido a la presencia de un gran número de compuestos fenólicos y furánicos que son extraídos de la madera. La madera de las barricas está compuesta de celulosa, hemicelulosa, lignina y taninos. La hidrólisis ácida de la lignina produce aldehídos aromáticos, la de taninos produce ácidos fenólicos y la de hemicelulosas monosacáridos [42, 43]. La cantidad de azúcares también se ha utilizado como indicador de la autenticidad de las bebidas que se añejan en barricas de roble [44, 45].

La presencia en exceso de determinados compuestos afecta de manera negativa a la calidad de las bebidas. Dentro de los compuestos carbonílicos, los aldehídos son conocidos también por sus efectos tóxicos, que provocan náuseas, vómito, sudoración, confusión, disminución de la presión sanguínea, palpitaciones y dolores de cabeza [46]. Otro compuesto de interés es el carbamato de etilo, que se forma de forma natural durante el proceso de fermentación. Produce cáncer en animales y se ha clasificado como posible carcinógeno humano [47]. Las industrias de bebidas espirituosas han modificado el proceso de producción para reducir los niveles de carbamato de etilo, pero el problema radica en las pequeñas destilerías.

Se han encontrado hidrocarburos aromáticos policíclicos en destilados de caña de azúcar. Su presencia es indeseable porque son potencialmente carcinogénicos y genotóxicos [48].

Además de los compuestos orgánicos, las bebidas alcohólicas contienen constituyentes metálicos, que se clasifican de acuerdo con su rol biológico en esenciales y no esenciales. Algunos elementos esenciales están presentes en bebidas a altas concentraciones como Ca, Mg, Na y K. También se encuentran presentes en cantidades de trazas elementos como Fe, Cu, Zn y Mn [49]. Los compuestos inorgánicos se encuentran en el organismo en diferentes formas químicas, tales como iones, sales o coordinados con ligandos orgánicas [50]. Los elementos metálicos provienen de las materias primas utilizadas durante el proceso de producción y maduración de la bebida. Además pueden provenir de contaminación medioambiental, fertilizantes, pesticidas y procesamiento industrial [51, 52]. Existen algunas fuentes concretas del origen de los metales que se encuentran en las bebidas alcohólicas. Por ejemplo, históricamente el cobre se ha utilizado en la elaboración de alambiques donde se lleva a cabo la destilación de aguardientes. Durante el proceso se forma un compuesto llamado verdigris $[\text{CuCO}_3\text{Cu}(\text{OH})_2]$ en las paredes del contenedor, que se disuelve con los vapores de alcohol acidificado y de esta manera contamina la bebida [53]. En general, el Cd y el Pb presentes en las bebidas alcohólicas pueden tener un origen natural, principalmente por el tipo de suelo o variedad de uva, entre otros. También pueden aparecer por contaminación debida a la utilización de pesticidas y fertilizantes, o durante el tratamiento de vinificación [54, 55].

Los niveles normales de los elementos que son considerados como esenciales en el cuerpo humano a niveles trazas mantienen el mecanismo homeostático, y la acción toxica de la mayoría de estos elementos se debe al resultado de la ingestión en grandes cantidades. Se dice que un elemento es tóxico cuando su concentración aumenta sobre el límite permisible. La gravedad del efecto tóxico depende de la naturaleza, cantidad y forma química del metal [50]. Por ejemplo, valores

elevados de cobre en el organismo son altamente tóxicos y pueden causar la enfermedad de Wilson y deterioro en la salud [53]. Otros elementos tóxicos presentes en bebidas alcohólicas son Al, Pb, As, Hg y Cd. Sus fuentes son diversas, desde la contaminación antropogénica, deposición de partículas, o el proceso de fermentación [56, 57].

1.5.1 Determinación de metales en bebidas alcohólicas

Las técnicas de espectroscopía atómica, tanto absorción como de emisión, son las técnicas analíticas más usadas para el análisis de los componentes metálicos. En la bibliografía se pueden encontrar diversos métodos que utilizan la espectroscopía de emisión atómica de plasma inducido acoplado (ICP-OES), espectroscopía de emisión de plasma acoplado a espectrometría de masas (ICP-MS), espectroscopía de absorción atómica de llama (FAAS) o con cámara de grafito (GFAAS) para la determinación de metales en bebidas alcohólicas.

Jurado et al. [51] determinaron Zn, B, Fe, Mg, Ca, Na y Si en anises mediante ICP-OES. Las muestras fueron tratadas utilizando cuatro métodos de digestión por vía húmeda con diferentes mezclas ácidas $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$, $\text{HNO}_3/\text{HClO}_4$, $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ y $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$, y dos por vía seca usando HNO_3 y $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$. Se obtuvieron los mejores resultados por los métodos de vía húmeda excepto el que utiliza $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$. También se ha determinado Cu, Cd y Pb en anises mediante GFAAS sin tratamiento previo de la muestra [58].

Cameán et al. [59] analizaron muestras de brandy de Jerez y de Penedés. Cuantificaron Ca, Cu, Fe, Mg, Mn y Zn mediante FAAS, K y Na utilizando ICP-OES y Al, Cd y Pb mediante GFAAS. En otro trabajo,

Cunha et al. [53] determinaron Cu, Fe y Zn en aguardientes de caña. El análisis se llevó a cabo mediante fluorescencia de reflexión total de rayos X (TXRF) con mineralización previa de las muestras por calcinación. Barbeira et al. [60] determinaron trazas de Zn, Pb y Cu en muestras de whisky mediante voltamperometría de redisolución anódica (ASV). Las muestras no se sometieron a tratamiento previo y los resultados se compararon con los obtenidos por espectroscopía de absorción atómica (AAS).

También se encuentran en la bibliografía trabajos donde se analiza el contenido metálico de diferentes bebidas destiladas. Capote et al. [52] realizaron una comparación del contenido de Zn, Fe y Cu en distintas bebidas alcohólicas venezolanas empleando TXRF y FAAS. Kokkinofta et al. [61] analizaron bebidas espirituosas como zivania, tsipuro, vodka y ginebra entre otras. Cuantificaron Fe, Cu, Al, Mn, Mg, Zn, Sb, As, Se, Cr, Cd, Pb, Ca, Na, K, y Ba, para determinar cuáles se pueden utilizar como parámetros de autenticación. Las muestras se digirieron con HNO₃ antes de ser analizadas por ICP-OES. Sharma et al. [50] realizaron un análisis de metales tóxicos como Pb, Cu, Cd, Zn y Ni en whisky mediante ICP-OES y compararon los niveles encontrados con los presenten en cerveza. López et al. [62] determinaron aluminio en diferentes tipos de bebidas: ron, whisky, anís, licor, brandy, vino, cerveza, y otras bebidas consumidas en España. Realizaron un estudio comparativo de métodos de digestión por vía húmeda en vaso abierto y microondas, utilizando HNO₃/H₂O₂. Las determinaciones se llevaron a cabo mediante GFAAS.

Nascimento et al. [63], usando FAAS, analizaron Li, Na, K, Mg, Ca, Al, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Pb, Cd y Hg en cachaça y otras bebidas brasileñas. Las muestras se analizaron directamente, excepto en los casos de Al, Hg, Pb y Cd que fueron preconcentradas previamente.

Usando la misma técnica, Jodral et al. [64] determinaron el contenido de Mg y Ca en bebidas destiladas como whisky, ginebra, ron, brandy, vino y cerveza. Rodushkin et al. [65] realizaron un análisis exhaustivo de metales presentes en muestras de vino, whisky y aperitivos. Determinaron Ag, Al, As, Au, B, Ba, Be, Bi, Br, Cd, Ce, Co, Cr, Cs, Cu, Fe, Hf, I, Ir, La, Li, Mn, Mo, Nb, Ni, P, Pb, Pd, Pt, Rb, Re, Rh, Ru, Sb, Sc, Sn, Sr, Ta, Te, Th, Ti, Tl, U, V, W, Y, Zn y Zr mediante ICP-MS. Olalla et al. [66] han utilizado GFAAS para determinar Fe en vinos, pacharán, brandy y anís. Las muestras fueron tratadas utilizando diferentes métodos de mineralización por vía húmeda y seca con diferentes mezclas ácidas. Realizaron un estudio comparativo usando los principales parámetros de validación para cada elemento.

1.5.2 Determinación de componentes orgánicos en bebidas alcohólicas

Las técnicas cromatográficas son las más utilizadas para la determinación de componentes orgánicos en bebidas alcohólicas. Un elevado número de las aplicaciones descritas en la bibliografía se basa en el uso de la cromatografía de gases o de la cromatografía líquida.

1.5.2.1 Cromatografía de gases

Se han realizado diversos estudios para la caracterización y cuantificación de los compuestos volátiles y semivolátiles en bebidas alcohólicas, utilizando diferentes métodos de extracción y análisis. En el caso concreto de los métodos de cromatografía de gases para muestras líquidas se han desarrollado diferentes métodos de extracción de los

analitos de interés. Entre éstas se encuentran la extracción en fase sólida (SPE), extracción con barra adsorbtiva (SBSE) y microextracción en fase sólida (SPME) mediante espacio de cabeza (HS) o inmerso en el líquido. La SPME se ha convertido en el método más utilizado para el análisis de los componentes químicos del aroma debido a que ofrece un análisis libre de disolventes y una rápida extracción con bajo costo, fácil operación y sensible [67]. Los sistemas de detección más utilizados son el de ionización de llama (FID) y espectrometría de masas (MS).

En la bibliografía se encuentran numerosos trabajos de determinación de volátiles en bebidas destiladas tales como ginebra, ron, vodka, whisky, aguardiente y brandy, entre otras. Pino et al. [36] realizaron una separación y concentración de ésteres etílicos de ácidos grasos en ron. Determinaron hexanoato, octanoato, decanoato y dodecanoato de etilo mediante cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID). Estudiaron la influencia de la concentración de etanol, fuerza iónica, volumen de muestra, tiempo y temperatura en la microextracción en fase sólida por espacio de cabeza (HS-SPME).

Sowinski et al. [38] desarrollaron un método para la determinación de aldehídos en vodkas mediante derivatización seguida de HS acoplado a un detector de captura electrónica (ECD). Wardencki et al. [68] determinaron diversos compuestos carbonílicos, concretamente metanal, etanal, dimetilcetona, propanal, propenal, butanal, isopentanal, 2-butenal, pentanal y hexanal, utilizando extracción mediante HS-SPME y el subsiguiente análisis por GC-FID. Utilizando también GC-FID Arbuzov et al. [69] identificaron metanol, 2-propanol y 1-propanol en vodkas con el fin de detectar adulteraciones en esta bebida alcohólica.

González et al. [70] cuantificaron los alcoholes 1-propanol, 2-metil-propanol, 3-metil-butanol y 2-metil-butanol en whisky mediante cromatografía de gases por espacio de cabeza con detector de espectrometría de masas (HS-GC-MS). Fitzgerald et al. [37] utilizaron SPME para la extracción y cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas (GC-MS) para el análisis y detección de los componentes volátiles presentes en whisky irlandés y escocés. Identificaron y determinaron 17 congéneres, entre los que se incluyen aceites de fusel, acetales y ésteres. Existe otro estudio en whiskies de malta realizado por Demyttenaere et al. [71], en el cual se analiza la fracción volátil y semivolátil utilizando SPME con diferentes fibras y SBSE, llevando a cabo el análisis mediante GC-MS.

Ledauphin et al. [72] investigaron compuestos carbonílicos y de azufre en destilados de calvados y coñac, mediante GC-FID y detector de quimioluminiscencia de azufre (SCD). Identificaron 48 aldehídos y cetonas en ambos productos usando una extracción con el reactivo de Girard's T. Se caracterizaron compuestos carbonílicos como terpenos, que se comprobó que eran específicos del coñac. La concentración total de compuestos de azufre fue 5-6 veces mayor en coñac que en muestras de calvados. Caldeira et al. [73] estudiaron el aroma en muestras de brandy envejecido. Las muestras se extrajeron con diclorometano y se analizaron mediante GC-MS. Se logró cuantificar 37 compuestos volátiles, entre los que se encuentran alcoholes, ésteres, ácidos, furanos, aldehídos y fenoles. Panosyan et al. [74] determinaron la composición de volátiles en coñac mediante HS-GC-MS. Identificaron alcoholes, ácidos carboxílicos, aldehídos y acetales. Finalmente, Watts et al. [40] realizaron un análisis de las cetonas presentes en brandy. Determinaron la presencia de 2-heptanona, 2-nonanona, 2-undecanona y 2-tridecanona. La extracción y el análisis se realizó mediante microextracción en fase

sólida por espacio de cabeza cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (HS-SPME-GC-MS). Vichi et al. [75] caracterizaron ginebras previo análisis por HS-SPME-GC-MS para conocer la composición de la fracción volátil.

Entre las bebidas espirituosas existen algunas otras que, comúnmente, se producen y consumen en regiones determinadas, como por ejemplo el licor cupuasso que se elabora en el este del Amazonas, aguardientes de frutas procedentes de Alemania, licor de limón en Italia y el Mouro y Tsipouro, que son bebidas tradicionales en Grecia. En Brasil, se elabora una bebida destilada parecida al ron llamada cachaça. Nonato et al. [39] determinaron alcoholes superiores, isobutílico, isoamílico, y propílico y acetato de etilo en cachaça mediante microextracción en fase sólida cromatografía de gases con detector de ionización de llama (SPME-GC-FID).

Oliveira et al. [76] identificaron el posible impacto sobre el olor de los compuestos orgánicos del licor de cupuassu. El estudio se realizó mediante HS-SPME acoplado a GC con detector de emisión atómica. Los compuestos encontrados principalmente fueron 3-metil-butanal, dimetilsulfuro, dimetildisulfuro, β -linalol y algunas alquilpirazinas. Lachenmeier et al. [47] estudiaron el contenido de carbamato de etilo en aguardientes de frutas mediante extracción y análisis por microextracción en fase sólida por espacio de cabeza cromatografía de gases acoplado a dos detectores en línea de espectrometría de masas (HS-SPME-GC-MS-MS). El método se puede usar para una determinación rápida de carbamato de etilo en bebidas alcohólicas.

Soufleros et al. [77] caracterizaron aguardiente Mouro, analizando alcoholes, ésteres y ácidos grasos mediante GC con inyección directa y

extracción con disolventes. Apostolopoulou et al. [78] estudiaron otra bebida griega llamada Tsipouro, que se elabora a partir de la destilación del residuo del prensado del vino. Determinaron, mediante GC-MS previa extracción con diclorometano, diez de los compuestos volátiles mayoritarios, acetaldehído, acetato de etilo, metanol, propanol, 2-metilpropanol, alcohol amílico, lactato de etilo, hexanol, furfural y 2-feniletanol. Finalmente, Versari et al. [79] analizaron compuestos volátiles y carbohidratos en muestras en licor de limón mediante GC-MS. Determinaron los ácidos láctico, oxálico, malónico, fosfórico, succínico, málico, cítrico y ascórbico. También algunos azúcares como fructosa, glucosa y sacarosa, alcoholes como etanol, propanol, metanol y butanol, así como otros compuestos como glicerol, sorbitol, acetaldehído, acetato de etilo, entre otros.

En el caso de aguardientes producidos en México, Lachenmeier et al. [32] utilizaron GC-FID para determinar metanol, acetaldehído, propanol, 1-butanol, 2-butanol, isobutanol, 2-metilbutanol, 3-metilbutanol, 2-feniletanol, 1-hexanol, alcohol bencílico, acetato de metilo y acetato de etilo, entre otros, en muestras de tequila (100% agave y mixto), sotol, bacanora y mezcal. En el caso de las categorías de tequila se observaron diferencias en las concentraciones de 3-metilbutanol, 2-metilbutanol, y 2-feniletanol y fueron mayores en tequila 100% agave. El sotol presenta concentraciones bajas de 3-metilbutanol y 2-metilbutanol, con respecto a las otras bebidas. En el caso del bacanora se caracterizó por su alta concentración de acetaldehído.

León et al. [80] caracterizaron la fracción volátil del mezcal joven, reposado y añejo. Se identificaron 37 compuestos, entre ellos el acetato de etilo, metanol, etanol, 2-butanol, n-propanol, 2-metilpropanol, 3-metilbutanol, 2-metilbutanol, 2-hidroxipropanoato de etilo y ácido acético. El

análisis de los compuestos mayoritarios se llevó a cabo mediante inyección directa en GC-FID.

Entre los compuestos minoritarios, se encuentran otros alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres etílicos de cadena larga, ácidos orgánicos, furanos, terpenos, alquenos y alquinos. Los compuestos minoritarios fueron extraídos mediante HS-SPME con fibras de carboxeno/divinilbenceno, posteriormente se llevó a cabo el análisis mediante GC-MS.

Se han realizado diversos estudios sobre la fracción volátil del tequila. Benn et al. [29] realizaron una caracterización de su sabor. Para llevar a cabo el análisis diluyeron las muestras de tequila con agua extrayendo varias veces con diclorometano. El extracto se concentró hasta obtener el 0,03% (v/v) del volumen inicial. El extracto obtenido se analizó por cromatografía de gases (GC) empleando varios métodos de detección: FID, MS, SCD y un análisis simultáneo utilizando FID y evaluación del olor (odor port evaluation) utilizando la técnica de dilución del extracto del aroma. Se identificaron más de 175 constituyentes del aroma en el extracto de tequila, que suman más del 99% del área total de los picos. Los ésteres detectados son alrededor de 50, aunque también se detectaron alcoholes, acetales, ácidos y terpenos, entre otros. Al realizar el análisis del aroma se detectaron más de 60 odorantes, de los cuales 32 se pueden correlacionar con compuestos identificados en el extracto. Además se identificaron los cinco odorantes más potentes del tequila; isovaleraldehído, alcohol isoamílico, β -damascenona, 2-feniletanol y vainillina.

Bauer et al. [33] realizaron también un análisis de componentes volátiles en muestras de tequila, tales como metanol, alcoholes

superiores, ésteres, terpenos y aldehídos, mediante GC-FID. En otro trabajo, también utilizando SPME-GC-MS llevado a cabo por Vallejo et al. [35] se realizó una caracterización de la fracción volátil de tequila cuantificando los ésteres etílicos. El muestreo, acondicionamiento, tiempo de exposición de la fibra de polidimetilsiloxano y el tipo de extracción (HS o inmersión directa) en la SPME fueron factores determinantes para la extracción óptima de los compuestos volátiles y semivolátiles. Se identificaron alcoholes, ésteres y cetonas principalmente, y se cuantificaron ésteres etílicos en tequilas blanco, oro, reposado y añejo. Se encontraron diferencias de concentración del octanoato, decanoato, tetradecanoato, hexadecanoato y octadecanoato de etilo que se relacionan con los diferentes tipos de tequila.

Peña et al. [34] determinaron terpenos en muestras de tequila reposado 100% agave mediante HS-SPME-GC-MS. Cuantificaron los que se encuentran a mayor concentración, linalol, terminen-4-ol, α -terpineol, β -citronelol, eugenol, *cis*-nerolidol y *trans*-farnesol. Para la extracción de la muestra probaron diferentes fibras y diferentes condiciones de extracción, utilizando finalmente una fibra de polidimetilsiloxano/divinilbenceno. También utilizaron NaCl para favorecer la extracción, a una temperatura de 25 °C, durante 30 min, agitando a 1200 rpm.

Aguilar et al. [81] han analizado el etanol presente en el tequila mediante GC-MS. El estudio se llevó a cabo en modo de combustión (C) y pirólisis (P) (HRGC-C/P-IRMS) para determinar la relación isotópica de $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ y $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ en tequila. También analizaron ron, vodka y destilados de vino para poder autenticarlo. Utilizaron fibras de polidimetilsiloxano/divinilbenceno para la extracción durante 10 min por espacio de cabeza a 25 °C.

I.5.2.2 Cromatografía líquida

La cromatografía líquida es una de las técnicas más utilizadas para la determinación de compuestos carboxílicos, compuestos fenólicos, azúcares, iones y ácidos, entre otros, en bebidas alcohólicas. La técnica cromatográfica más empleada es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). La elección del detector depende de las características del compuesto a determinar, siendo los detectores más utilizados el de ultravioleta, fluorescencia, amperométrico, conductimétrico e índice de refracción y dispersión de luz.

Arbuzov et al. [69] determinaron los iones: K^+ , Na^+ , Mg^{+2} , Cl^{-1} , NO_3^- y SO_4^{-2} mediante cromatografía líquida de intercambio aniónico con detección conductimétrica (HPAEC-CD) en vodka. Analizaron bebidas procedentes de destilerías de distintas regiones. Goldberg et al. [82] analizaron compuestos fenólicos y furanos en muestras de whisky, brandy y ron. Cuantificaron los ácido gálico, vainílico, siríngico y elágico, así como siringaldehído y vainillina mediante cromatografía líquida de alta resolución con detección ultravioleta visible (HPLC-UV).

Jurado et al. [83] determinaron anetol en anises mediante HPLC-UV. Compuestos fenólicos y cumarinas han sido analizados en licor de limón por Versari et al. [79] mediante HPLC-UV con fila de diodos.

También se han publicado diversos trabajos en los que se analizan muestras de aguardientes de caña de azúcar mediante HPLC. Nascimento et al. [46] analizaron formaldehído, 5-hidroximetilfurfural, acetaldehído, acroleína, furfural y benzaldehído en aguardiente de caña de azúcar (caninhas) y otras bebidas espirituosas como whisky, ron, coñac y vodka mediante HPLC-UV. Antes se realiza una derivatización

pre-columna con 2,4-dinitrofenilhidrazina. Cardoso et al. [84] analizaron cetonas en aguardiente de caña de azúcar y ron, utilizando el mismo procedimiento de derivatización con 2,4-dinitrofenilhidrazina y posterior análisis mediante HPLC-UV. Los compuestos determinados fueron acetona, acetofenona, ciclopentanona y 2,3-butanediona. Batista et al. [43] han determinado compuestos fenólicos de bajo peso molecular como los ácido gálico, vainílico, siringico y vainillina, siringaldehído, coniferaldehído, sinapaldehído y cumarina, además de 5-hidroximetilfurfural y furfural en aguardiente de caña de azúcar mediante HPLC-UV.

Por otro lado, Ferreira et al. [85] llevaron a cabo la cuantificación de los ácidos acético, propiónico, isobutírico, butírico, valérico, benzoico, caproico, heptanoico, caprílico, cáprico, láurico, mirístico, palmítico y linoleico presentes en cachaças mediante cromatografía líquida de alta resolución con detector de fluorescencia (HPLC-F) previa derivatización con 9-antrildiazometano. Tfouni et al. [48] determinaron hidrocarburos aromáticos policíclicos, como benzo[*a*]antraceno, benzo[*b*]fluoranteno, benzo[*k*]fluoranteno, benzo[*a*]pireno y dibenzo[*a,h*]antraceno en licor de caña de azúcar. Llevaban a cabo una extracción líquido-líquido con ciclohexano y dimetilformamida-agua (9:1), utilizando después HPLC-F.

Diversos autores han estudiado la presencia de compuestos orgánicos en brandy. Quesada et al. [86] determinaron furfural y 5-hidroximetilfurfural mediante dos técnicas realizando una comparación de las mismas. En una de ellas determinaron el furfural mediante destilación y posterior análisis espectrofotométrico a 277 nm. El 5-hidroximetilfurfural se determinó por diferencia entre la cantidad total de aldehídos, medidos a 280 nm y restando el contenido de furfural. El segundo método se basa en el uso de HPLC, realizando una inyección directa de las muestras

después de su filtración. Ambos métodos fueron validados para la determinación de furfural y 5-hidroximetilfurfural en brandy envejecido tradicionalmente y solera envejecida. No se encontraron diferencias significativas entre ambos métodos.

Blanco et al. [44], mediante HPLC-UV previa derivatización con éster etílico del ácido *p*-aminobenzoico, determinaron aldosas, glucosa, galactosa, xilosa, arabinosa, ribosa, mucosa y ramnosa, y ácidos urónicos, *d*-glucurónico y *d*-galacturónico. Blanco et al. [45] realizaron también una determinación de estas aldosas y ácidos urónicos empleando en este caso HPLC con detector amperométrico. Martínez et al. [87] analizaron los azúcares: xilosa, galactosa, arabinosa, fructosa y glucosa en brandy de Jerez durante el proceso de envejecimiento mediante cromatografía líquida de intercambio aniónico (HPAEC) iónica con detector amperométrico.

También se han realizado estudios sobre bebidas mexicanas. Lachenmeier et al. [32] analizan oxalato, cloruro, nitrato y sulfato en tequila, mezcal, sotol y bacanora mediante HPAEC. Las concentraciones de aniones encontradas en muestras de tequila son menores que las otras.

Muñoz et al. [30] analizaron aldehídos en tequila mediante HPLC-UV. Antes del análisis la muestra se derivatizó con 2,4-dinitrofenilhidrazina para la determinación de 5-hidroximetilfurfural, formaldehído, siringaldehído, acetaldehído, furfural y 5-metilfurfural en tequilas 100 % agave y mixto. También analizaron muestras de brandy para comparar los resultados obtenidos. Encontraron concentraciones muy elevadas de furfural y 5-hidroximetilfurfural en tequila 100% agave con respecto al tequila mixto.

Lachenmeier et al. [31] analizaron muestras de tequila 100% agave y mixto, llevando a cabo una cuantificación de cloruro, acetato, sulfato, nitrato y oxalato mediante HPAEC equipado con detector conductimétrico. Las muestras se inyectaban directamente. Se observaron grandes diferencias entre la concentración total de aniones de los tequilas embotellados en México (2,5 mg/l para 100% agave y mixto) con respecto a los tequilas embotellados en el extranjero (26 mg/l para tequilas mixtos).

I.5.2.3 Otras técnicas

Aparte de las técnicas mencionadas para el análisis de bebidas alcohólicas se han realizado estudios por otros métodos, como el realizado por Moller et al. [88] utilizando espectrometría de masas con ionización por electroespray (ESI-MS) para analizar whiskies de distinta procedencia sin necesidad de tratamiento previo de la muestra y realizar posteriormente un estudio de autenticación. Pontes et al. [89] usaron espectrometría de infrarrojo próximo (NIR) para obtener los espectros de diversas bebidas alcohólicas. Estudiaron whisky, brandy, ron y vodka para su posterior clasificación. Palma et al. [90] utilizaron espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) para la clasificación de vinos y brandies durante su proceso de envejecimiento.

Lachenmeier et al. [31] también usaron FTIR para diferenciar muestras de tequila de los cuatro tipos y ambas categorías. En los espectros consideraron las señales de etanol, metanol, acetato de etilo, 1-propanol, isobutanol, 2-metil-butanol y 3-metil-butanol. Las concentraciones de metanol e isobutanol son significativamente mayores en tequila 100% agave.

Bauer et al. [33] utilizaron resonancia magnética nuclear con fraccionamiento isotópico específico natural (SNIF-NMR) para obtener la relación isotópica de $^2\text{H}/^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ del etanol en muestras de tequila. Debido a las pequeñas diferencias encontradas no se pudo lograr la clasificación entre categorías de tequila. Barbosa et al. [91] utilizaron espectroscopía ultravioleta visible (UV-V) para discriminar las categorías 100% agave y mixto de tequilas del tipo blanco. Obtuvieron los espectros UV-V de 60 muestras de tequila blanco entre 250 y 500 nm. La absorción máxima se obtiene alrededor de 278 nm y a partir de los 400 nm la absorción era casi nula dentro de este rango.

Frausto et al. [92] determinaron etanol en muestras de tequila mediante espectroscopía Raman considerando las señales del OH en el intervalo $3100\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$.

I.6 Aplicación del análisis multivariante para la clasificación de bebidas

La primera aplicación de los métodos de reconocimiento de patrones (PRM) en el análisis de vinos la realizó Kowalski [93] en 1978. Desde entonces se han utilizado PRM para la clasificación de diversos tipos de bebidas alcohólicas y diferenciación de zonas de producción. La primera aplicación de los PRM en destilados utilizando como descriptor químico el contenido orgánico la realizaron Saxberg et al. [94] en muestras de whisky. Determinaron alcohol isoamílico y acetaldehído mediante GC-FID, utilizando estos datos para distinguir muestras de whisky de diferente calidad. La clasificación se realizó utilizando el análisis en componentes principales (PCA) y el método de los k vecinos más próximos (KNN).

El contenido metálico se ha utilizado para la clasificación de bebidas como whisky, brandy y otros tipos de licores. Fernández et al. [95] determinaron mediante ICP-OES los elementos Al, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Pb, S, Se, Si, Sn, Sr y Zn en licores de caña de azúcar. Con los datos obtenidos y utilizando PCA y análisis cluster (CA), caracterizaron las bebidas según el modo de producción industrial y artesanal. En Venezuela se produce una bebida tradicional llamada aguardiente de cocuy. Hernández et al. [96] analizaron el contenido en Zn, Cu y Fe en esta bebida mediante FAAS. El propósito fue diferenciar las distintas zonas geográficas de elaboración y la presencia o ausencia de azúcar en el producto final utilizando PRM. Los resultados obtenidos por redes neuronales artificiales (ANN) aportan una mejor clasificación que los generados por análisis discriminante lineal (LDA) y cuadrático (QDA).

En el caso de los anises, Jurado et al. [97] determinaron Zn, B, Fe, Mg, Ca, Na y Si en anises mediante ICP-OES. Posteriormente utilizaron dicho contenido como descriptores químicos para la caracterización de los anises según su diferente procedencia. Se aplicó PCA, CA, LDA y modelado suave de análisis independiente por analogía de clases (SIMCA). Cameán et al. [59] realizaron una diferenciación de brandies españoles de acuerdo a su contenido de Ca, Cu, Fe, Mg, Mn y Zn. Aplicando ANN discriminaron entre los procedentes de Jerez y Penedés. Kokkinofa et al. [61] analizaron el contenido metálico de la bebida destilada zivania y mediante LDA canónico y clasificación de árboles binarios estudiaron cuáles son los parámetros más importantes con fines de autenticación. Ambas técnicas revelaron que Mg, Zn y Cu son los parámetros más adecuados para la diferenciación de esta bebida.

El contenido metálico junto con la composición orgánica se han utilizado para clasificar bebidas, tal es el caso de Cardoso et al. [98], que llevaron a cabo una comparación entre cachaça y ron. Analizaron alcoholes como metanol, propanol, isobutanol, e isopentanol. También consideraron el contenido en acetaldehído, acetato de etilo, ácidos orgánicos (octanoico, decanoico y dodecanoico), metales (Al, Ca, Co, Cr, Fe, Mg, Mn, Ni, Na y Zn) y polifenoles. Con los datos analíticos obtenidos de ambos tipos de bebidas aplicaron PCA, CA, LDA y KNN obteniendo una muy buena discriminación entre las dos clases de bebidas.

González et al. [70] diferenciaron tipos de whiskies a partir del contenido de 1-propanol, 2-metil-propanol 3-metil-butanol y 2-metil-butanol. Para visualizar la estructura de los datos y la eficiencia discriminatoria de los parámetros seleccionados, realizaron PCA diferenciando tres clases de whisky, escocés, bourbon e irlandés. Posteriormente se aplicó CA observando la separación de las tres clases

consideradas. Por otro lado, González et al. [99] realizaron la discriminación de distintos tipos de whisky con los mismos descriptores químicos. Primero usaron PCA como técnica de visualización y posteriormente, utilizaron técnicas de clasificación como KNN, LDA, SIMCA, análisis discriminante procrustes (PDA), perceptrones multicapa (MLP) y redes neuronales probabilísticas (PNN). La evaluación del mejor método con fines clasificatorios se realizó a partir de la sensibilidad y especificidad calculada para cada método para las tres categorías estudiadas: escocés, bourbon e irlandés.

Vichi et al. [75] utilizaron los componentes volátiles para la diferenciación de distintos tipos de ginebra. Mediante LDA se observan claramente seis clases de las cuales dos son denominaciones geográficas de origen.

Existen diversos estudios de clasificación sobre brandy. Entre ellos cabe citar el realizado por Martínez et al. [87] a partir del análisis de azúcares y el empleo posterior de LDA. Se clasificó correctamente el 82,6% de los brandies estudiados. Las variables con mayor poder discriminante fueron la fructosa, arabinosa y glucosa, seguida de la xilosa y galactosa. El análisis canónico muestra una diferenciación entre los grupos Solera, Solera Reserva y Solera Gran Reserva. Otro estudio es el realizado por Blanco et al. [100] en brandies de sidra a partir del contenido de azúcares y ácidos glucurónico y galacturónico mediante HPLC-UV. Los datos obtenidos fueron tratados utilizando PCA, LDA, análisis bayesiano (BA) y mínimos cuadrados parciales (PLS). Dichos métodos se utilizaron para clasificar los brandies de acuerdo al tiempo de envejecimiento y al tipo de barrica utilizada. Por otro lado, los brandies de sidra también han sido clasificados por Rodríguez et al. [101] basándose en la región de origen de la materia prima usada en la producción del

producto y usando diversas técnicas de PRM como PCA, LDA y BA. Se utilizaron los compuestos volátiles presentes en la bebida como descriptores químicos, siendo el 1-butanol y el hexanoato de etilo los más discriminantes. Finalmente, Joon et al. [102], a partir del contenido de ácidos orgánicos (oxálico, glicólico, tartárico), utilizaron LDA para la clasificación de muestras de brandy y whisky.

Hasta ahora se ha hablado sólo del contenido metálico y fracción orgánica para la clasificación de bebidas alcohólicas, pero también se han realizado estudios para la discriminación de bebidas espirituosas mediante la utilización de otros datos como descriptores quimiométricos. Moller et al. [88] llevaron a cabo una autenticación de whiskies procedentes de Escocia, Norteamérica y adulterados mediante ESI-MS. Posteriormente, con los datos obtenidos se llevó a cabo un tratamiento quimiométrico mediante un análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) obteniendo una buena clasificación de los tres tipos estudiados. Palma et al. [90] a partir de FTIR diferenciaron brandies durante su proceso de envejecimiento. Primero se realizó un PCA con los valores de longitud de onda obtenidos entre 240-770 nm, consiguiendo una buena separación de acuerdo al grado de envejecimiento del brandy, Solera, Reserva y Gran Reserva. Posteriormente, mediante LDA dedujeron cuáles eran las longitudes de onda más características, siendo las mejores las más cercanas a 770 nm.

En otro trabajo realizado por Pontes et al. [89], se lleva a cabo una clasificación y verificación de adulteraciones en bebidas alcohólicas como whisky, brandy, ron y vodka a partir de datos de espectrometría de NIR y utilizando PCA y SIMCA. NIR también se ha utilizado para la discriminación de coñac y otras bebidas destiladas como whisky, brandies, ron, bourbon entre otros. La clasificación se llevo a cabo

utilizando PCA y la discriminación entre tipos de coñac se realizó utilizando PLS.

En el caso del tequila, también se han realizado estudios de autenticación, Aguilar et al. [81] han utilizado los valores de distribución isotópica de $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ y $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ del etanol presente en el destilado. El estudio se llevó a cabo con muestras de tequila (100% agave y mixto) adquirido en Jalisco (auténtico) y de otras procedencias (comercial). Al representar los valores obtenidos de $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDO}}$ y $\delta^{18}\text{C}_{\text{VSMOW}}$ se observan diferencias entre el tequila comercial y auténtico, aunque no fue aplicable para correlacionar muestras de tequila con otras bebidas. Lachenmeier et al. [31] han utilizado PCA para diferenciar entre tequila 100% agave y mixto. Usaron los datos obtenidos en el registro de espectros FTIR de la fracción de compuestos volátiles, metanol, acetato de etilo, propanol, isobutanol, 2-metil-butanol y 3-metil-butanol.

Barbosa et al. [91] han utilizado los datos de espectros de absorción UV-V de muestras de tequila para discriminar las categorías 100% agave y mixto de tequilas del tipo blanco. De esta forma intentaron conseguir un procedimiento rápido y barato para el control de calidad del tequila. A partir de los datos del espectro de primera derivada normalizada se realizó un PCA. Posteriormente, se aplicó PLS-DA y a los valores obtenidos se le aplicó el método discriminante lineal de Fisher. Se consiguió una correcta clasificación del 75% de los tequilas 100% agave y el 80% del mixto. Frausto et al. [92] aplicaron PCA a partir de las señales del OH del etanol presente en tequila, analizado mediante espectroscopía Raman. De esta forma diferenciaron entre tipos blanco y reposado.

II. MÉTODOS DE RECONOCIMIENTO DE PATRONES

Antes de comenzar, conviene precisar algunos términos fundamentales como *Quimiometría*, *Reconocimiento de Patrones (Pattern Recognition)* o *Análisis Multivariante*, que constituyen la base de toda interpretación racional a partir de datos químicos multivariantes.

La *Quimiometría*, tal como se define en el *Journal of Chemometrics and Intelligent Laboratory System*, es la disciplina química que emplea los métodos matemáticos y estadísticos para diseñar o seleccionar procedimientos óptimos y experimentos, así como para proporcionar un máximo de información química a partir del análisis de los datos químicos. El empleo de procedimientos quimiométricos en conjuntos de datos multivariantes que se obtienen en análisis químico es algo habitual cuando se requiere cubrir alguno de los aspectos correspondientes a la exploración y visualización de los datos, al agrupamiento, clasificación y predicción de variables externas que son funciones de los descriptores del sistema.

El *Reconocimiento de Patrones* es una rama de la inteligencia artificial, desarrollada a partir del final de la década de los sesenta, que proporciona una aproximación general a la resolución de problemas de análisis de grandes conjuntos de datos, que pueden aglomerarse en diversas clases. En pocas palabras, el planteamiento general del problema sería: "Dado un conjunto de objetos y una serie de medidas realizadas sobre esos objetos, ¿es posible encontrar y/o predecir una propiedad de los objetos, que no puede medirse directamente, pero que sabemos que está relacionada con las medidas mediante una relación desconocida? [103]. Su campo de aplicación no sólo atañe a las ciencias experimentales, también incluye otras disciplinas como son psicología, política, pedagogía, lingüística y medicina. Debido a sus numerosas aplicaciones, ha sufrido un espectacular desarrollo en los últimos años, el cual se ha visto influido muy

positivamente por las grandes posibilidades que actualmente ofrece la informática.

Dentro del campo del análisis y la composición de los alimentos, podemos subrayar cuatro factores básicos a considerar desde el punto de vista de la discriminación de categorías [104]. El primero, habida cuenta de la creciente aplicación de la ingeniería genética a los alimentos procedentes del mundo animal y vegetal en el control genético. El segundo factor es el componente ambiental, que incluye al suelo, clima y organismos simbióticos o parásitos. El tercer factor es el componente agronómico, resultado de las prácticas utilizadas en la producción del alimento: cultivo, riego, fertilizantes, abonos, piensos, medicamentos, pesticidas y prácticas de recolección. El cuarto factor es el procesamiento, que incluye las manipulaciones realizadas después de la cosecha tales como la preservación, agregado de aditivos y conversiones a otra forma alimentaria y productos determinados. Estos cuatro factores pueden considerarse en la terminología del análisis multivariante como las causas directrices de la composición de los alimentos. No obstante, aún cuando tales factores son fehacientemente trazables y definibles, frecuentemente resulta difícil inferirlos de los datos de composición de los alimentos, pues ésta no sólo es multivariante, sino que además puede ser no lineal con respecto a estos factores.

La composición de los alimentos puede definirse cualitativa y cuantitativamente mediante medidas físicas y químicas, y como la mayoría de los alimentos son mezclas complejas de muchos componentes a menudo desconocidos y variables, la caracterización de un alimento requiere muchas medidas.

En química el término "objetos" puede cubrir desde elementos puros o compuestos hasta complicados productos industriales o naturales, y cada uno de ellos viene caracterizado por un conjunto de medidas. Por lo tanto entramos de lleno en la interpretación de datos químicos multivariantes (cada objeto viene caracterizado no por una sino por un conjunto de medidas) y ello entraña el empleo, entre otras herramientas de trabajo, del *Análisis Multivariante*. Se entiende por *Análisis Multivariante* a la rama de la estadística y el análisis de datos que estudia, interpreta y elabora el material estadístico sobre la base de un conjunto de $n > 1$ variables que pueden ser de tipo cuantitativo, cualitativo o una mezcla de ambos. La información obtenida en Análisis Multivariante es, por lo tanto, de carácter multidimensional, por lo que utiliza extensamente los métodos del álgebra lineal, cálculo numérico, geometría lineal y otras clases de geometrías [105]. No obstante, debemos precisar que el Análisis Multivariante trabaja con variables que siguen una determinada función de distribución, ya que pertenecen a la estadística. El reconocimiento de patrones (PR) puede usar métodos de Análisis Multivariante o bien otros métodos que no se basen en la estadística, como por ejemplo, los algoritmos neuronales, para conseguir sus objetivos.

Dentro de esta disciplina, el término patrón se refiere a acontecimientos, objetos o entes que vienen descritos por una serie de variables llamadas descriptores o características, que son parámetros físicos o químicos que los caracterizan. A un conjunto de patrones que presentan valores similares de sus descriptores se le conoce como categoría o clase. La idea básica de los métodos de clasificación consiste en el establecimiento de fronteras entre las clases de patrones mediante una regla de clasificación.

Desde el punto de vista quimiométrico, con estos métodos pueden predecirse características de muestras que no se observan directamente a partir de un conjunto de medidas químicas pero que están relacionadas con alguna propiedad química. En PR se trabaja siempre con patrones o "casos", los cuales químicamente no son más que muestras descritas por un conjunto de variables o "descriptores", es decir, parámetros físicos o químicos que caracterizan dichas muestras.

El primer nivel de PR consiste en el establecimiento de fronteras entre clases de patrones y de reglas de clasificación para ubicar un patrón desconocido dentro de alguna de las clases previamente conocidas. Es una técnica de "modelado duro" (*hard modelling*), ya que el patrón siempre va a ser asignado a una determinada clase. Si consideramos el segundo nivel, las fronteras se establecen no sólo entre las categorías existentes, sino entre cada clase y el resto de los datos. Es decir, que un patrón no tiene necesariamente que pertenecer a alguna de las categorías. Las técnicas que se aplican en este segundo nivel son de "modelado suave" (*soft modelling*) y consideran la posibilidad de datos aberrantes (*outliers*) que no pueden clasificarse en ninguna de las clases conocidas de antemano. El tercer nivel tiene la habilidad de correlacionar las variables medidas que describen al objeto con una propiedad externa de carácter continuo. Un problema de cuarto nivel implica la correlación de los descriptores del objeto con varias variables externas al sistema [106].

II.1 Conceptos básicos en el reconocimiento de patrones

II.1.1 Espacio de modelos

Cualquier patrón u objeto i que se estudia, es decir, cada muestra, va a venir descrito por un conjunto de c variables y se va a representar por un vector fila:

$$x_{ij} \quad (j=1 \text{ a } c) \quad 1$$

cuyas componentes serán $\{x_{i1}, x_{i2}, \dots, x_{ic}\}$, estos vectores son los que forman las filas de la matriz de datos \mathbf{X} en el espacio de las variables y reciben el nombre de vectores patrón (*pattern vector*). Por el contrario, si cambiamos de perspectiva y trabajamos en el espacio de los patrones tendremos r vectores columna:

$$x_{ij} \quad (i=1 \text{ a } r) \quad 2$$

cuyas componentes son los valores de una misma variable en cada una de las muestras $\{x_{1j}, x_{2j}, \dots, x_{rj}\}$ y constituyen las columnas de la matriz de datos. Esto conduce a dos principales categorías de técnicas analíticas llamadas modo R y modo Q. Las técnicas en modo R tratan las relaciones entre las variables del experimento y examinan las dependencias entre las columnas de la matriz de datos, mientras que las técnicas en modo Q tratan las relaciones o agrupamientos entre los casos examinando las dependencias entre las filas de la matriz \mathbf{X} .

Si se trabaja en modo R, el punto de partida es calcular la matriz de covarianzas \mathbf{C} , que es una matriz simétrica obtenida según $\mathbf{C} = \mathbf{X}^T \mathbf{X}$. Normalmente, para evitar el predominio de descriptores que presenten valores elevados sobre otros de valores más pequeños, se suelen homogeneizar las escalas de las variables realizando el denominado autoescalado de las variables, según la expresión:

$$x'_{ij} = \frac{x_{ij} - \bar{x}}{s_j} \quad 3$$

donde:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^r x_{ij}}{r} \quad 4$$

$$s_j = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^r x_{ij} - \bar{x}}{r-1}} \quad 5$$

Así, la matriz de covarianza para los datos autoescalados se transforma en la matriz de correlación \mathbf{R} , donde los elementos de la diagonal r_{ii} son siempre la unidad y el resto de elementos son los coeficientes de correlación $r_{ij} = r_{ji} < 1$. Si se trabaja en modo Q, se comienza con una matriz de distancias en el espacio de los modelos.

II.1.2 Distancias en el espacio patrón [107]

Vamos a considerar dos vectores patrón \mathbf{x}_a y \mathbf{x}_b que pertenecen al espacio c-dimensional. Así: $\mathbf{x}_a = \{x_{a1}, x_{a2}, \dots, x_{ac}\}$ $\mathbf{x}_b = \{x_{b1}, x_{b2}, \dots, x_{bc}\}$. Las distancias que más suelen emplearse son las siguientes:

♣ *Distancia euclídea:*

$$d_{ab} = \sqrt{\sum_{i=1}^c (x_{ai} - x_{bi})^2} \quad 6$$

esta distancia es una de las más utilizadas en quimiometría.

♣ *Distancia de Minkowski:*

$$d_{ab} = \left(\sum_{i=1}^c |x_{ai} - x_{bi}|^k \right)^{\frac{1}{k}} \quad 7$$

donde k es un entero.

▲ *Distancia City Block o Manhattan:*

$$d_{ab} = \sum_{i=1}^c |x_{ai} - x_{bi}| \quad 8$$

es equivalente a la Minkowski para $k=1$

▲ *Distancia Hamming:*

$$d_{ab} = \sum_{i=1}^c XOR(x_{ai}, x_{bi}) \quad 9$$

esta distancia corresponde a la City Block cuando las variables se codifican de forma binaria, escalando con valores 0 ó 1.

▲ *Distancia de Mahalanobis:*

$$d_{ab}^2 = (x_a - x_b)^T C^{-1} (x_a - x_b) \quad 10$$

donde \mathbf{C} es la matriz de covarianzas, es decir, esta distancia corresponde a la distancia euclídea eliminando la posible correlación de las variables.

II.1.3. Preprocesado de los datos

El preprocesado de los datos sobre los que se va a trabajar consiste en manipulaciones algebraicas sobre la matriz de datos inicial, para una mejor realización de las técnicas de reconocimiento de patrones. Fundamentalmente, encontramos dos variantes: *escalado* y *ponderación*; en la primera, se equiparan los valores de las variables y se emplea para evitar los distintos rangos de magnitud de las medidas, la segunda diferencia entre los valores de descriptores que pertenecen a distintas clases y su uso permite ver las variables más importantes a la hora de distinguir entre categorías.

Dentro de las *técnicas de escalado* se distinguen [108]:

- ▲ *Centrado*: cuya representación de los nuevos valores viene dada por la expresión:

$$x'_{ij} = x_{ij} - \bar{x}_j \quad 11$$

$$\text{donde } \bar{x}_j = \frac{1}{r} \sum_i x_{ij} \quad 12$$

- ▲ *Normalización de columnas*: basta con dividir los valores de las variables por la desviación estándar:

$$x'_{ij} = \frac{x_{ij}}{s_j} \quad 13$$

- ▲ *Autoescalado*: las variables originales sufren una transformación tipo Student. Así:

$$x'_{ij} = \frac{x_{ij} - \bar{x}_j}{s_j} \quad 14$$

- ▲ *Escalado del rango*: transformación del intervalo de valores entre un máximo de 1 y un mínimo de 0.

$$x'_{ij} = \frac{x_{ij} - \min_j(x_{ij})}{\max_j(x_{ij}) - \min_j(x_{ij})} \quad 15$$

- ▲ *Perfiles de fila*: consigue una frecuencia de aparición de cada variable.

$$x'_{ij} = \frac{x_{ij}}{\sum_j x_{ij}} \quad 16$$

II.1.4 Criterios de ponderación y selección de variables

Antes de pasar a la enumeración de los distintos métodos, consideraremos algunas expresiones que se van a utilizar. Así:

$$m = \frac{1}{r} \sum_i^r x_i \quad 17$$

es el valor promedio de todos los patrones considerados. Expresión análoga se tiene para el patrón promedio de una determinada clase L.

$$m^{(l)} = \frac{1}{r_l} \sum_i^{r_l} x_i^{(l)} \quad 18$$

La matriz de varianza total es:

$$S_T = \sum_{i=1}^r (x_i - m)(x_i - m)^T \quad 19$$

para una variable, mientras que la covarianza entre las variables j y k es:

$$(S_T)_{jk} = \sum_{i=1}^r (x_{ij} - m_j)(x_{ik} - m_k) \quad 20$$

La matriz intraclase, que mide la dispersión dentro de cada clase se define como:

$$S_w = \sum_{l=1}^L \sum_{i=1}^{r_l} (x_i^{(l)} - m^{(l)})(x_i^{(l)} - m^{(l)})^T \quad 21$$

cuando es entre dos variables j y k se tiene:

$$(S_w)_{jk} = \sum_{l=1}^L \sum_{i=1}^{r_l} (x_{ij} - m_j)(x_{ik} - m_k) \quad 22$$

De forma análoga, la matriz de varianza entre clases para una variable y para dos variables j y k es:

$$S_B = \sum_{l=1}^L r_l (m^{(l)} - m)(m^{(l)} - m)^T \quad 23$$

$$(S_B)_{jk} = \sum_{l=1}^L r_l (m_j^{(l)} - m_j)(m_k^{(l)} - m_k) \quad 24$$

A continuación, citaremos algunos de los criterios más habituales de ponderación considerando las clases 1 y 2:

- ▲ *Ponderación de la varianza* [103]:

$$WV_j = \frac{r_1 (m_j^{(1)} - m_j)^2 + r_2 (m_j^{(2)} - m_j)^2}{S_j^{(1)^2} + S_j^{(2)^2}} \quad 25$$

mientras mayor sea WV más discriminante será la variable j.

- ▲ *Pesos de Fisher* [109]:

$$FW_j = \frac{(m_j^{(1)} - m_j^{(2)})^2}{S_j^{(1)^2} + S_j^{(2)^2}} \quad 26$$

es un criterio más utilizado que el anterior.

- ▲ *Ponderación de Coomans* [110]: Cuando se consideran más de dos clases es ventajoso el empleo del criterio siguiente:

$$g_j = \frac{|m_j^{(1)} - m_j^{(2)}|}{S_j^{(1)} + S_j^{(2)}} \quad 27$$

- ▲ *Método Λ de Wilks* [111, 112]:

$$\Lambda = \frac{\det(S_w)}{\det(S_T)} \quad 28$$

los valores del parámetro van desde 1.0 (ningún poder discriminatorio) a 0.0 (poder discriminatorio perfecto).

II.2 Métodos de visualización de datos

II.2.1. Análisis en componentes principales

El PCA, también llamado autoanálisis o transformación de Karhunen Loewe, comenzó en la primera década del siglo XX; fue en 1931 cuando se desarrolló para perfiles de comportamiento. Hasta 1950, no se aplicó a problemas de tipo químico. Es un procedimiento que puede aplicarse a cualquier conjunto de datos como técnica exploratoria con excelentes resultados [113, 114]. PCA transforma las c variables originales, posiblemente correlacionadas entre sí, en otros nuevos c ejes llamados *componentes principales* o *PC's* mediante un giro en el espacio de r dimensiones. Los nuevos ejes son ortogonales entre sí y son combinaciones lineales de las variables originales. En este tipo de análisis, no se tiene en cuenta ningún modelo de distribución para las variables.

Estos PC's se van a generar sucesivamente, de forma que el primero explica la mayor parte de la varianza entre los datos y los siguientes explican cantidades decrecientes de la varianza residual. Por tanto, al convertir las variables originales en componentes principales las correlaciones entre los ejes quedan eliminadas y la mayor parte de la varianza, es decir, de la información contenida en los datos originales queda explicada por los primeros PC's.

En el sentido matemático, se parte de la matriz de datos $\mathbf{X}_{r,c}$; el primer paso es realizar un preprocesado (centrado, autoescalado de los datos originales, etc). La matriz de covarianzas viene dada por $\mathbf{C} = \mathbf{X}^T \mathbf{X}$. El análisis en componentes principales busca una matriz de similaridad (transformación ortogonal) $\mathbf{U}_{c,c}$ que actúe sobre la matriz de datos $\mathbf{X}_{r,c}$ para originar otra matriz $\mathbf{Y}_{r,c}$, llamada matriz de scores, en la que los datos están

referidos a los nuevos ejes o componentes principales:

$$Y_{r,c} = X_{r,c} U_{c,c} \quad 29$$

La matriz $Y_{r,c}$ debe cumplir:

$$Y_{r,c} Y_{r,c}^T = \Lambda_{c,c} \quad 30$$

donde $\Lambda_{c,c}$ es la nueva matriz de covarianzas, que es una matriz diagonal y no debe confundirse con el parámetro Λ de *Wilks*. Por tanto:

$$Y^T Y = (XU)^T (XU) = U^T C U = \Lambda \quad 31$$

luego la expresión final que obtenemos es:

$$\Lambda = U^T C U \quad 32$$

esta ecuación es la llamada *Transformación de Karhunen-Loewe*.

Se pretende encontrar los vectores columna de la matriz de transformación U , como ésta es ortogonal se cumple que $U^T = U^{-1}$. De forma que multiplicando por U por la izquierda la expresión de Karhunen, se tiene: $U \Lambda = C U$. Si reescribimos la misma expresión pero en lugar de en forma matricial lo hacemos vector a vector, podemos poner: $u_j \lambda_j I = C u_j$ es una clásica ecuación de autovalores o autovectores; es decir $u_j (C - \lambda_j I) = 0$ luego debe cumplirse que $\det (C - \lambda_j I) = 0$ donde I es la matriz unidad. Lo cual conduce a un polinomio de grado c :

$$\lambda^c + a_1 \lambda^{c-1} + a_2 \lambda^{c-2} + \dots + a_c = 0 \quad 33$$

debido a que la matriz C es simétrica las c soluciones del polinomio son reales y positivas. Los valores de λ_j son los elementos de la diagonal principal de la matriz Λ y son las varianzas de los datos referidas a los nuevos ejes. Se ordenan en sentido decreciente de los valores de λ_j , de forma que:

$$\lambda_1 \geq \lambda_2 \geq \dots \geq \lambda_c \quad 34$$

la suma de todos los λ_j debe ser igual a la suma de las varianzas de las variables originales. A partir de estos autovalores calculamos los vectores

columna \mathbf{u}_j y con ellos queda ya calculada la matriz de transformación \mathbf{U} .

Las coordenadas de los datos en los nuevos ejes, Y , reciben el nombre de *scores*. Como \mathbf{U} es una transformación ortogonal es posible expresar linealmente las variables en función de los PC's y viceversa. Así:

$$x_{ij} = a_{j1}PC_{i1} + a_{j2}PC_{i2} + \dots + a_{jc}PC_{ic} \quad 35$$

Los coeficientes a_{jk} se denominan *loadings* e indican la contribución del componente principal PC_k a la variable original. Por tanto, los PC's calculados son combinaciones lineales de las variables originales y pueden no tener sentido físico.

Debido a que los primeros componentes principales contienen la mayor información sobre la variabilidad de los datos, siempre es posible descartar aquellos PC's que no contengan información significativa sobre los mismos, mediante ensayos adecuados. La contribución a la varianza total de cada PC viene dada por la expresión:

$$\%var = \frac{\lambda_j}{\sum_{j=1}^c \lambda_j} \quad 36$$

de forma que pueden escogerse los primeros PC's que expliquen la mayor parte de la varianza conduciendo a una disminución de la dimensionalidad.

Algunos criterios utilizados para seleccionar el número adecuado de componentes principales se enumeran a continuación:

- ❖ *Criterio de Kaiser* [115]: Este es uno de los más sencillos y más empleados. Admite que los datos están autoescalados y considera componentes principales explicativos aquellos cuyos autovalores correspondientes son mayores que la unidad. Es decir $\lambda > 1$.
- ❖ *Criterio de la proporción de la varianza explicada* [116]: Se deja en

cierto modo al criterio de cada uno, normalmente se escogen los PC's que expliquen hasta por lo menos un 70% de la varianza.

- ❖ *Criterio de las comunalidades* [116]: Según este método, nos quedamos con aquellos componentes principales cuyas *comunalidades* sean 0,8 nunca se escogen PC's de comunalidad menor de 0,6. Si se combina este criterio con el de Kaiser se obtienen muy buenos resultados.
- ❖ *Criterio de la función indicador (IND) de Malinowski* [117]: La expresión de dicha función es la siguiente:

$$IND = \frac{RSD}{(c - f)^2} \quad 37$$

donde RSD es la desviación estándar relativa, cuya expresión es:

$$RSD = \sqrt{\frac{\sum_{i=f+1}^c \lambda_i}{r(c - f)}} \quad 38$$

en la que f representa los componentes principales seleccionados. El numerador de la expresión representa la varianza del error y el denominador es una medida de los grados de libertad. Esta desviación estándar relativa es una medida de cómo se reproduce la matriz original cuando en lugar de los c componentes principales se usan sólo f PC's. El método consiste en ir variando f hasta que la representación gráfica de la función IND frente a f presente un mínimo, entonces ese valor de f es el número óptimo de PC's a seleccionar.

- ❖ *Criterio de la función F* [118]: También es debido a Malinowski, la función F viene representada por:

$$F = \frac{RSD_f^2}{RSD_{f+1}^2} \quad 39$$

según este criterio se van cogiendo componentes principales hasta que la varianza explicada por f PC's no sea significativamente mayor

a la explicada por $f+1$ PC's.

- ❖ *Método de la validación cruzada* [119]. Fue desarrollado por el químico sueco Wold a mediados de los años 70 y está basado en el algoritmo de mínimos cuadrados iterativos no lineales (NIPALS), que es un método iterativo para calcular PCs y lo hace ideal para su aplicación en una computadora. La validación cruzada consiste en eliminar un determinado porcentaje de los datos en la matriz \mathbf{X} y calcular los PC's. El criterio de bondad del ajuste consiste en calcular el valor del error residual predicho de suma de cuadrados (PRESS) que viene dado por:

$$PRESS_f = \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^c (x_{ij} - x_{ij}^*)^2 \quad 40$$

donde x_{ij} son los datos eliminados de la matriz y x_{ij}^* los predichos empleando f PC's. Si por ejemplo eliminamos la cuarta parte de los datos los cálculos serían los siguientes:

- 1.- Eliminar el 25% de los datos de \mathbf{X}
- 2.- Calcular el primer PC empleando NIPALS en ausencia del 25% de los datos
- 3.- Predecir los valores eliminados (x_{ij}^*)
- 4.- Restituir los datos eliminados y quitar ahora el 25% de otros diferentes y volver al paso 1 hasta un total de 4 veces (cualquier dato ha sido eliminado de la matriz alguna vez). Entonces calcular $PRESS_1$.

Repetir la secuencia calculando en el paso 2, 3, etc componentes principales y calcular $PRESS_f$. Un PC_f se considerará significativo cuando $PRESS_f/PRESS_{f-1}$ sea menor que la unidad. Una vez que han sido seleccionados los f componentes principales significativos, mediante alguno de los criterios indicados, podemos escribir las variables originales como:

$$x_j = a_{j1}PC_1 + a_{j2}PC_2 + \dots + a_{jf} PC_f + e_j \quad 41$$

el término e_j describe el error de ajuste para la variable x_j .

Como los f PC's son independientes, si aplicamos la ley de propagación de la varianza al modelo anterior, debido a esta independencia y a que $\text{var}(PC_k)=1$, se cumple que:

$$\text{var}(x_j) = a_{j1}^2 + a_{j2}^2 + \dots + a_{jf}^2 + \text{var}(e_j) \quad 42$$

Como las variables originales suelen estar autoescaladas, $\text{var}(x_j)=1$. La fracción de varianza de la variable explicada por los f componentes principales se denomina *comunalidad* y su expresión es:

$$\sum_{k=1}^f a_{jk}^2 \quad 43$$

mientras más se aproxime a 1 la comunalidad, mejor vendrá descrito el sistema por los PC's escogidos.

II.2.2. Biplots

Una vez realizado el análisis en componentes principales, una forma muy efectiva de visualizar las relaciones entre casos y descriptores es el uso de los biplots [120], en los que se representan tanto los *scores* de los objetos como las contribuciones de las variables (*loadings*) con respecto a los dos primeros PC's, que son los que explican mayor porcentaje de varianza. Las variables son vectores en el biplot y los objetos son puntos. Asimismo, la distancia euclídea entre dos puntos del biplot sería la distancia existente entre dos casos; por tanto, esta representación permite visualizar posibles agrupamientos de los casos así como la mayor o menor separación de las variables en el plano de los dos primeros componentes principales.

II. 3 Reconocimiento de patrones no supervisado

II.3.1. Análisis cluster

Un conjunto de objetos o patrones puede ser normalmente agrupado en clusters o grupos; llegar a escribir y localizar estos clusters ayuda a una mejor descripción de la estructura de los objetos. Se denomina CA al conjunto de métodos y técnicas que describen y localizan estas agrupaciones de acuerdo con su similaridad en el espacio patrón [121, 122]. Para llegar a agrupar los objetos en clases naturales, el análisis cluster utiliza el criterio de minimizar la desviación interna de los patrones de un mismo grupo, maximizando, por tanto, la distancia entre los diversos grupos. El CA lo que hace es comparar entre dos muestras mediante la distancia que hay entre ellas, la distancia más idónea a escoger es la distancia de Mahalanobis, o bien la distancia euclídea si los datos han sido previamente autoescalados.

Existen, básicamente, dos tipos de métodos de CA: métodos jerárquicos y métodos no jerárquicos, según se conozcan *a priori*, o no, los clusters a formar. La expresión visual más común de los primeros, que son los más utilizados a la hora de aplicar un CA, es el *dendograma*. Estos métodos tienen por objetivo agrupar clusters para formar uno nuevo hasta llegar a un solo grupo o bien separar clusters formando nuevos subconjuntos que salen del anterior. En base a esto, los métodos jerárquicos, se pueden subdividir a su vez en: métodos aglomerativos y métodos divisivos. En el primero se parte de n grupos, tantos como puntos había en el espacio patrón y se van uniendo hasta llegar a un cluster común que engloba todas las muestras, procediendo en cada nivel a fusionar aquellos dos grupos que sean más similares. Este concepto se puede apreciar en la figura 16.

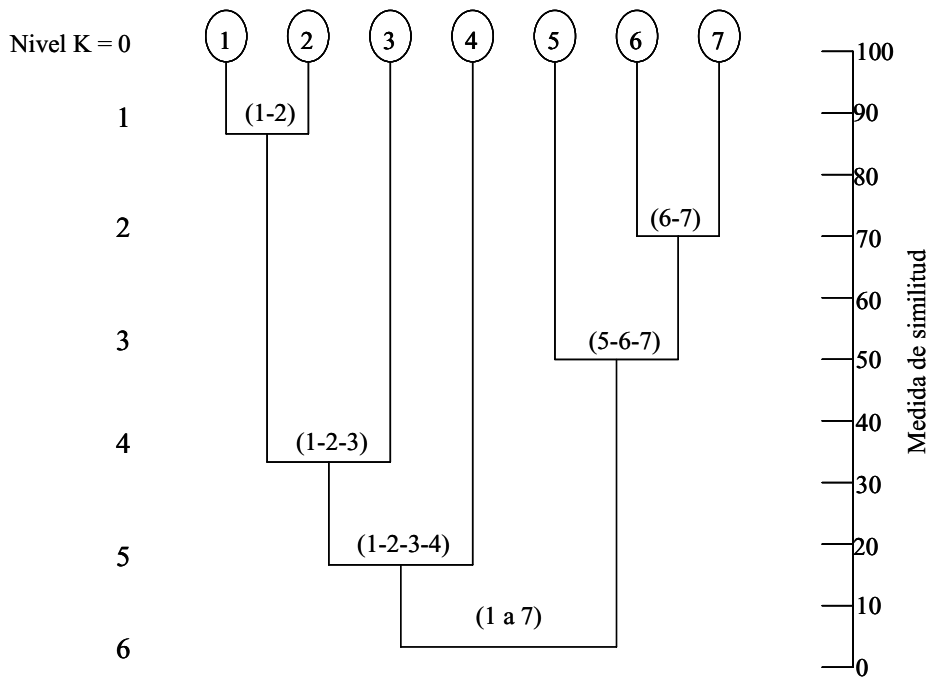


Figura 16. Aglomeración jerárquica de siete patrones en seis niveles.

En los segundos, se parte de un grupo formado por todos los casos en un nivel cero, en el siguiente nivel $K = 0$, en el siguiente nivel $K = 1$ se obtienen dos grupos repartiendo los objetos en base a maximizar sus divergencias. Se va procediendo de esta forma sucesivamente hasta conseguir n clusters correspondientes a todos los puntos del espacio. En la figura 17, se ofrece un ejemplo de este método.

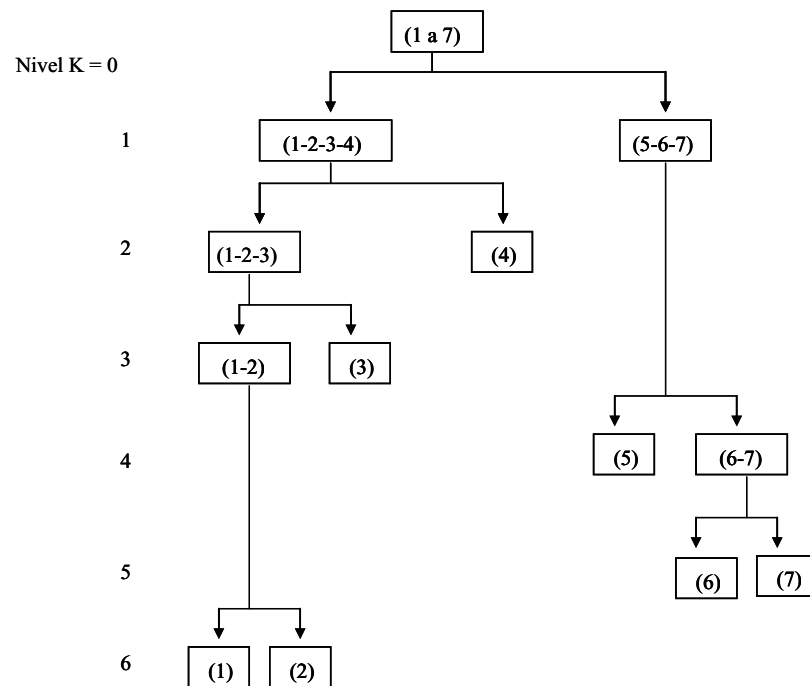


Figura 17. División jerárquica para siete patrones en seis niveles.

Se debe establecer una distancia umbral d_0 de la que va a depender la formación de clusters. Un valor muy pequeño se puede dar la posibilidad de que cada muestra forme un cluster, un valor muy grande hará que se forme un solo cluster y sólo un valor intermedio de d_0 proporcionará un número determinado de clusters.

II.4 Reconocimiento de patrones supervisado

Las técnicas de reconocimiento de patrones supervisadas suponen que se conoce *a priori* el número de clases así como la pertenencia a las mismas de cada uno de los miembros del conjunto de datos. Éste recibe el nombre de conjunto conocido (*known set*). La finalidad es diseñar y aplicar reglas de clasificación para predecir las clases a las que pertenecen un conjunto de muestras desconocidas (*unknown set*). El diseño del clasificador recibe el nombre de entrenamiento (*training*). Durante el entrenamiento, se utilizan dos subconjuntos del conjunto total, el conjunto de entrenamiento (*training set*) y el conjunto de evaluación (*evaluation/test set*) [123]. La regla de clasificación se elabora con el conjunto de entrenamiento y se comprueban sus predicciones con el conjunto de evaluación [124]. En esto consiste la validación (*validation*) de la regla de clasificación.

Para obtener estos dos conjuntos, el conjunto conocido se divide aleatoriamente en dos, que contenga alrededor de 25% y (100-25)% de las muestras de cada clase considerada. Una vez desarrollada la regla, se considera la eficacia en el reconocimiento (*recalling efficacy*) como el porcentaje de patrones del conjunto de entrenamiento correctamente clasificados, y especialmente, la eficacia en la predicción (*prediction ability*) correspondiente al porcentaje de patrones del conjunto de evaluación correctamente clasificados [125].

Otra modalidad para operar a la hora de determinar la facultad predictiva y cognitiva del clasificador es el llamado "método de dejar uno fuera" (*leave-one-out method*) [126]. En esta técnica, se parte del conjunto conocido completo y a continuación, se coge aleatoriamente uno de los objetos y se "deja fuera", es decir, él solo va a constituir el conjunto de

ensayo y el resto de casos formarán el conjunto de entrenamiento; se desarrolla la regla de clasificación y se contabilizan los casos que hayan quedado clasificados correctamente. Seguidamente, se repite el proceso de forma iterativa cada vez dejando un objeto distinto fuera (en el conjunto de ensayo); así se sigue, finalizando el proceso cuando se llega al último caso. La eficacia predictiva se calcula contabilizando los éxitos y fallos en clasificar cada patrón.

Sin embargo, estos índices empleados para validar la capacidad predictiva de la regla de clasificación pueden ser engañosos al no considerar el número de falsos positivos y falsos negativos de una clase determinada frente al “resto del universo”. Es por lo tanto más recomendable emplear términos como los de sensibilidad (sensitivity) y especificidad (specificity) [127, 128]. Podemos definir dentro de cada clase la sensibilidad (SENS) como la tasa de muestras de una clase determinada del conjunto de evaluación que han sido clasificadas correctamente y la especificidad (ESPEC) como la tasa de muestras de evaluación que no pertenecen a una clase determinada y que han sido correctamente asignadas a las otras clases. Consideremos una clase llamada A. Designemos por n_A al número de muestras del conjunto de evaluación que *a priori* sabemos que constituyen la clase A. Las muestras que no son de la clase A serán $\bar{n}_A = n - n_A$, siendo n el número total de muestras del conjunto de evaluación. Llamemos $\langle n_A \rangle$ al número de muestras del conjunto de evaluación de la clase A que han sido clasificadas como pertenecientes a la clase A y $\langle \bar{n}_A \rangle$ al número de muestras del conjunto de evaluación que no son de la clase A y que han sido clasificadas como “no-A”. De este modo podemos definir operativamente los términos SENS y ESPEC:

$$SENS = \frac{\langle n_A \rangle}{n_A} \quad 44$$

$$ESPEC = \frac{\langle \bar{n}_A \rangle}{\bar{n}_A} \quad 45$$

Podemos operar del mismo modo con parámetros derivados de los falsos positivos y negativos [129]. Tomaremos como verdadero positivos (true positive) $TP = \langle n_A \rangle$, falsos positivos (false positive) $FP = \bar{n}_A - \langle \bar{n}_A \rangle$, verdaderos negativos (true negative) $TN = \langle \bar{n}_A \rangle$ y falsos negativos (false negative) $FN = n_A - \langle n_A \rangle$. De este modo obtenemos que $TP + FN = n_A$, y $TN + FP = \bar{n}_A$, por lo tanto:

$$SENS = \frac{TP}{TP + FN} \quad 46$$

$$ESPEC = \frac{TN}{TN + FP} \quad 47$$

La validación de la regla de clasificación permite evitar los problemas derivados de fallos en el proceso de generalización durante el entrenamiento, conocidos como “sobre-entrenamiento” en los que se aprenden peculiaridades del conjunto de entrenamiento que conducen a fallos de reconocimiento en el conjunto de evaluación como mencionaremos con más profundidad más adelante.

Existe un nutrido elenco de métodos de clasificación por aprendizaje supervisado, que pueden clasificarse atendiendo a varios paradigmas. Uno de ellos es el de métodos de clasificación “duros” o *discriminativos* y “blandos” o de *clases modeladas* [130]. Se llaman técnicas *discriminativas* a las que clasifican las muestras en una serie de clases predefinidas en el conjunto de entrenamiento; esto es, un objeto o muestra futura necesariamente habrá de clasificarse en una de las clases

ya establecidas. Un procedimiento *discriminativo* típico es el LDA [131], aunque hay muchos más. Las técnicas basadas en el modelado de clases construyen fronteras no entre cada pareja de clases, sino entre cada clase y el resto del universo. La regla de decisión para una clase determinada es una caja multidimensional que envuelve a las muestras de dicha categoría en el espacio de los patrones, de manera que en este caso hay tres modos de clasificación:

- ◆ Un objeto se asigna a una clase si está situado dentro de los límites de una caja.
- ◆ Un objeto puede situarse dentro de la región de solapamiento de más de una caja, con lo cual será un objeto multiclásico.
- ◆ Un objeto puede situarse más allá de los límites de cualquier caja, con lo cual es el objeto aclásico, “anómalo”, un outlier.

Estas posibilidades se ilustran claramente en la figura 18, donde se observan dos cajas tridimensionales correspondientes a las clases 1 y 2, que contienen las muestras de entrenamiento con etiquetas “1” y “2” respectivamente, así como cuatro muestras de evaluación A, B, C y D.

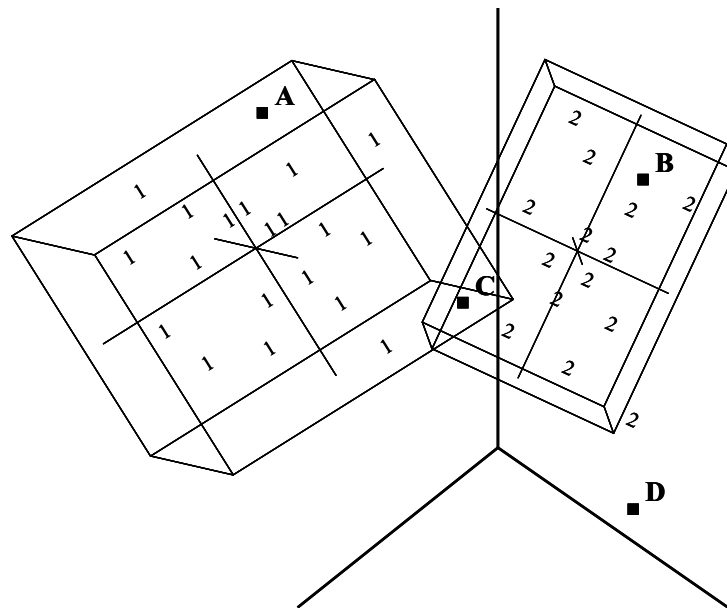


Figura 18. Cajas tridimensionales correspondientes a las clases 1 y 2.

El objeto A se asigna a la clase 1 y el B a la clase 2 porque se encuentran dentro de sus correspondientes cajas. El objeto C se asigna a ambas clases porque está ubicada en la zona en la que se superponen las dos cajas. El objeto D es atípico, no pertenece a la clase 1 ni a la clase 2.

El método más conocido de clasificación con modelado de clases es SIMCA, acrónimo de Soft Independent Modeling of Class Analogy o Statistical Isolineal by Independent Multicategory Analysis, desarrollado por Svante Wold a finales de los setenta [109, 132], pero existen otros, como varianza de clases desiguales (UNEQ) y reconocimiento de patrones por análisis independiente multicategoría (PRIMA) [133].

El segundo paradigma hace referencia a técnicas de clasificación *paramétricas* y *no paramétricas*. En los métodos *paramétricos* se utilizan estadísticos para el establecimiento de la regla de clasificación que

admiten la distribución normal de las muestras en las clases. Métodos como LDA y SIMCA son *paramétricos*. Otros como el KNN desarrollado en los años 50 por Fix y Hodges [134] y en general los algoritmos neuronales artificiales son *no paramétricos*.

Los métodos basados en el aprendizaje supervisado pueden dividirse en *paramétricos* y *no paramétricos*. Los primeros suponen que las funciones de densidad de probabilidad de las variables son conocidas o pueden estimarse, y se aplican ensayos estadísticos en la discriminación. Si pueden hacerse suposiciones razonables acerca de estas funciones de distribución, es posible estimar la probabilidad de una clasificación correcta o al menos el riesgo de fallo en la aplicación del clasificador. Desafortunadamente, la mayor parte de las veces no podemos hacer suposiciones dado el limitado conjunto de datos para el análisis. Por tanto, los métodos *no paramétricos* se emplean con mayor profusión. Estos últimos ignoran las funciones de distribución de las variables y realizan la clasificación empleando en general medidas de proximidad entre patrones. Seguidamente presentaremos una exposición de los métodos más utilizados que pertenecen a una de estas dos categorías.

El tercer paradigma corresponde a la naturaleza *lineal* o *no lineal* de las fronteras de las clases. LDA y SIMCA, de nuevo, son métodos que consideran una separación lineal bien entre clase y clase o bien entre una clase y el resto del universo.

II.4.1 Métodos paramétricos

Antes de comentar los distintos métodos utilizados, indicaremos los fundamentos estadísticos de la clasificación supervisada, que serían los

métodos puramente bayesianos. Consideramos el caso particular de dos clases I y II, cada caso x_{ij} está representado por un vector fila cuyas componentes son los contenidos en cada variable, para mayor simplicidad vamos a denominarlo \mathbf{x} . Se denomina probabilidad *a priori* de la clase I, $P(I)$, a la probabilidad de que, sin conocer el valor de las variables \mathbf{x} , un caso pertenezca a la clase I. Como sólo consideramos la existencia de dos clases, se cumple que $P(I)+P(II)= 1$. Se define *probabilidad condicional*, $P(\mathbf{x}/I)$, a la probabilidad de que los valores de las variables de un caso que pertenece a la clase I sean los componentes de \mathbf{x} . Según los axiomas de la probabilidad, se tiene que:

$$P(\mathbf{x}) = P(\mathbf{x}/I)P(I) + P(\mathbf{x}/II)P(II) \quad 48$$

Por otro lado, se define probabilidad *a posteriori* a la probabilidad de que el caso pertenezca a la clase I conocido el valor de sus variables \mathbf{x} . Según el teorema de Bayes:

$$P(I/\mathbf{x}) = P(\mathbf{x}/I)P(I)/P(\mathbf{x}) \quad 49$$

de forma análoga:

$$P(II/\mathbf{x}) = P(\mathbf{x}/II)P(II)/P(\mathbf{x}) \quad 50$$

de acuerdo con esta aproximación estadística [135], se puede considerar que la regla óptima de decisión, en el sentido que minimiza la probabilidad de error, es aquella que asigna el caso a la clase para la cual la probabilidad *a posteriori* es mayor, tal que si $P(I/\mathbf{x}) \geq P(II/\mathbf{x})$, el caso se asigna a la clase I.

En definitiva, el problema fundamental para un método bayesiano consiste en la determinación de los parámetros de la función de probabilidad $P(\mathbf{x}/I)$ y $P(\mathbf{x}/II)$ en base al conjunto de evaluación. En la mayoría de los casos, tal función no se conoce y es preciso efectuar su estimación. Esta función de probabilidad en muchos casos es multimodal, por ello, generalmente se recurre a otros sistemas no bayesianos como los

métodos *no paramétricos* y los métodos *paramétricos* basados en el cálculo de las denominadas funciones discriminantes (DF), como veremos a continuación.

II.4.1.1 Análisis discriminante lineal

Este es uno de los métodos supervisados más aplicado, el cual estima la probabilidad *a posteriori* de que un objeto pertenezca a una determinada categoría, creando funciones de decisión que separan las clases a las que pertenecen los objetos a partir del conjunto de entrenamiento. Consiste en encontrar las mencionadas funciones discriminantes lineales admitiendo que la separación entre categorías pueda realizarse mediante hiperplanos. Esta técnica se basa en los trabajos desarrollados por Fisher en el siglo pasado a finales de la década de los treinta [136, 137]. El procedimiento es encontrar combinaciones lineales de las variables, que van a ser las denominadas funciones discriminantes, tal que sea máximo el cociente:

$$F = \frac{S_B}{S_w} \quad 51$$

Para realizar el cálculo de las funciones discriminantes, previamente, se seleccionan las variables con mayor poder discriminatorio utilizando para ello criterios de selección sucesiva (*stepwise criteria*) de forma que se incluyen solo aquellas R variables que son verdaderamente relevantes para la discriminación [137].

Así, definíamos Λ de Wilks [111] como:

$$\Lambda = \frac{|S_w|}{|S_B|} \quad 52$$

los valores de Λ van desde 1 (ningún poder discriminante) hasta 0 (máximo

poder discriminatorio).

Análogamente, se define Λ *parcial de Wilks* como la medida de Λ para la contribución de una variable determinada en el modelo:

$$\Lambda_{parcial} = \frac{\Lambda (\text{despues de añadir la variable})}{\Lambda (\text{antes de añadir la variable})} \quad 53$$

este valor puede convertirse en un valor de F de la forma:

$$F = \frac{N - k - R}{k - 1} \cdot \frac{1 - \Lambda_{parcial}}{\Lambda_{parcial}} \quad 54$$

donde N es el número total de objetos, k es el número de clases y R el número de variables consideradas.

Si se van seleccionando las variables más discriminantes por un método "hacia delante" (*forward stepwise*), al comienzo, en el paso 0, no hay variables en el modelo y, por definición, $\Lambda=1$. Después de añadir la primera variable, se cumple que $\Lambda_{parcial}=\Lambda$.

De todas las variables, se selecciona como primera aquella cuyo valor de F tiene un menor nivel de significación (*p-level*). Se continúa añadiendo variables hasta que F presente un *p-level* por encima de un valor especificado de antemano (por ejemplo 0,05). Existe un método análogo pero esta vez se parte de todas las variables y se van eliminando una, atendiendo a su menor poder discriminante. Este último es el *backward selection*.

Una vez seleccionadas las R variables más significativas, se procede al cálculo de las funciones discriminantes, también denominadas variables canónicas [138] como combinación lineal de las R variables discriminantes de modo que las clases se observen lo más separadas posibles y se reduzca la dimensionalidad sin pérdida de diferenciación

entre dichas clases. Estas funciones constituirán los nuevos ejes donde mejor se contemplarían las diferencias entre categorías. Así, la expresión analítica de tales funciones es la siguiente:

$$f(x_1, x_2, \dots, x_R) = V_1 X_1 + V_2 X_2 + \dots + V_R X_R = V^T X \quad 55$$

En definitiva, estas funciones discriminantes son rotaciones en el espacio de las variables reducidas que generan combinaciones lineales que deben caracterizar bien una clase.

El objetivo de la técnica es calcular los vectores v^T para los que sea máximo el cociente:

$$F = \frac{v^T S_B v}{v^T S_w v} \quad 56$$

es decir, que los promedios entre cada categoría sean lo más diferentes entre sí y, por otra parte, que cada clase tenga la menor desviación interna.

Un ejemplo claro del problema a resolver se visualiza en la figura 19, para un caso bidimensional en el que ni la variable x_{1j} ni x_{2j} discriminan aisladamente las clases 1 y 2, ya que en ambos supuestos habría patrones mal clasificados. En cambio, la nueva variable $R_j = v_1 x_{1j} + v_2 x_{2j}$ permite la máxima separación de ambas clases, minimizando al mismo tiempo la desviación intraclase.

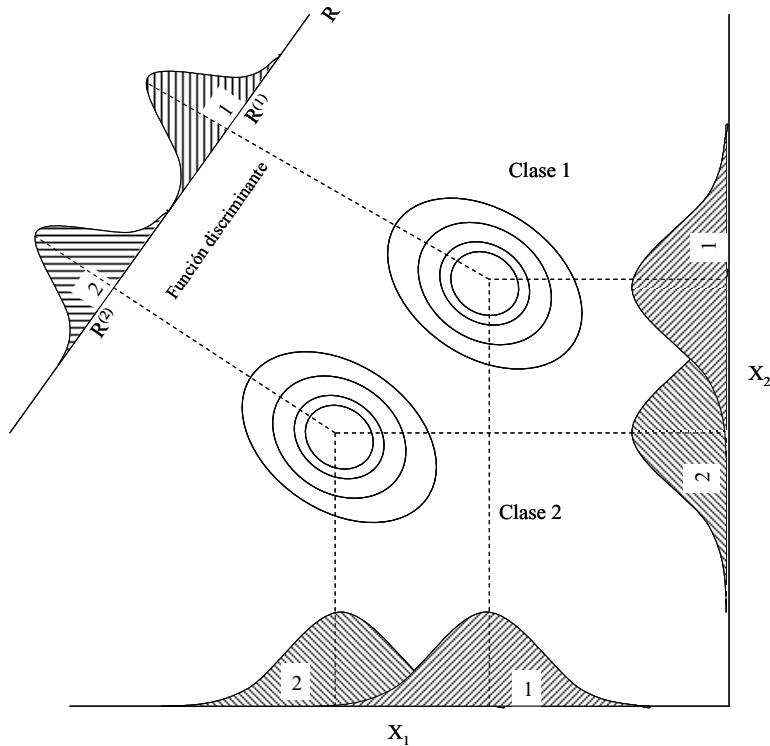


Figura 19. Desolapamiento de las funciones de distribución de probabilidad *a posteriori* para dos clases, empleando la función discriminante como nuevo eje.

El vector \mathbf{v} para el cual se maximiza la F será aquel para el cual la derivada primera sea nula:

$$\frac{\partial F}{\partial \mathbf{v}} = \frac{\partial (\mathbf{v}^T \mathbf{S}_B \mathbf{v} / \mathbf{v}^T \mathbf{S}_w \mathbf{v})}{\partial \mathbf{v}} = 0 \quad 57$$

realizando la derivada, se tiene:

$$\frac{\partial F}{\partial \mathbf{v}} = \frac{\mathbf{S}_B \mathbf{v} (\mathbf{v}^T \mathbf{S}_w \mathbf{v}) - (\mathbf{v}^T \mathbf{S}_B \mathbf{v}) \mathbf{S}_w \mathbf{v}}{(\mathbf{v}^T \mathbf{S}_w \mathbf{v})^2} = 0 \quad 58$$

luego debe cumplirse que:

$$\mathbf{S}_B \mathbf{v} (\mathbf{v}^T \mathbf{S}_w \mathbf{v}) - (\mathbf{v}^T \mathbf{S}_B \mathbf{v}) \mathbf{S}_w \mathbf{v} = 0 \quad 59$$

es decir, que:

$$\mathbf{S}_B \mathbf{v} - F \mathbf{S}_w \mathbf{v} = 0 \quad 60$$

llegando a la expresión:

$$S_w^{-1} S_B v = F v \quad 61$$

Es la típica ecuación de autovalores y autovectores. Así pues, habrá un número determinado de autovalores distintos de cero que corresponderán al número de funciones discriminantes para separar las categorías. Ese número, normalmente, es el mínimo entre el número de clases menos uno y el número de variables, es decir: $\min(k-1, R)$.

Por otra parte, se denomina *discriminant score* de un objeto x_i que pertenece a la clase k a la expresión:

$$DS_i^{(k)} = v^T x_i^{(k)} \quad 62$$

de esta forma, el objeto x_i se puede clasificar según su posición con respecto al nuevo eje f , comparando con los centroides de las clases existentes. Supongamos dos clases 1 y 2 cuyos centroides son respectivamente:

$$\overline{DS}^{(1)} \text{ y } \overline{DS}^{(2)}$$

entonces, el objeto x_i pertenecerá a la clase 1 si se cumple que:

$$|DS_i - \overline{DS}^{(1)}| < |DS_i - \overline{DS}^{(2)}| \quad 63$$

y en caso contrario, pertenecerá a la clase 2.

Ésta es una manera de clasificar objetos pero, generalmente en el LDA, se suelen calcular reglas de clasificación basadas en la estimación de las probabilidades *a posteriori* de la pertenencia de un objeto a una clase empleando estimación bayesiana.

De acuerdo con las definiciones de probabilidad *a priori*, probabilidad condicional y probabilidad *a posteriori*, y según el teorema de Bayes, se tiene que la probabilidad *a posteriori*, para un objeto x_i , de pertenecer a una clase c_k es:

$$P(c_k/x_i) = \frac{P(x_i/c_k) P(c_k)}{\sum_{j=1}^k P(x_i/c_j) P(c_j)} = \frac{P(x_i/c_k) P(c_k)}{P(x_i)} \quad 64$$

Normalmente, si se desea establecer la regla de clasificación por el método bayesiano, se suelen hacer tres suposiciones:

- 1) Las características x_{ij} son estadísticamente independientes, lo cual significa que la matriz de covarianzas es diagonal con todos los elementos de la diagonal iguales.
- 2) Las distribuciones $P(x_{ij}/c_k)$ siguen la ley de Gauss.
- 3) Estas distribuciones tienen la misma varianza y solo se diferencian en sus valores promedio $\mu_j(I)$ y $\mu_j(II)$.

Así:

$$P(x_i/c_1) = \frac{1}{(2\pi)^{R/2} \sigma_1 \sigma_2 \dots \sigma_R} e^{-\frac{1}{2} \left[\left(\frac{x_{i1} - \mu^{(1)}}{\sigma_1^{(1)}} \right)^2 + \dots + \left(\frac{x_{iR} - \mu_R^{(1)}}{\sigma_R^{(1)}} \right)^2 \right]} \quad 65$$

luego se puede reescribir la expresión anterior como:

$$P(x_i/c_1) = \frac{1}{(2\pi)^{R/2} (\det \Sigma)^{1/2}} e^{-\frac{1}{2} [(x_i - \mu^{(1)})^T \Sigma^{-1} (x_i - \mu^{(1)})]} \quad 66$$

donde:

$$\Sigma^{-1} = \begin{bmatrix} \sigma_1^2 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & \sigma_2^2 & 0 & 0 \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ 0 & 0 & 0 & \sigma_R^2 \end{bmatrix} \quad 67$$

en general:

$$P(x_i/c_1) = \frac{1}{(2\pi)^{R/2} (\det \Sigma)^{1/2}} e^{-\frac{1}{2} [(x_i - \mu^{(k)})^T \Sigma^{-1} (x_i - \mu^{(k)})]} \quad 68$$

tomando como función discriminante:

$$g(x_i)^{(k)} = \ln P(c_k) + \ln P(x_i/c_k) \quad 69$$

sustituyendo $P(x_i/c_k)$ por su expresión, queda:

$$g(x_i)^{(k)} = \ln P(c_k) - \frac{1}{2} (R \ln 2\pi + \ln (\det \Sigma)) - \frac{1}{2} (x_i^T - \mu^{(k)})^T \Sigma^{-1} (x_i - \mu^{(k)}) \quad 70$$

los dos primeros términos de la expresión anterior son independientes de la clase k, ya que se admite que las probabilidades *a priori* son iguales $P(c_j) = P(c_k)$ y Σ es común. Por tanto:

$$g(x_i)^{(k)} = -\frac{1}{2}(x_i - \mu^{(k)})^T \Sigma^{-1} (x_i - \mu^{(k)}) = -\frac{1}{2}D_i^{(k)^2} \quad 71$$

donde $D_i^{(k)}$ es la distancia de Mahalanobis del patrón x_i al centroide de la clase k. Operando, se tiene:

$$g(x_i)^{(k)} = -\frac{1}{2}x_i^T \Sigma^{-1} x_i + x_i^T \Sigma^{-1} \mu^{(k)} - \frac{1}{2}\mu^{(k)T} \Sigma^{-1} \mu^{(k)} \quad 72$$

el primer término de la expresión carece de poder discriminante, por lo que ésta se puede escribir como:

$$g(x_i)^{(k)} = x_i^T \Sigma^{-1} \mu^{(k)} - \frac{1}{2}\mu^{(k)T} \Sigma^{-1} \mu^{(k)} \quad 73$$

a esta expresión también se le denomina *classification score*, así:

$$CS_i^{(k)} = x_i^T \Sigma^{-1} \mu^{(k)} - \frac{1}{2}\mu^{(k)T} \Sigma^{-1} \mu^{(k)} \quad 74$$

En la práctica se emplea S_w , es decir, la varianza intraclass como una mejor estimación de Σ y, además, si llamamos $m^{(k)}$ a la expresión:

$$m^{(k)} = \frac{1}{r_k} \sum_{i=1}^{r_k} x_i^{(k)} \quad 75$$

el *classification score* queda:

$$CS_i^{(k)} = x_i^T S_w^{-1} m^{(k)} - \frac{1}{2}m^{(k)T} S_w^{-1} m^{(k)} \quad 76$$

ésta es la *función de clasificación de Fisher* por la que cada objeto x_i se asigna a la clase k para la cual la función de clasificación $SC_i^{(k)}$ presente el mayor valor.

II.4.1.2 Modelado suave de análisis independiente por analogía de clases

Esta técnica supervisada de reconocimiento de patrones es un procedimiento blando de modelización, ya que puede que algún objeto no se clasifique dentro de alguna de las categorías existentes, es decir, lleva a cabo el nivel 2 del reconocimiento de patrones. Así, el método SIMCA [94, 106, 119, 139-146] asocia a cada clase conocida un modelo matemático individual de tal forma que cada patrón desconocido se compara con cada uno de los modelos establecidos para comprobar si se ajusta a alguno de ellos, perteneciendo entonces a dicha categoría, o bien pertenece a otro tipo de distribución constituyendo en ese caso un *outlier* con respecto a las clases conocidas en el conjunto de entrenamiento.

SIMCA divide la matriz de datos original en submatrices correspondientes a cada una de las k categorías y realiza un PCA por separado para cada una de las clases del conjunto de entrenamiento [147]:

$$X^{(k)} = Y^{(k)} U^{T(k)} = y_1^{(k)} u_1(k) + y_2^{(k)} u_2(k) + \dots \quad 77$$

mediante el método de la validación cruzada y empleando el algoritmo NIPALS, explicado en el apartado II.2.1., se seleccionan f PC's explicativos de la mayor parte de la varianza de los datos para cada clase; así, se tiene:

$$X^{(k)} = \sum_{i=1}^{f(k)} y_i^{(k)} u_i^{T(k)} + E \quad 78$$

donde E es la matriz error que contabiliza los residuales de cada caso, es decir, la diferencia entre los datos originales y la estimación del modelo. La varianza residual para la clase K con r_k objetos es:

$$s_k^2 = \frac{ss}{(r_k - f^{(k)} - 1)(v - f^{(k)})} \quad 79$$

donde v es el número de variables originales y ss viene dada por la expresión:

$$SS = \sum_{i=1}^{r_k} \sum_{j=1}^f e_{ij}^2 \quad 80$$

para un elemento cualquiera, se tiene:

$$x_{kl}^{(k)} = \sum_{a=1}^{f^{(k)}} y_{ka}^{(k)} u_{al}^{(k)} + \varepsilon_{kl} \quad 81$$

se calcula el valor estimado para x_{kl} según el modelo PCA realizado para la clase k y se evalúa el error de ajuste. Esto se repite para cada uno de los elementos en cada una de las clases.

Una vez evaluados los errores, la varianza para el elemento q será:

$$s_q^2 = \frac{\sum_{j=1}^v \varepsilon_{qj}^2}{v - f^{(k)}} \quad 82$$

si s_q^2 es de la misma magnitud que s_k^2 , el objeto q se considera miembro de la clase k. El criterio F de Fisher proporciona una medida cuantitativa para dicha clasificación:

$$F = \frac{s_q^2}{s_k^2} \quad 83$$

al emplear un criterio F para establecer la pertenencia de un objeto a la clase considerada, el método SIMCA es evidentemente paramétrico.

II.4.2 Métodos no paramétricos

II.4.2.1 Método de los K vecinos más próximos

El KNN es un método empírico en el que un caso desconocido se clasifica de acuerdo con el "voto" de clase de sus K vecinos más próximos en el conjunto de aprendizaje de un espacio multidimensional [148]. Se

basa en la proximidad del objeto nuevo a los objetos del conjunto de entrenamiento. Clasifica al objeto nuevo en la categoría a la que pertenecen sus k vecinos más próximos, siendo k un valor arbitrario normalmente bajo e impar [149]. Así, tenemos un objeto \mathbf{x}_i , un número de muestras totales n y un número K de vecinos que van a utilizarse para clasificar. La elección del número K óptimo puede realizarse según la recomendación de Duda y Hart [150], quienes afirman que K debe ser igual a $n^{1/2}$. Otro criterio es seleccionar K por un procedimiento de "dejar uno fuera", generalmente, K es un número impar. Para un conjunto de datos de tamaño limitado $K=1$ puede ser una buena elección, sin embargo en el caso de tener clases solapadas $K=3$ ó $K=5$ mejora considerablemente la habilidad de predicción. En definitiva una vez establecido el número de vecinos que van a decidir, el método consiste en ir calculando las distancias euclídeas de cada caso \mathbf{x}_i a los K vecinos más próximos de cada clase. El objeto \mathbf{x}_i queda clasificado dentro de aquella categoría que presenta una mayor proximidad con respecto a las K muestras que han dado su voto.

II.5 Redes neuronales artificiales

A lo largo de la historia, el principal problema de los investigadores ha sido buscar la forma de obtener los datos para que produzcan información. En la actualidad debido al desarrollo sufrido por las técnicas instrumentales, la problemática dentro del campo de la quimiometría no es ya la forma de obtener los datos, sino cómo rechazar toda la información superflua y seleccionar solamente aquellos datos verdaderamente relevantes de un experimento específico. En este marco se incluyen las denominadas redes neuronales, consistentes en algoritmos puramente matemáticos que trabajan, tal y como indica su nombre, mimificando el funcionamiento del cerebro humano.

Como veremos, el funcionamiento de estos métodos no radica tanto en el término "neuronal" sino en cómo están interconectadas esas neuronas artificiales, es decir, en la arquitectura de la "red". La gran diferencia del empleo de las redes neuronales en relación con otras aplicaciones de la computación radica en que no son algorítmicas, esto es, no se programan haciéndoles seguir una secuencia predefinida de instrucciones. Ellas mismas generan sus propias "reglas" para asociar la respuesta a su entrada; es decir, aprenden por ejemplos y de sus propios errores. Las redes neuronales artificiales han sido objeto de gran número de aplicaciones, básicamente centradas en el reconocimiento de imágenes. Dentro del campo químico hoy día son numerosísimos los artículos publicados en el Chemical Abstract que emplean las redes neuronales para la resolución de problemas (control de procesos, optimización, clasificación, elucidación de estructuras...). Dentro de la extensa cantidad de textos relativos a las redes neuronales en quimiometría, cabría subrayar por su carácter formativo las aportaciones excepcionales de Bishop [151] y Zupan y Gasteiger [152].

En principio, podemos considerar la red neuronal como una caja negra que acepta una serie de datos de entrada y proporciona uno o más datos de salida. En el interior de dicha caja existen unidades básicas conectadas unas con otras llamadas *neuronas*.

Las entradas pasan a través de estas conexiones, que son las líneas de la red, transformándose y distribuyéndose en cada una de estas neuronas de forma que producen una o varias salidas. Los datos de entrada son m-dimensionales, siendo la salida n-dimensional. Normalmente, se utilizan redes en las que los datos de salida tienen una dimensión menor que los de entrada.

Las redes neuronales tienen varias aplicaciones, tal como la *autoasociación*, es decir, el sistema es capaz de reconstruir un dato de salida correcto a partir de un dato de entrada incompleto. *Heteroasociación*, cuando el sistema realiza asociación uno a uno entre los miembros de dos conjuntos de patrones. También se utiliza en *clasificación*, asignando a los objetos una clase en base a una o varias propiedades que caracterizan a una determinada clase. *Transformación*, que es cuando la red lleva a cabo la transformación de datos del espacio multivariante a otro tipo de datos. Finalmente, otra aplicación de las redes es la *modelización*, la cual consiste en buscar una función analítica o "modelo" que proporcione unos datos de salida n-dimensionales para una entrada m-dimensional.

II.5.1 Neuronas y redes

Las redes neuronales artificiales son modelos matemáticos con una similitud muy superficial a las redes neuronales biológicas. La sinapsis que

realizan las neuronas biológicas implica la acción de los neurotransmisores que modifican la señal que se transmite. En neurobiología, a esta modulación se le denomina fuerza sináptica. En el caso de las neuronas artificiales, la fuerza sináptica se denomina *peso* (w). La fuerza sináptica determina la cantidad de señal que entra en el cuerpo de una neurona a través de las dendritas. Los cambios en la fuerza sináptica, incluso entre dos impulsos consecutivos, constituyen un mecanismo vital para el correcto funcionamiento del proceso de aprendizaje. Este proceso de aprendizaje en la red no es más que un cierto número de cambios en los valores de los pesos. Por tanto, si designamos la señal de entrada como s_i ($i=1, \dots, m$), que actúa sobre los pesos w_i , la señal de entrada global será una función de todas las s_i que llegan en cada momento y de todos los pesos w_i , es decir, la señal global o neta (Net) va a ser una suma de los productos $w_i s_i$. Esta idea se representa en la figura 20:

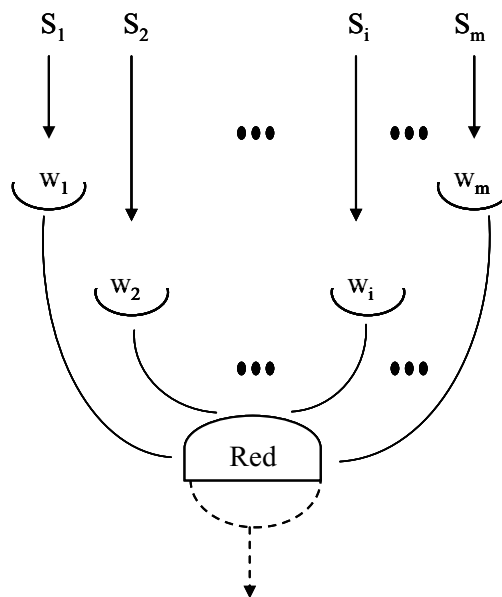


Figura 20. Cálculo de la señal de entrada global a una neurona artificial.

La expresión analítica de la señal Net es:

$$Net = W_1 S_1 + W_2 S_2 + \dots + W_m S_m \quad 84$$

Es conveniente combinar todas las señales s_i en un vector de

entrada \mathbf{X} , cuyas componentes van a ser las s_i . Así:

$$\{S_1, S_2, \dots, S_m\} = \mathbf{X} (X_1, X_2, \dots, X_m) \quad 85$$

análogamente, las fuerzas sinápticas se escriben en forma de un vector de pesos \mathbf{W} :

$$\mathbf{W} = (W_1, W_2, \dots, W_m) \quad 86$$

de manera que la función Net será el producto escalar de los dos vectores \mathbf{W} y \mathbf{X} :

$$Net = \mathbf{W} \mathbf{X} \quad 87$$

generalmente, se añade un *off-set* adicional llamado *bias*:

$$Net = \mathbf{W} \mathbf{X} + \theta \quad 88$$

la adición de este término permite una mayor adaptabilidad para el aprendizaje. Por tanto, la expresión final de la función Net será:

$$Net = \sum_{i=1}^m W_i X_i + \theta \quad 89$$

Todo proceso de aprendizaje implica, como se indicó anteriormente, el cálculo del vector de pesos óptimo que proporcione decisiones correctas. Para evaluar este vector \mathbf{W} se utiliza la denominada *Regla Delta*.

Inicialmente, el vector de pesos se escoge al azar y se calcula Net para un objeto determinado \mathbf{X} , si no se ha obtenido un resultado correcto, deberá modificarse \mathbf{W} en cierta extensión:

$$\Delta \mathbf{W} = \mathbf{W}^{(\text{nuevo})} - \mathbf{W}^{(\text{viejo})} \quad 90$$

esta modificación es proporcional a una determinada cantidad δ del vector de pesos \mathbf{W} :

$$\Delta \mathbf{W} \propto \delta \mathbf{X} \quad 91$$

por tanto, δ se puede expresar como:

$$\delta = \eta \left(\frac{\Delta \mathbf{W}}{\mathbf{X}} \right) \quad 92$$

donde η es una constante de proporcionalidad llamada factor de aprendizaje. La ecuación estándar para la regla delta es:

$$\Delta W = \eta \delta X \quad 93$$

Al principio del proceso de aprendizaje, es conveniente mantener $\eta=1$ y conforme va aumentando el tiempo de cálculo, mejorándose el aprendizaje, es aconsejable ir reduciendo el valor de η . Una vez obtenido **W** y calculada Net, hay que transformar de forma no lineal esta función Net de forma análoga al comportamiento biológico. Esta modificación de Net para calcular la salida de la neurona se denomina *Función de transferencia (Sal)*:

$$Sal = f (Net) \quad 94$$

Esta función de transferencia debe cumplir tres requisitos: no ser negativa, debe ser continua y estar confinada dentro de un determinado rango y debe ser derivable.

Dentro de las funciones matemáticas que cumplen dichas características, una de las más empleadas en numerosas aplicaciones de redes neuronales es la siguiente:

Función sigmoidea (sf): la expresión analítica de esta función es:

$$sf (Net) = \frac{1}{1 + \exp (- Net)} \quad 95$$

Una de las ventajas que presenta esta función de transferencia es que el cambio de pendiente es mucho más suave que para otras funciones, además la zona de cambio es la de máximo aprendizaje. Una ventaja adicional es que la derivada de la función contiene a la propia función.

Con lo explicado hasta ahora, ya tenemos definida la unidad básica o neurona artificial. El modelo de red debe procesar la información de forma paralela. La señal de entrada debe adecuarse al conjunto de neuronas conectadas en la red, por lo tanto, la señal de entrada debe atacar a todas las neuronas a la vez, cada una de ellas con sus propios vectores de pesos, **W**, y señales de salida (Sal). Al grupo de neuronas que reciben el mismo conjunto de señales de entrada **X** y producen otras tantas salidas simultáneamente se les denomina *capa*. Todas las neuronas de la misma capa deben tener la misma dimensión. Como cada neurona j produce su propia función Net_j y su correspondiente señal de salida Sal_j , cada señal individual de una misma capa se puede englobar en los respectivos vectores **X**, **Net** y **Sal**. El vector de salida **Sal** de una capa será el vector de entrada **X** de la siguiente capa de neuronas en la arquitectura multicapa.

II.5.2. Aprendizaje no supervisado

Las redes neuronales biológicas están dotadas de la facultad de aprender a partir de la experiencia y adaptarse a entornos nuevos con extrema facilidad. Esta capacidad de aprendizaje se debe a la aptitud del organismo de modificar la permeabilidad sináptica entre neuronas, lo cual incide en el poder que una neurona tiene de excitar a otra con la que está conectada y por tanto, en la facilidad de propagación de los impulsos electroquímicos por el entramado de la red.

La capacidad de modificación de la permeabilidad sináptica puede estar regida por dos mecanismos diferentes, que dan lugar a los grandes bloques en que pueden dividirse las redes neuronales artificiales: sistemas supervisados y no supervisados.

Los algoritmos neuronales con aprendizaje no supervisado son capaces de modificar sus parámetros internamente, adaptándose al entorno de la mejor manera posible. Se trata básicamente de que la red debe descubrir por sí sola características, correlaciones o categorías de los datos de entrada y obtenerlas de forma codificada a la salida. Se puede afirmar, por tanto, que estas unidades y conexiones muestran cierto grado de autoorganización. Uno de los modelos más característicos de redes no supervisadas es el de mapas autoorganizados de Kohonen [153]. No describiremos este modelo en la memoria ya que no ha sido aplicado.

II.5.3 Aprendizaje supervisado

En los sistemas de aprendizaje supervisado, se dispone de algún tipo de información que permite decidir cuándo dejar de aprender, con qué intensidad aprender o cada cuánto tiempo hacerlo. Es posible también manejar cierto tipo de información de error que permite ponderar la rectificación que debemos introducir en la red.

En 1986, Rumelhart et al. [154] basándose en los trabajos de otros investigadores [155, 156] idearon un método para que una red neuronal "aprendiera" la asociación existente entre los patrones de entrada a la misma y las clases correspondientes empleando varias capas de neuronas. Este método es conocido como *backpropagation* o retropropagación y está basado en la regla delta. Inicialmente, el análisis cuantitativo de datos químicos se realizó exclusivamente en análisis de regresión multilinear. Sin embargo, con el tiempo se reconoció que debido a la diversidad y la complejidad de los datos químicos se necesitaba una amplia gama de métodos y de mayor alcance para el análisis de datos. Los métodos del reconocimiento de patrón fueron

introducidos para analizar datos químicos. En los años noventa, las redes neuronales artificiales fueron ganando terreno para el análisis de datos químicos [152, 157].

II.5.3.1. Aprendizaje por retropropagación

La principal ventaja de un aprendizaje por retropropagación es que la corrección de los pesos está muy bien definida, dicha corrección empieza a ser aplicada a los pesos de la última capa (capa de salida) continuando hacia atrás hasta llegar a la capa de entrada. Seguidamente, en la figura 21, se muestra un esquema de dicha corrección.

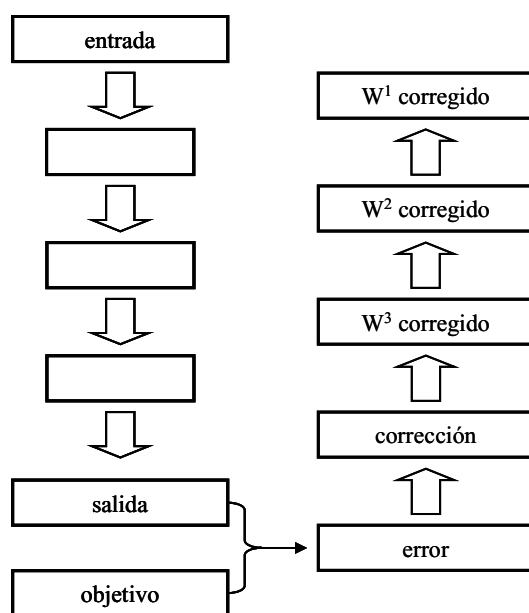


Figura 21. Corrección de pesos en el aprendizaje por retropropagación.

La arquitectura de la red de retropropagación, es decir, el número de capas, número de neuronas en cada capa y la forma en la que se conectan estas neuronas es muy flexible. Generalmente, las capas de neuronas están conectadas de forma total. El número de capas así como el número de neuronas en cada capa depende de la aplicación para la cual se esté

desarrollando la red y, normalmente, se determina por ensayo-error. No obstante, en lo referente a esta cuestión existen diversas recomendaciones en la bibliografía, entre ellas que el número de pesos total no supere el número de objetos introducidos en la red, o bien que el número de pesos sea aproximadamente igual al número de objetos en el conjunto de entrenamiento; por otra parte, también suele ser aconsejable que, en la capa oculta, haya un número menor de neuronas que en la capa de entrada.

En la mayoría de los casos, una red de retropropagación consiste en una capa de entrada con tantas neuronas como componentes tenga la señal de entrada (\mathbf{X}) y dos capas activas, la capa oculta y la capa de salida.

El método de aprendizaje es supervisado debido a que necesita de un conjunto predefinido de parejas de entradas consistentes en objetos (\mathbf{X}) junto con unos objetivos o *targets* asociados (\mathbf{T}). Durante el proceso de entrenamiento, se ajustan los pesos de la red con el fin de que las entradas introducidas produzcan las salidas deseadas.

Antes de comenzar el entrenamiento, es conveniente inicializar los pesos a pequeños valores elegidos al azar con lo cual se asegura, por una parte, que la red no se sature con valores grandes de los pesos y por otra, que se comience en un punto aleatorio de la superficie de error.

Los pasos seguidos en el entrenamiento son:

1. Elegir dos conjuntos de objetos de entrada y de objetivos e introducir el primer vector de entrada (\mathbf{X}) en la red.
2. Calcular la salida de la red.
3. Calcular el error entre la salida de la red y la salida deseada (objetivo).

4. Modificar los pesos de la red con el fin de minimizar el error, empleando la Regla Delta.
5. Se repiten los pasos anteriores para cada vector del conjunto de entrenamiento hasta disminuir convenientemente el error.

Las neuronas de la capa de entrada actúan como *buffers* de entrada de los datos, los cuales son ponderados por cada una de las neuronas de la capa. La siguiente capa, capa oculta, recibe las salidas ya ponderadas de la capa de entrada, suma todas las entradas en cada neurona y pasa dicha suma a través de la función de transferencia. El resultado obtenido se pondera y pasa hacia la capa de salida donde se repite el proceso de suma y transformación. El valor de la función de transferencia de la capa de salida constituye la respuesta de la red del objeto introducido.

El proceso de entrenamiento se realiza de forma iterativa introduciendo en la red todos los miembros del conjunto de parejas conocido objeto-objetivo (conjunto de entrenamiento). Cada paso del conjunto completo se denomina época (*epoch*). El aprendizaje termina cuando no se mejora la diferencia entre la salida de la red y el objetivo correspondiente al objeto, o bien, cuando se llega a un número determinado de épocas. Cuando la función de transferencia empleada es la sigmoidea, el error en la capa de salida viene dado por:

$$\delta_{kl} = (t_{kl} - sal_{kl}) sal_{kl} (1 - sal_{kl}) \quad 96$$

donde δ_{kl} es el error para el objeto k en la salida de la neurona l, t_{kl} es el valor de *target* u objetivo correspondiente al objeto k y sal_{kl} es la salida del objeto k en la neurona l. El error en la neurona j de la capa oculta cuando se utiliza la función sigmoidea es:

$$\delta_{kj} = sal_{kj} (1 - sal_{kj}) \sum_{l=1}^L \delta_{kl} w_{lj} \quad 97$$

Los errores de la capa oculta se propagan hacia atrás por la red

corrigiendo los pesos según la regla delta, así:

$$\Delta w_{ji}(n) = \eta \delta_{kj} sal_{ki} + \mu \Delta w_{ji}(n-1) \quad 98$$

donde Δw_{ji} es la corrección de pesos entre la neurona j de la capa oculta y la neurona i de la capa de entrada, η es la velocidad de aprendizaje y μ se denomina momento y es un parámetro utilizado para salir de los mínimos locales. El término n se refiere a la iteración actual y el término $n-1$ a la iteración anterior.

Durante el entrenamiento de la red, los objetos pueden introducirse al azar para, de esta forma, evitar posibles tendencias o desviaciones de la red, debido a que ésta puede memorizar el conjunto de aprendizaje extrayendo dependencias. Otra cuestión importante es la normalización de los objetos de entrada para que no se produzca desbordamiento de la red neuronal. Este tipo de aprendizaje con esta red es muy adecuado para clasificación de objetos. Para estos casos, el número de neuronas de la capa de salida se hace coincidir con el número de clases existentes y los objetivos asociados a los objetos de entrada serán las clases a las cuales pertenecen dichos objetos. En la mayoría de los casos, es aconsejable escalar los objetivos entre valores 0 y 1.

II.5.3.2 Perceptrones multicapa

Las arquitecturas de la red MLP pueden aproximar su salida a cualquier función continua con la única condición de que presenten alimentación hacia delante (feed-forward) sin bucles de retro-alimentación, ya que esto asegura que la salida de la red pueda ser calculada como una función explícita de las entradas X y los pesos W . Un MLP consiste en neuronas artificiales y conexiones (pesos) entre ellas como se presenta en la figura 22. Las neuronas se disponen en capas:

- ◆ *Capa de entrada (input layer)*: es la capa que recibe directamente la información proveniente de las fuentes externas de la red, los datos de entrada. Es una capa no activa.
- ◆ *Capas ocultas (hidden layer)*: son internas a la red y no tienen contacto directo con el entorno exterior. El número de niveles ocultos puede estar entre cero y un número elevado. Las neuronas de las capas ocultas pueden estar interconectadas de distintas maneras, lo que determina, junto con su número, las distintas topologías de redes neuronales.
- ◆ *Capa de salida (output layer)*: transfiere información de la red al exterior.

Las capas adyacentes están completamente conectadas, pero no existen conexiones entre neuronas de la misma capa [158]. Siendo diferenciable la función de transferencia, es posible aplicar un método computacional muy efectivo, llamado retropropagación de errores para llevar a cabo el entrenamiento de la red. Dicho método de aprendizaje o entrenamiento ha sido explicado en el apartado II.5.3.1.

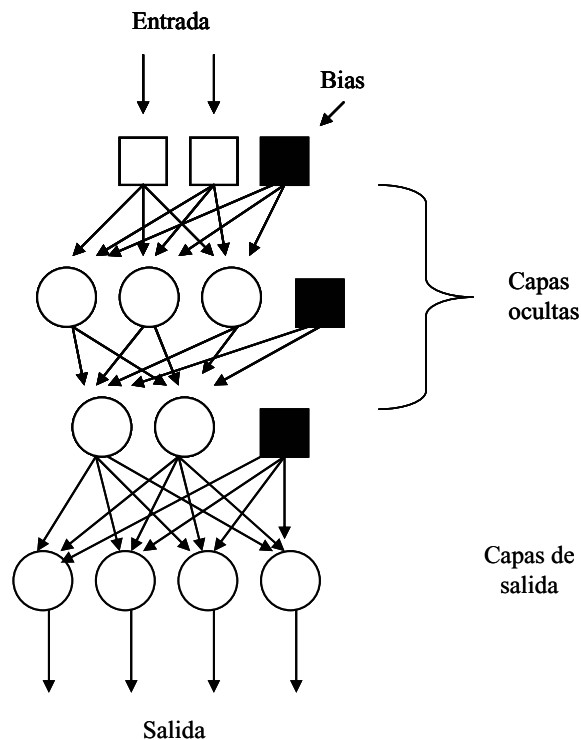


Figura 22. Perceptrón multicapa con una red neuronal de estructura 2x3x2x4.

Sea cual fuere la arquitectura de una red neuronal, se debe cumplir que a todas las neuronas de una misma capa les ha de llegar igual número de entradas, incluyendo una entrada adicional (*bias*). Además, el número de pesos en cada neurona viene fijado por el número de señales procedentes de la capa anterior.

Hasta el momento, hemos representado gráficamente la red neuronal como capas de círculos (neuronas) interconectados mediante flechas de una capa a la siguiente, indicativas de la dirección de flujo de las señales. Desde el punto de vista matemático, una representación matricial es mucho más precisa y explícita. Vamos a considerar una capa de n neuronas, cada una de ellas con un vector de pesos de m -dimensional, por lo que tendremos una matriz de pesos \mathbf{W} . para una red multicapa, cada

elemento de esta matriz de pesos **W** tendrá un superíndice indicativo de la capa a la cual pertenece y un subíndice j representativo de su neurona correspondiente (w_{ji}^l). Para aplicar una señal de entrada m-dimensional a una red neuronal con una capa de n neuronas, cada una de ellas con m pesos, tendremos que multiplicar un vector **X** ($x_1, x_2, \dots, x_{m-1}, 1$) por una matriz de pesos **W** de dimensión nxm. El resultado será un vector **Net** ($Net_1, Net_2, \dots, Net_n$).

$$Net_j^l = \sum_{i=1}^m w_{ji}^l x_i^l \quad 99$$

Empleando una notación extendida, cada componente Net_j para una capa l se calcula como: para $j=1, 2, \dots, n$. En forma matricial:

$$Net = (Net_1, Net_2, \dots, Net_j, \dots, Net_n) =$$

$$= \begin{bmatrix} w_{11} & w_{12} & \dots & w_{1m} \\ w_{21} & w_{22} & \dots & w_{2m} \\ \cdot & \cdot & w_{ji} & \cdot \\ w_{n1} & w_{n2} & \dots & w_{nm} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} x_1 \\ x_2 \\ \cdot \\ \cdot \\ x_i \\ \cdot \\ \cdot \\ x_{m-1} \\ 1 \end{bmatrix} \quad 100$$

Para una red multicapa, se cumple que la señal de entrada de la capa l es la salida de la capa l-1:

$$X^l = Sal^{l-1} \quad 101$$

por tanto, puede escribirse:

$$Net_j^l = \sum_{i=1}^m w_{ji}^l sal_i^{l-1} \quad 102$$

para $j=1, 2, \dots, n$. La señal de salida de la capa l se obtiene a partir de Net^l mediante la señal de transferencia, en el caso de utilizar la función

sigmoidea:

$$Sal^l = sf (Net^l)$$

103

II.5.3.3 Sobreentrenamiento

Un MLP con una capa de entrada, una interna y otra de salida, basta para aproximar cualquier función continua arbitraria según el teorema de Kolmogorov, de modo que las fronteras inter-clásicas pueden modelarse mediante estas redes neuronales. Una característica especial que justifica el impacto de las redes neuronales en el modelado de fronteras es su “parsimonia”, esto es: Las redes neuronales producen mejores resultados que otras aproximaciones con el mismo número de parámetros. Cualquier MLP con una capa oculta y funciones de transferencia sigmoideas se comporta como parsimonioso. El número de neuronas de la capa oculta indica la complejidad de la relación de manera muy similar al grado de ajuste polinomial a una curva. Siempre es posible construir un modelo parametrizado que ajuste perfectamente los datos tomando un número suficiente de parámetros. Imaginemos un conjunto de datos (X) divididos en subconjuntos de entrenamiento y evaluación que pretenden ajustarse a una serie de respuestas (Y), posteriormente, realizamos el ajuste con el conjunto de entrenamiento y con la función ajustada, predecimos los resultados del subconjunto de evaluación. En la figura 23 se muestra la curva de ajuste obtenida con los objetos de entrenamiento, que presenta la generalización adecuada para predecir los objetos de evaluación. Si utilizamos un polinomio de mayor grado, podemos llevar a cabo el ajuste (sobre-parametrizado) de manera que pase exactamente por todos los objetos de entrenamiento.

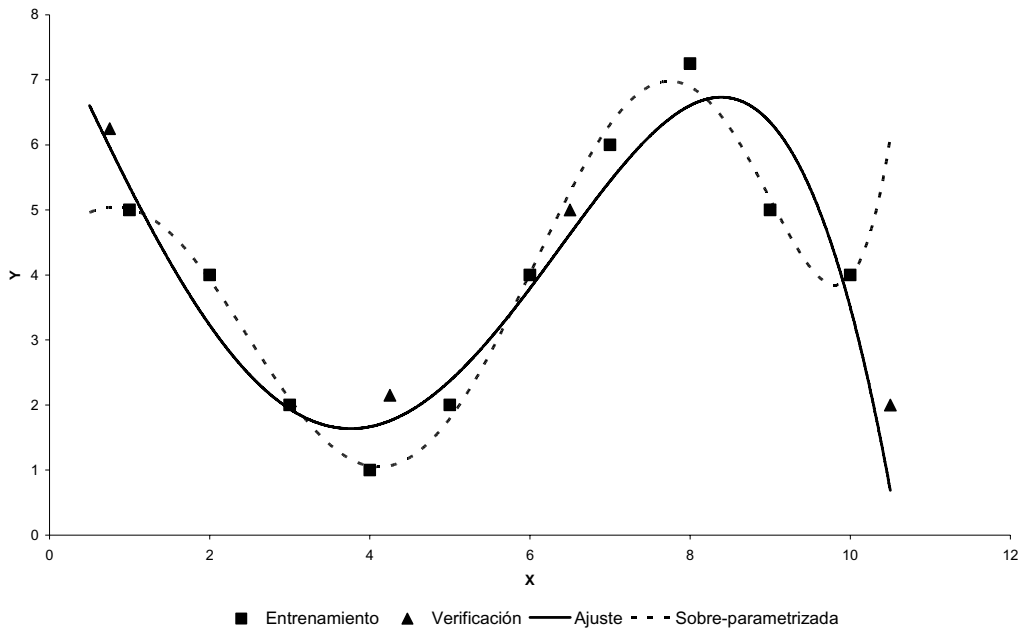


Figura 23. Sobre entrenamiento de objetos de entrenamiento y evaluación.

El modelo obtenido produce resultados muy malos con los datos que no se han utilizado en el entrenamiento. Este fenómeno se llama sobreentrenamiento y puede observarse fácilmente cuando se usa una red neuronal con muchas conexiones (pesos). Por lo tanto, la función global de la red será demasiado compleja para una solución razonable. En tal caso, hay riesgo de especialización en el entrenamiento, que resultará en una capacidad predictiva muy pobre para el conjunto de evaluación. La mejor aproximación para realizar el modelado de la regla de clasificación es construir la red con el menor número de conexiones compatibles con la fiabilidad de la predicción. Para ello es fundamental que los vectores de entrada tengan el menor número de componentes y que la capa oculta tenga un número mínimo de neuronas. Las componentes de cada muestra de entrada son los valores de las variables que caracterizan la misma. Pero en muchos casos las variables establecidas pueden ser redundantes o irrelevantes a la regla de

clasificación, con lo cual es fundamental realizar una selección previa de las variables. Algunos autores apuntan que para evitar falsos positivos en la separación binaria de clases, la relación entre el número de muestras de entrenamiento (n_t) y el número de variables independientes o dimensión del espacio vectorial de los patrones (p) debe ser superior a 3 [107]. Aunque existen numerosísimos procedimientos para la selección de variables, uno de los más prácticos consiste en realizar un análisis de componentes principales [158]. Para la determinación del número óptimo de neuronas de la capa oculta, algunos autores utilizan el parámetro ρ , defino como:

$$\rho = \frac{\text{número de datos en el conjunto de entrenamiento}}{\text{suma total de conexiones en la red}} \quad 104$$

Para evitar sobreentrenamiento, se recomienda que $1 < \rho > 2,2$ [159]. Pero existen muchos métodos heurísticos y empíricos de prueba y error. El siguiente punto crítico es la validación de la regla de clasificación obtenida. Generalmente se considera la sensibilidad y especificidad en la predicción de los objetos del conjunto de evaluación por clase. Pero en el caso de las redes neuronales existe una fuente adicional de sobreentrenamiento que es el número de épocas empleadas para la consecución de la regla. Es conveniente emplear un subconjunto de verificación para detener el proceso de entrenamiento antes que la red aprenda idiosincrasias presentes en el conjunto de entrenamiento en lugar de generalizar. Durante el entrenamiento, en cada época, todas las muestras han pasado a través de la red como vectores de entrada. Los pesos se re-evalúan a partir del error producido en la capa de salida mediante el algoritmo de retro-propagación de acuerdo con la regla delta. El cálculo iterativo de los pesos continúa con el número de épocas y se construye una función de coste (suma de cuadrados de las desviaciones de las salidas calculadas por la red frente a los valores conocidos). Si

designamos la matriz de pesos en la época m como W_m la función puede escribirse como:

$$J_m = \sum_{k=1}^{n_i} [\hat{Y}(W_m) - Y_k]^2 \quad 105$$

Donde k es un contador. Al pasar el tiempo, el proceso de aprendizaje continúa y disminuyen las desviaciones, con lo que la función de coste disminuye monótonicamente. ¿Dónde detenemos el entrenamiento? A partir de una iteración dada, si el entrenamiento continúa, se pueden aprender las peculiaridades de los objetos conduciendo a sobreentrenamiento. Si aplicamos la función de coste al conjunto de verificación y la comparamos con la función de coste del entrenamiento, un incremento de la primera con respecto de la segunda para el mismo número de interacciones puede tomarse como indicación de sobreentrenamiento y emplearse como criterio de detención del proceso de aprendizaje y se puede observar esquemáticamente en la figura 24.

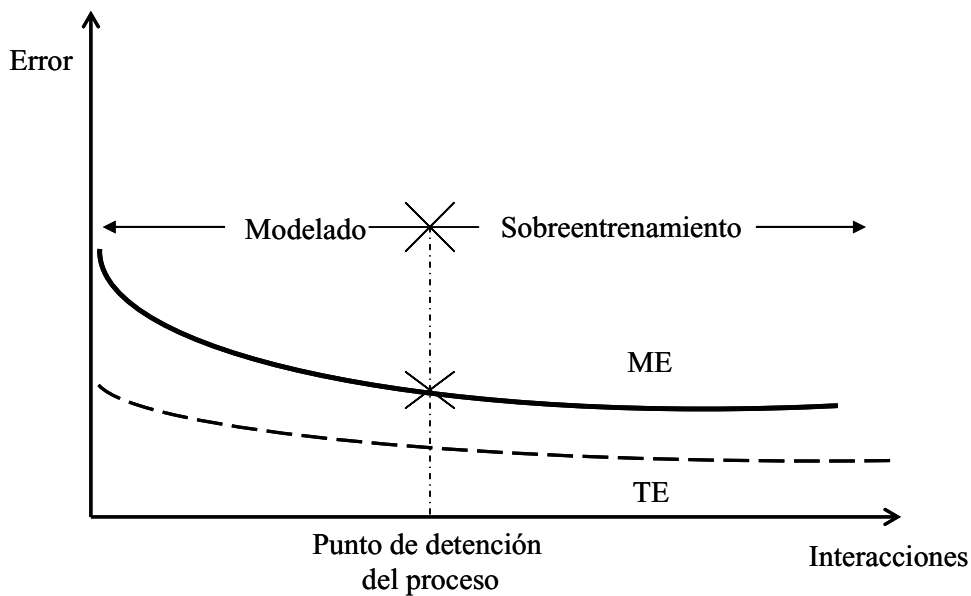


Figura 24. Esquema de sobreentrenamiento. TE: función de coste para el entrenamiento, ME: función de coste para el conjunto de verificación

II.5.3.4 Algoritmos neuronales probabilísticos y estimación bayesiana

Existen otros métodos discriminantes que utilizan redes neuronales para resolver problemas de clasificación y son los llamados algoritmos neuronales probabilísticos (PNN) [160, 161]. El PNN esencialmente es un tipo de red neuronal que implementa una estrategia de decisión bayesiana. Aplicando el teorema tenemos un conjunto de entrenamiento de vectores patrón distribuidos en Q clases: C_1, C_2, \dots, C_Q . Sea n_1, n_2, \dots, n_Q el número de vectores patrón que pertenece a cada una de las clases anteriores de modo que $n_1 + n_2 + \dots + n_Q = n_t$. Consideremos un vector patrón dado W ¿A qué clase lo asignamos? Pues así “a ciegas” las probabilidades de que pertenezca a la clase C_k vendrá dada por la regla de Laplace:

$$P(C_k) = \frac{n_k}{n_t} \quad 106$$

Estas son las probabilidades a priori. Pero si observamos los datos de sus componentes x_1, x_2, \dots, x_p podemos añadir esta información al sistema y calcular una probabilidad a posteriori de que el vector pertenezca a la clase C_k una vez que conocemos sus componentes según el teorema de Bayes:

$$P(C_k / X) = \frac{p(X / C_k)P(C_k)}{p(X)} \quad 107$$

P hace referencia a la probabilidad y p a función de densidad de probabilidad (PDF):

$$P(a < x < b) = \int_a^b p(x) dx \quad 108$$

$P(X/C_k)$ es la densidad de probabilidad de los vectores patrón condicionada a la clase C_k . $p(X)$ es la densidad de probabilidad no condicional y que hace las veces de mero factor de escala:

$$P(x) = \sum_{k=1}^Q p(X / C_k) P(C_k) \quad 109$$

Y que nos asegura que:

$$\sum_{k=1}^Q P(C_k / X) = 1 \quad 110$$

La probabilidad *a posteriori* $P(C_k/X)$ da la probabilidad de que el vector patrón pertenezca a la clase C_k una vez que hemos observado sus componentes. La probabilidad de fallo en la clasificación se minimiza seleccionando la clase C_k que tenga el mayor valor de probabilidad *a posteriori*:

$$P(C_k / X) = \max_{j \in \{1, 2, \dots, Q\}} P(C_j / X) \quad 111$$

Como $p(X)$ es independiente de la clase y puede tomarse como un factor de escala, podemos maximizar los productos $P(C_k/X)p(X) = p(X/C_k)P(C_k)$, con lo cual el criterio de asignación será:

$$p(X / C_k)P(C_k) = \max_{j \in \{1, 2, \dots, Q\}} p(X / C_j)P(C_j) \quad 112$$

El problema se ha reducido a la estimación de las PDF condicionadas a las clases, $p(X / C_k)$. Ahí es donde actúa la red neuronal probabilística. Las PDF condicionales pueden evaluarse aplicando algún estimador de PDF. Existen varios, pero el mejor es el estimador de Parzen [162] pues es insesgado (el promedio de n estimaciones converge al valor de referencia cuando n crece) y asintóticamente convergente (el error cuadrático medio tiende a cero cuando el número de vectores de entrenamiento tiende a infinito). El problema del estimador de Parzen es que sólo se aplicaba al caso univariante. Cacoullos extendió el estimador de Parzen al caso multivariante [163]. Este estimador puede considerarse la función de activación del PNN y tiene la forma de un operador Gaussiano multivariante:

$$P(X / C_k) = \frac{1}{(2\pi)^{p/2} \prod_{j=1}^p \sigma_{kj} n_k} \sum_{i=1}^{n_k} w_i e^{-D_k(X, X_i)} \quad 113$$

Donde X_i es un parámetro llamado factor de suavizado y representa la desviación estándar de la distribución de la variable j entre las muestras de la clase C_k . Los pesos w_i son ponderaciones asociadas al vector de entrenamiento X_i , que habitualmente se toman igual a la unidad. El número total de descriptores es p , el número de vectores de entrenamiento de la clase C_k es n_k . $D_k(X, X_i)$ representa la distancia cuadrática normalizada entre un vector patrón del conjunto de evaluación X y un vector patrón de entrenamiento perteneciente a la clase k , $X_i^{(k)}$:

$$D_k(X, X_i) = \sum_{j=1}^p \left(\frac{x_j - x_{ij}^{(k)}}{\sigma_{kj}} \right)^2 \quad 114$$

Aunque el estimador es un operador gaussiano, esto no tiene relación alguna con la suposición de normalidad de la distribución $p(X / C_k)$. Si admitimos la equivalencia de los parámetros de suavizado ($\sigma_{k1} = \sigma_{k2} = \sigma_{kj} = \dots = \sigma_{kp} = \sigma_k$) y tomamos $w_i = 1$ el estimador de PDF vendrá dado por:

$$p(X / C_k) = \frac{1}{(2\pi)^{p/2} \sigma_k^p n_k} \sum_{i=1}^{n_k} \exp \left(- \sum_{j=1}^p \frac{(x_j - x_{ij})^2}{\sigma_k^2} \right) \quad 115$$

A diferencia de los MLP en los que el núcleo del proceso es la capa oculta, el PNN tiene una capa patrón que se encarga de hacer el entrenamiento de manera equivalente a como funcionan las redes neuronales con función de base radial [164]. Durante el aprendizaje, los vectores patrones del conjunto de entrenamiento simplemente se introducen en la capa patrón del PNN agrupados por clases. La peculiaridad del PNN es que durante el entrenamiento el único parámetro que hay que ajustar es de acuerdo con la ecuación 115, el parámetro de suavizado σ_k , también llamado anchura de núcleo. Este parámetro es

fundamental porque determina la interpolación que tiene lugar entre vectores patrones adyacentes. Cuando el parámetro de suavizado tiende a cero, el PNN se reduce esencialmente a un clasificador del vecino más próximo (1NN). Un valor grande del parámetro de suavizado tiene la ventaja de producir un PDF suave, con buenas propiedades de interpolación para predecir nuevos vectores patrón, pero como contrapartida, presenta severos riesgos de fallo en la clasificación. El valor óptimo para el parámetro de suavizado es un compromiso y puede estimarse un valor de entrada a partir de la expresión [165]:

$$\sigma_k^{\text{opt}} = 1.44 \sqrt{\frac{1}{n_k} \sum_{i=1}^{n_k} \|x_i - x_i^*\|^2} \quad 116$$

Donde X_i es un vector patrón del conjunto de entrenamiento y X_i^* su vecino más próximo en la clase. Pero el procedimiento de ajuste más habitual es maximizar la eficacia del reconocimiento, es decir minimizar el fallo de clasificación en el conjunto de entrenamiento. Este criterio es discreto, pero puede definirse una función error continua para estos menesteres [166].

$$\text{error}_k(X) = [1 - p(X / C_k)]^2 + \sum_{j \neq k} [p(X / C_j)]^2 \quad 117$$

Las derivadas de esta función pueden emplearse para la optimización de los parámetros de suavizado utilizando poderosos como el del gradiente conjugado. En ciertos casos, algunos programas emplean un único parámetro de suavizado para todas las clases admitiendo la igualdad de los núcleos: $\sigma_1 = \sigma_2 = \sigma_k = \dots = \sigma_Q = \sigma$.

El PNN tiene cuatro capas:

- ◆ La capa de entrada presenta simplemente los vectores patrón de entrada en la red, que corresponderán al conjunto de

evaluación para predecir su pertenencia a clase. Los vectores patrón del conjunto de entrenamiento se usan previamente para en la etapa de aprendizaje optimizar el parámetro de suavizado que caracteriza los estimadores de Parzen para PDF condicional.

- ◆ La capa patrón contiene tantas neuronas como vectores patrones del conjunto de entrenamiento agrupados en clases. Cada neurona de esta capa comprueba la distancia entre cada vector patrón de evaluación (X) y el correspondiente vector patrón de entrenamiento (X_i) mediante la ecuación 114.
- ◆ La capa de suma calcula el valor de la PDF condicional para cada clase según la ecuación 115.
- ◆ La capa de decisión que en realidad es una unidad de decisión que busca el máximo de la PDF condicional según la ecuación 112, asignando la clase de la PDF ganadora al vector patrón de entrada.

La arquitectura del PNN se ilustra en la figura 25 para el caso de 4 vectores de entrada y un conjunto de entrenamiento constituido por dos clases que contienen 5 y 3 vectores patrón.

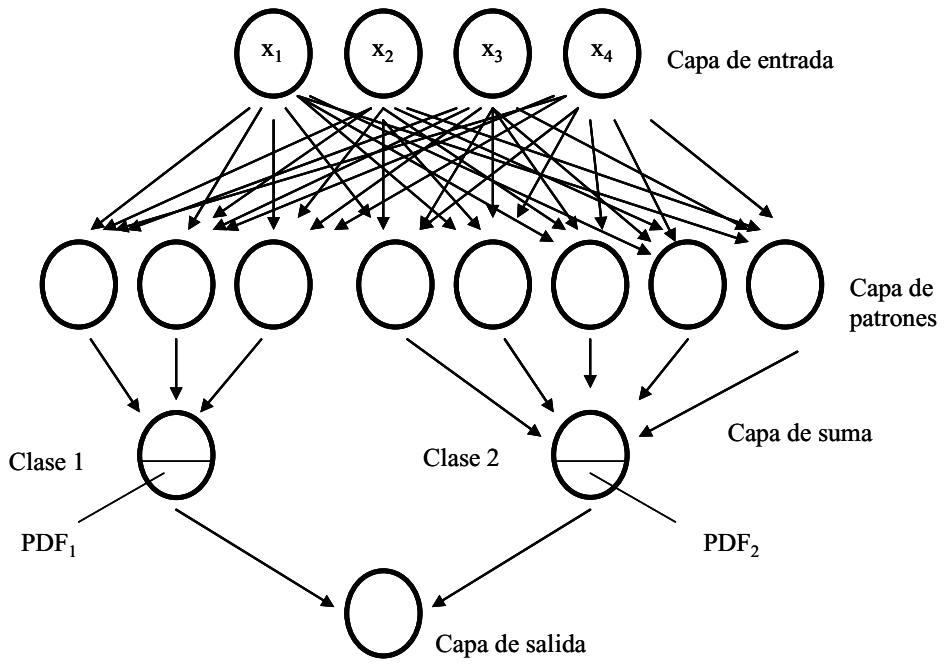


Figura 25. Representación gráfica del algoritmo neuronal probabilístico.

III. PARTE EXPERIMENTAL

III. 1 Materiales y reactivos

III.1.1 Aparatos y equipos

- ◆ Espectrómetro de emisión atómica de plasma inducido acoplado Fisons-ARL 3410 (FISONS Instruments, Valencia, CA, USA) equipado con:
 - Antorcha Minitorch.
 - Nebulizador Meinhard.
- ◆ Horno de microondas Ethos 900 (MILESTONE Laboratory System, Sorisole, Italia).
- ◆ Cromatógrafo de gases GC-8000 series (CARLO ERBA Instruments, Milán, Italia) acoplado a un espectrómetro de masas Trio 1000 (FISONS Instruments, Valencia, CA, USA) equipado con:
 - Fuente de impacto electrónico (EI).
 - Analizador cuadrupolar (FISONS Instruments, Milán, Italia)
 - Columna capilar Zebron ZB-5 MS (95% dimetil-5% fenilpolisiloxano), 30 m x 0.25 mm (i.d.), 0.25 μm de espesor de fase estacionaria (PHENOMENEX, CA, USA).
 - Espectrotecas: N.I.S.T. 98 y Wiley 6.0.
- ◆ Micropipeta Rainin (1-250 μl) (RAININ Instruments Co. MA, USA)
- ◆ Fibra de microextracción en fase sólida 85 μm flexible Carboxeno/polidimetilsiloxano (CAR/PDMS) (SUPELCO, Bellafonte, PA, USA).
- ◆ Sistema de calentamiento y agitación magnética (IKA-Labortechnik, Staufen, Alemania).
- ◆ Cromatógrafo líquido (WATERS Corporation, Milford, MA, USA) equipado con:

- Bomba binaria para HPLC WATERS 1525.
- Válvula de inyección Rheodyne con bucle de 20 μl .
- Detector de fila de fotodiodos WATERS 2996.
- Termostatizador de columna WATERS 1500.
- Columna cromatográfica de fase reversa C18 (250 x 4,6 mm (i.d.)), 5 μm tamaño de partícula (TEKNOKROMA, Barcelona, España).
- ◆ Software: Empower™ Service Pack A.
- ◆ Estufa (HERAEUS, Hanau, Alemania)
- ◆ Horno electrónico de resistencia de carburo de silicio (CHESA, Madrid, España).
- ◆ Equipo Milli-Q (Milli-Q, Millipore, Bedford, MA, USA) agua de resistividad superior a 18.2 $\text{M}\Omega \text{ cm}^{-1}$.
- ◆ Para el análisis quimiométrico se utilizaron los programas Statistica 6, Statistica Neural Networks y Unmetrics SIMCA-P 9.

III.1.2 Reactivos y disoluciones

Todos los reactivos utilizados en la realización de este trabajo fueron de grado analítico.

III.1.2.1 Reactivos

- ◆ Ácido acético (Merck)
- ◆ Ácido fosfórico (Merck)
- ◆ Ácido nítrico (65%) (Merck)
- ◆ Ácido perclórico (60%) (Merck)
- ◆ Ácido clorhídrico fumante (37%) (Merck)

- ◆ Hidróxido de sodio (99%) (Merck).
- ◆ Peróxido de hidrógeno (30%) (Merck)
- ◆ Pentóxido de vanadio (99%) (Merck)
- ◆ Alambre de aluminio (Merck)
- ◆ Alambre de hierro (Merck)
- ◆ Cobre metálico (Merck)
- ◆ Zinc metálico (Merck)
- ◆ Manganeso metálico (Merck)
- ◆ Magnesio granulado (Merck)
- ◆ Carbonato de bario (Merck)
- ◆ Carbonato de calcio (98,5%) (Panreac)
- ◆ Cloruro de potasio (99%) (Panreac)
- ◆ Cloruro de sodio (99%) (Panreac)
- ◆ Nitrato de estroncio (Merck)
- ◆ Sulfato de amonio (99%) (Panreac)
- ◆ Sulfato de cobre (99%) (Merck)
- ◆ Tartrato de sodio y potasio tetra hidratado (99%) (Merck)
- ◆ Alcohol etílico (99,5%) (Sigma Aldrich)
- ◆ Acetonitrilo (grado HPLC de Romil)
- ◆ n-propanol (99,5%) (Sigma Aldrich)
- ◆ Acetato de etilo (99%) (Sigma Aldrich)
- ◆ 2-metil-propanol (99,5%) (Sigma Aldrich)
- ◆ 3-metil-butanol (98,5%) (Sigma Aldrich)
- ◆ 2-metil-butanol (98%) (Sigma Aldrich)
- ◆ n-butanol (99.5%) (Sigma Aldrich)
- ◆ 5-hidroximetilfurfural (97 %) (Fluka)
- ◆ Furfural (99 %) (Fluka)
- ◆ Sacarosa (99,5%) (Fluka)

III.1.2.2 Disoluciones

- ◆ Disolución de azul de metileno al 1% en agua.
- ◆ Disolución de fenolftaleína al 1% en alcohol (1:1)
- ◆ Disolución de ácido acético 0,035M y ácido fosfórico 0,004M (fase móvil A)
- ◆ Disolución de cloruro de sodio 1M.
- ◆ Disolución acuosa de ácido clorhídrico (50% v/v).
- ◆ Las disoluciones estándar (1000 mg/l) de los elementos Al, Ba, Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, S, Sr y Zn fueron preparadas siguiendo los métodos propuestos en la guía Perkin-Elmer Pure Atomic Spectroscopy Standards de preparación de patrones para espectroscopía atómica (PERKIN-ELMER Corp., Norwalk, CT). Las disoluciones de trabajo de patrones multielementales fueron obtenidas por dilución de estos estándares. En todos los casos se usó agua ultrapura Milli-Q (MILLIPORE, Bedford, MA, USA).
- ◆ Se prepararon disoluciones de n-butanol 19,907 $\mu\text{g/ml}$, n-propanol 24,959 $\mu\text{g/ml}$, acetato de etilo 9979 $\mu\text{g/ml}$, 2-metilpropanol 10030 $\mu\text{g/ml}$, 3-metil-butanol 9881 $\mu\text{g/ml}$, 2-metil-butanol 4976 $\mu\text{g/ml}$ a partir de los patrones en alcohol etílico y se conservaron a 4 °C.
- ◆ Las disoluciones estándar de furfural y 5-hidroximetilfurfural (200 $\mu\text{g ml}^{-1}$) se prepararon en acetonitrilo y se conservaron a 4°C. Las disoluciones de trabajo se prepararon cada semana a partir de la disolución estándar mediante dilución con acetonitrilo.
- ◆ Fehling A. Disolución de CuSO_4 0,14M.
- ◆ Fehling B. Disolución de $\text{KNaC}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1,23M y NaOH 2,5M.

- ◆ Disolución de sacarosa invertido al 0,2%. Se preparó una disolución de sacarosa al 1%. A 100 ml de esta disolución se le añadió HCl concentrado y se hidrolizó calentando a 70 °C durante 15 min. Una vez a temperatura ambiente se enrasó a 1 L con agua Milli-Q. A partir de esta disolución se preparó la sacarosa a 0,2%.

III.1.3 Muestras

En el presente trabajo se han analizado 125 muestras de tequila obtenidas en comercios al por menor, de manera que fueran representativas de los tipos de tequila que están a disposición del consumidor. Asimismo se analizaron 12 muestras de mezcal. Del total de muestras 44 fueron de tequila blanco, 20 de tequila oro, 44 de tequila reposado y 17 de tequila añejo. A cada tipo de tequila y mezcal se le asignó un código identificativo que se utilizará en lo sucesivo. Así, para el tequila blanco B, tequila oro G, tequila reposado R, tequila añejo A y mezcal M seguida de una numeración correlativa. En la tabla 5 aparecen las muestras estudiadas, junto con su código identificativo.

Tabla 5. Muestras de tequila y mezcal analizadas

Tequila blanco			
Muestra	Marca	Muestra	Marca
B1	Casco Viejo	B23	Herencia de plata
B2	Casco Viejo	B24	Herencia de plata
B3	Casco Viejo	B25	Herencia de plata
B4	Camino Real	B26	García
B5	Camino Real	B27	García
B6	Camino Real	B28	García
B7	Herradura	B29	Sauza
B8	Herradura	B30	Sauza
B9	Herradura	B31	Sauza
B10	Herradura	B32	Sauza
B11	Herradura	B33	Sauza
B12	Jimador	B34	Sauza
B13	Jimador	B35	Sauza
B14	Jimador	B36	Zapopan
B15	Sierra	B37	Zapopan
B16	Sierra	B38	Zapopan
B17	Sierra	B39	All chili picante
B18	Agavita	B40	All chili picante
B19	Agavita	B41	All chili picante
B20	Agavita	B42	Jalisco
B21	Herencia de plata	B43	Jalisco
B22	Herencia de plata	B44	Jalisco
Tequila oro			
Muestra	Marca	Muestra	Marca
G1	Casco Viejo	G11	Sauza
G2	Casco Viejo	G12	Sauza
G3	Casco Viejo	G13	Sauza
G4	Casco Viejo	G14	Sauza

Tabla 5. (Continuación)

Tequila oro			
Muestra	Marca	Muestra	Marca
G5	Casco Viejo	G15	Sauza
G6	García	G16	Jalisco
G7	García	G17	Jalisco
G8	García	G18	Jalisco
G9	García	G19	Jalisco
G10	García	G20	Jalisco
Tequila reposado			
Muestra	Marca	Muestra	Marca
R1	Cazadores	R23	José Cuervo Especial
R2	Cazadores	R24	José Cuervo Especial
R3	Cazadores	R25	Real Hacienda
R4	La cava de don Agustín	R26	Real Hacienda
R5	La cava de don Agustín	R27	Real Hacienda
R6	La cava de don Agustín	R28	Real Hacienda
R7	Herradura	R29	Real Hacienda
R8	Herradura	R30	Real Hacienda
R9	Herradura	R31	Corralejo bidestilado
R10	Jimador	R32	Corralejo bidestilado
R11	Jimador	R33	Corralejo bidestilado
R12	Jimador	R34	Corralejo tridestilado
R13	Herradura antiguo	R35	Corralejo tridestilado
R14	Herradura antiguo	R36	Corralejo tridestilado
R15	Herradura antiguo	R37	Centinela
R16	Herencia de plata	R38	José cuervo tradicional
R17	Herencia de plata	R39	Cabrito
R18	Herencia de plata	R40	Pura Sangre
R19	Reserva del señor	R41	Don Julio
R20	Reserva del señor	R42	Pueblo viejo
R21	Reserva del señor	R43	Herradura antiguo
R22	José Cuervo Especial	R44	Jimador

Tabla 5. (Continuación)

Tequila añejo			
Muestra	Marca	Muestra	Marca
A1	Herradura	A10	Sauza conmemorativo
A2	Herradura	A11	Sauza conmemorativo
A3	Herradura	A12	Sauza conmemorativo
A4	García	A13	Sauza conmemorativo
A5	García	A14	Sauza conmemorativo
A6	García	A15	Sauza conmemorativo
A7	Herencia de plata	A16	Reserva antigua 1800
A8	Herencia de plata	A17	Herradura
A9	Herencia de plata		
Mezcal			
Muestra	Marca	Muestra	Marca
M1	Gusano Rojo	M7	Viejo Pancho López R
M2	Gusano Rojo	M8	Viejo Pancho López R
M3	Gusano Rojo	M9	Viejo Pancho López A
M4	Gusano Rojo	M10	Viejo Pancho López A
M5	Viejo Pancho López R	M11	Viejo Pancho López A
M6	Viejo Pancho López R	M12	Viejo Pancho López A

III.2 Procedimientos

III.2.1 Determinación de Na, K, Ca, S, Mg, Mn, Cu, Ba, Fe, Zn, Al y Sr por ICP-OES

Para la determinación de Na, K, Ca, S, Mg, Mn, Cu, Ba, Fe, Zn, Al y Sr se llevó a cabo la mineralización de las muestras de tequila mediante digestión en microondas empleando la mezcla ácida HNO_3 y V_2O_5 . En un reactor de teflón se ponen 50 ml de tequila, evaporando previamente el alcohol en un baño de arena. Al residuo remanente se le añaden 2,5 ml de HNO_3 y una pequeña cantidad de V_2O_5 . Se cierra el reactor y se introduce en un horno de microondas donde se lleva a cabo la digestión aplicando el programa que se presenta en la tabla 6. Las muestras, una vez frías, se pasan a matraces aforados de 10 ml, que se enrasan con agua Milli-Q. A continuación, las muestras se microfiltran ($0,45 \mu\text{m}$) y se analizan mediante ICP-OES según las condiciones instrumentales detalladas en la tabla 7. En la figura 26 se presenta un diagrama del procedimiento utilizado.

Tabla 6. Programa de microondas

Paso	Tiempo (min)	Potencia (W)
1	3	250
2	2	0
3	5	250
4	2	0
5	3	500
6	2	0
7	3	500

Tabla 7. Condiciones instrumentales del ICP-OES.

Radiofrecuencia	27,12 MHz
Potencia incidente	650 W
Flujo argón (refrigeración)	7,5 l/min
Flujo argón (plasma)	0,8 l/min
Tipo de antorcha	Minitorch
Tipo de nebulizador	Meinhard
Flujo de aspiración de muestra	1 ml/min
Elemento	λ (nm)
S	180,731
Zn	213,856
Mn	257,610
Fe	259,940
Mg	279,553
Cu	324,754
Ca	393,366
Al	396,152
Sr	407,771
Ba	455,403
Na	588,995
K	766,490

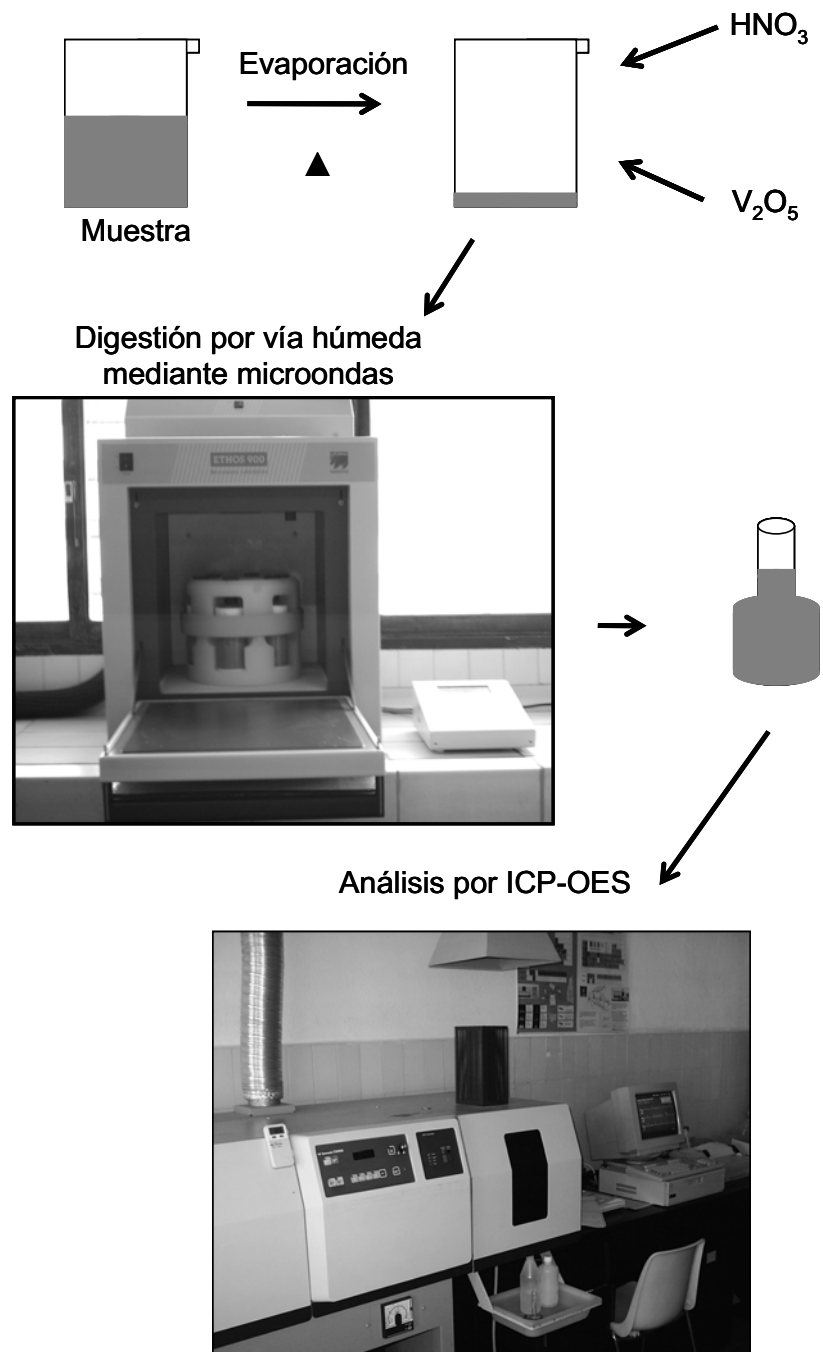


Figura 26. Diagrama del procedimiento de digestión y análisis de metales llevado a cabo para las muestras de tequila y mezcal

III.2.2 Determinación de n-propanol, acetato de etilo, 2-metil-propanol, 3-metil-butanol, 2-metil-butanol mediante HS-SPME-GC-MS

Las condiciones utilizadas para la determinación de n-propanol, acetato de etilo, 2-metil-propanol, 3-metil-butanol y 2-metil-butanol se detallan en los siguientes apartados donde se describen las condiciones utilizadas para la microextracción en fase sólida y la posterior determinación por cromatografía de gases.

III.2.2.1 Microextracción en fase sólida

En un vial de 20 ml se añaden 3 ml de tequila, 7 ml de H₂O y 60 µg/ml de n-butanol como estándar interno. Una vez sellado el vial, la fibra (CAR/PDMS) en el espacio de cabeza. La adsorción se lleva a cabo a 35 °C durante 30 min agitando continuamente a una velocidad de 100 rpm. En la figura 27 se muestra un esquema del procedimiento de microextracción en fase sólida por espacio de cabeza (HS-SPME) llevado a cabo.

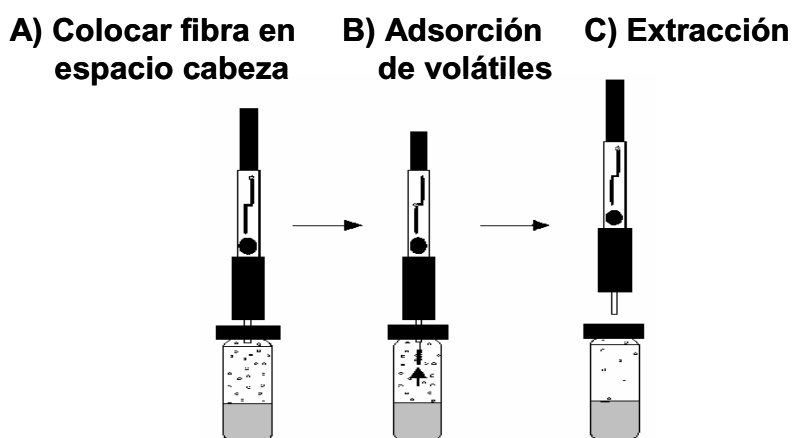


Figura 27. Extracción de volátiles mediante HS-SPME.

III.2.2.2 Determinación cromatográfica

La desorción se realiza inyectando la fibra en el inyector durante 2 min a 220 °C. La relación de split es 1:15. Se empleó helio como gas portador a flujo de 1 ml/min. El programa de temperatura aplicado fue el siguiente: se comienza con periodo isoterma a 40 °C durante 10 min, posteriormente se aplica una rampa de temperatura de 8 °C/min hasta alcanzar 250 °C, manteniendo esta temperatura 1 min.

En la figura 28 se presenta un esquema del equipo de GC-MS utilizado, señalando la forma de inserción para la desorción de los compuestos para su análisis.

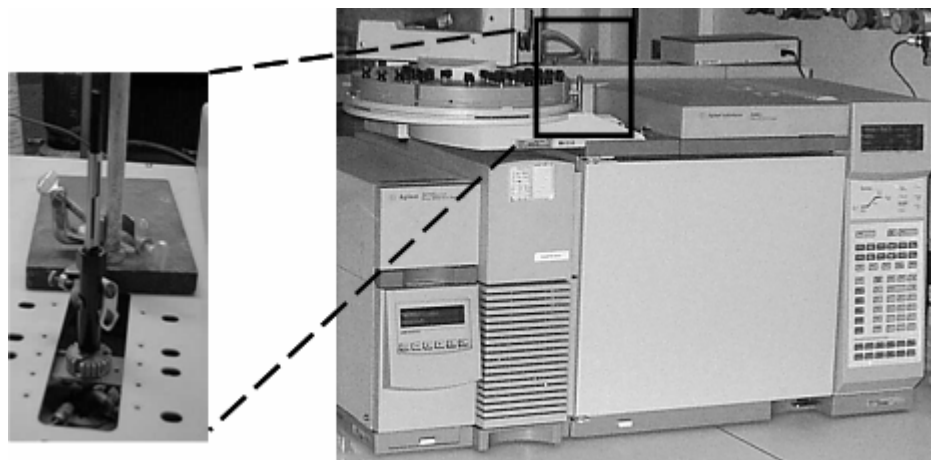


Figura 28. Sistema de GC-MS utilizado indicando la zona de inserción de la fibra en el sistema.

Los espectros de masas se adquirieron mediante ionización por impacto electrónico (EI+) a 70 eV realizando una detección en modo

SCAN en un intervalo de 35-250 m/z. Manteniendo la interfase una temperatura de 250 °C y el detector una temperatura de 300 °C.

III.2.3 Determinación de furfural y 5-hidroximetilfurfural mediante HPLC

Las muestras de tequila y mezcal se inyectaron directamente en el cromatógrafo, microfiltrándose (0,45 µm) previamente. Las condiciones cromatográficas utilizadas se presentan en la tabla 8.

Tabla 8. Condiciones cromatográficas para la determinación de furfural y 5-hidroximetilfurfural

Fase móvil	Acetonitrilo/disolución A* (18:82, v/v)
Fase estacionaria	Octadecilsilano
Flujo fase móvil	1,2 ml/min
Volumen de inyección	20 µL
Temperatura de la columna	35 °C
Longitud de onda de detección	280 nm

*Disolución A: ácido acético 0,035M y ácido fosfórico 0,004M

El cromatógrafo de líquidos utilizado para el análisis se presenta en la figura 29.

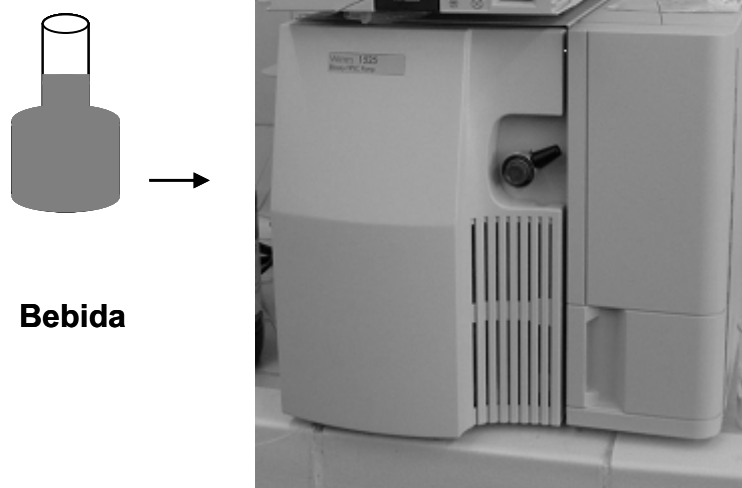


Figura 29. Cromatógrafo de líquidos utilizado para la determinación de furfural y 5-hidroximetilfurfural

III.2.4 Determinación de extracto seco y ceniza

En una cápsula de porcelana se adicionan 50 ml de muestra. La cápsula se introduce en una estufa a 100 °C hasta conseguir peso constante según la norma mexicana MNX-017-NORMEX-2005 [24]. Se considera peso constante cuando la diferencia entre dos pesadas consecutivas no supera 2 mg.

Para calcular el contenido en ceniza la muestra seca se coloca en un horno mufla. Y se calienta progresivamente hasta los 525 °C. Dicha temperatura se mantiene el tiempo necesario hasta obtener ceniza blanca (aproximadamente 20 min). Después, se enfría y se pesa el residuo. La operación se repite hasta obtener masa constante. La cantidad de

extracto seco y ceniza se expresa en g/l y se calcula a partir de la diferencia de pesos utilizando la fórmula siguiente:

$$ES = \frac{(Mes - Mv) \times 1000}{V} \quad 118$$

$$C = \frac{(Mc - Mv) \times 1000}{V} \quad 119$$

Donde: ES, Extracto seco expresado en g/l; Mes, peso del extracto seco más la cápsula (g); C, Ceniza expresado en g/l; Mc, peso de la ceniza más la cápsula (g); Mv, peso de la cápsula (g); V, volumen de muestra empleada (ml).

III.2.5 Determinación de azúcares reductores directos y totales

La determinación de azúcares reductores directos y totales se llevó a cabo siguiendo la norma mexicana [23].

III.2.5.1 Estandarización de las disoluciones de Fehling

Se toman volúmenes iguales de la disolución de Fehling A y B, se colocan en un matraz erlenmeyer, se añade entre 20 y 50 ml de agua y se calienta hasta ebullición. Posteriormente se añaden unas gotas de la disolución de azul de metileno como indicador y se valora con disolución de sacarosa invertida (0,2%). El factor de Fehling (*ff*) se calcula a partir del volumen gastado en la valoración (*Vs*) para la reducción de CuSO_4 ,

multiplicado por la concentración de la disolución de sacarosa invertida (Conc).

$$ff = V_s \times \text{Conc} \quad 120$$

III.2.5.2 Determinación de azúcares reductores directos

Para el cálculo de azúcares reductores directos se toman volúmenes iguales de Fehling A y Fehling B, y se sigue un procedimiento similar a la estandarización descrita en el apartado III.2.5.1. En lugar de la disolución de sacarosa invertida de concentración conocida se valora con muestra de tequila o mezcal. Una vez obtenido el volumen gastado en la valoración, se calcula la cantidad de ARD con la siguiente fórmula:

$$ARD = \frac{ff}{V} \times FD \quad 121$$

Donde: ARD, azúcares reductores directos expresado en mg/ml o g/L; *ff*, Factor de Fehling; *V*, volumen gastado en ml; *FD*, factor de dilución de la muestra problema.

III.2.5.3 Determinación de azúcares reductores totales

El procedimiento utilizado es similar al descrito en el apartado III.2.5.2. Antes de la valoración de los azúcares contenidos en las muestras problema se deben invertir. Para ello a 50 ml de tequila se le añaden 5 ml de HCl (1:1). Se colocan en un baño con temperatura controlada entre 68-70 °C y se mantiene 15 min. Una vez a temperatura ambiente, el exceso de ácido se neutraliza con NaOH 1M utilizando

fenolftaleína como indicador. A continuación se determina el contenido de azúcares reductores totales (ART) tal y como se explicó en la sección III.2.5.2 utilizando como valorante la muestra de tequila invertida. Con el valor del volumen gastado en la valoración se procede a calcular los ART contenidos en la muestra problema como sigue:

$$ART = \frac{ff}{V} \times FD \qquad 122$$

Donde: ART, azúcares reductores totales expresado en mg/ml o g/L; *ff*, Factor de Fehling; V, volumen gastado en ml; FD, factor de dilución de la muestra problema.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1 Determinación de Na, K, Ca, S, Mg, Mn, Cu, Ba, Fe, Zn, Al y Sr por ICP-OES

IV.1.1 Optimización del método de mineralización de las muestras

Previamente a la determinación de los metales por ICP-OES, debe realizarse una mineralización de las muestras de tequila. Teniendo en cuenta los diversos métodos propuestos en la bibliografía [51, 167-171] se ha realizado un estudio comparativo para seleccionar el más adecuado. Se han considerado métodos por vía húmeda, que utilizan distintas mezclas ácidas, tanto en vaso abierto como en horno de microondas. En todos los casos se utilizó la misma muestra de tequila para llevar a cabo este estudio. Se utilizó tequila Sauza blanco, debido a que es uno de los de consumo más habitual.

Se ensayaron las siguientes mezclas ácidas: $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$, $\text{HNO}_3/\text{HClO}_4$ y $\text{HNO}_3/\text{V}_2\text{O}_5$. Para los ensayos en vaso abierto (VA), se pusieron 100 ml de tequila en un vaso de teflón, calentando en baño de arena a 80 °C para evaporar el etanol. Posteriormente se añadieron los reactivos para realizar la digestión. A continuación se detalla el procedimiento seguido para cada una de las mezclas ensayadas:

- 1) $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ (VAA). Una vez llevada la muestra casi a sequedad, se añaden 5 ml de HNO_3 , y se vuelve a calentar en el baño de arena hasta que cese la evolución de vapores nitrosos. Se deja enfriar y se añade 1 ml de H_2O_2 , calentando de nuevo hasta completar la digestión.
- 2) $\text{HNO}_3/\text{HClO}_4$ (VAB). Al igual que en VAA, una vez eliminado el alcohol se lleva a casi sequedad, se añaden 5 ml de HNO_3 , se calienta, y una vez terminada la reacción, y en frío se añade 1 ml de HClO_4 . Se

calienta nuevamente hasta que reaccione completamente el ácido con la muestra, dando así por finalizada la digestión.

3) $\text{HNO}_3/\text{V}_2\text{O}_5$ (VAC). Después que la muestra se lleva casi a sequedad, se añaden 5 ml de HNO_3 y una pequeña cantidad de V_2O_5 . Se calienta hasta completar la digestión.

Una vez finalizada cada una de las digestiones antes mencionadas, las muestras se enrasaron a 50 ml con agua Milli-Q y se filtraron a través de filtros de $0,45\ \mu\text{m}$ antes del análisis por ICP-OES. Los blancos se prepararon siempre de acuerdo al método usado, utilizando las mismas cantidades de reactivos que las utilizadas en las muestras.

También se ha estudiado la digestión de las muestras utilizando horno de microondas (MO). En este caso se ha utilizado solamente la mezcla $\text{HNO}_3/\text{V}_2\text{O}_5$, debido a que esta mezcla fue con la que se obtuvieron los mejores resultados en el procedimiento con vaso abierto. Para realizar la digestión por MO se utilizó un programa de microondas, que asegurara la digestión completa de la muestra. La tabla 6 (página 127, Parte Experimental) muestra el programa utilizado.

La comparación de los resultados se llevó a cabo considerando las recuperaciones obtenidas en cada caso. Debido a la falta de material de referencia se llevaron a cabo ensayos de recuperación para comprobar la exactitud de cada uno de los métodos. Se consideraron cinco niveles de concentración para cada uno de los elementos analizados. Estos rangos fueron los siguientes: 5, 10, 15, 20 y 25 mg/l para los elementos mayoritarios (Na, K, Ca, S); 1, 2, 3, 4 y 5 mg/l para elementos de concentración intermedia (Mg) y 0,75, 1, 1,25, 1,5 y 1,75 mg/l para

elementos minoritarios (Mn, Al, Sr, Zn, Cu, Ba, Fe). Los análisis se realizaron por triplicado para cada uno de los niveles considerados.

Para comprobar la presencia de efecto matriz se compararon las pendientes de las rectas de calibrado para cada uno de los elementos, obtenidas por el método de calibrado externo con disoluciones acuosas de patrones y con adición de los ácidos utilizados en los tratamientos de la muestra. Se realizó un test t de Student, para comparar las pendientes de las rectas para cada elemento. El valor de t tabulado para el 95% de confianza y 26 grados de libertad es 2,056. El número de grados de libertad se calcula a partir de la siguiente expresión: $n_{PA} + n_A - 4$. Siendo n_{PA} el número de puntos utilizados para realizar la recta de calibrado con patrones acuosos y n_A el número de puntos utilizados para las muestras añadiendo ácido [172].

En los casos de tratamiento en vaso abierto no se detectó efecto matriz. Dado que en el calentamiento de las muestras los reactivos añadidos se van evaporando, la concentración de ácidos en la disolución diluida final es baja.

En el caso del tratamiento con microondas, al comparar los valores de t calculada con la t tabulada, se observa que existe efecto matriz para los elementos Na, K, Ca, S y Mg. Aunque en el resto de los elementos no se detectó efecto matriz, dado que las determinaciones se llevan a cabo simultáneamente para todos los elementos se decidió analizarlos todos utilizando disoluciones estándar a las que se añade la mezcla $\text{HNO}_3/\text{V}_2\text{O}_5$. Los valores de pendiente y ordenada en el origen con su respectiva desviación estándar para cada calibrado, así como la t calculada se presentan en la tabla 9.

Tabla 9. Efecto matriz tratamiento con microondas

Elemento	Patrones acuosos $b \pm S_b$	Patrones con $\text{HNO}_3/\text{V}_2\text{O}_5$ $b \pm S_b$	t calculada
Na	1,64 ± 0,03	1,49 ± 0,01	4,860
K	0,125 ± 0,002	0,106 ± 0,001	9,974
Ca	8,74 ± 0,04	7,18 ± 0,03	29,410
S	0,317 ± 0,004	0,277 ± 0,005	5,548
Mg	16,1 ± 0,2	12,05 ± 0,03	9,016
Mn	4,4 ± 0,4	4,0 ± 0,3	0,892
Sr	41 ± 3	34 ± 2	1,719
Ba	13 ± 1	10,7 ± 0,8	1,878
Fe	0,86 ± 0,07	0,816 ± 0,005	0,608
Cu	2,0 ± 0,2	2,1 ± 0,2	0,419
Al	0,50 ± 0,04	0,45 ± 0,03	1,052
Zn	3,6 ± 0,3	3,8 ± 0,3	0,663

b: pendiente de la recta de calibrado; Sb: desviación estándar de la pendiente.

Las figuras 30-41 presentan los resultados obtenidos mediante gráficos de caja y bigotes para cada uno de los elementos analizados.

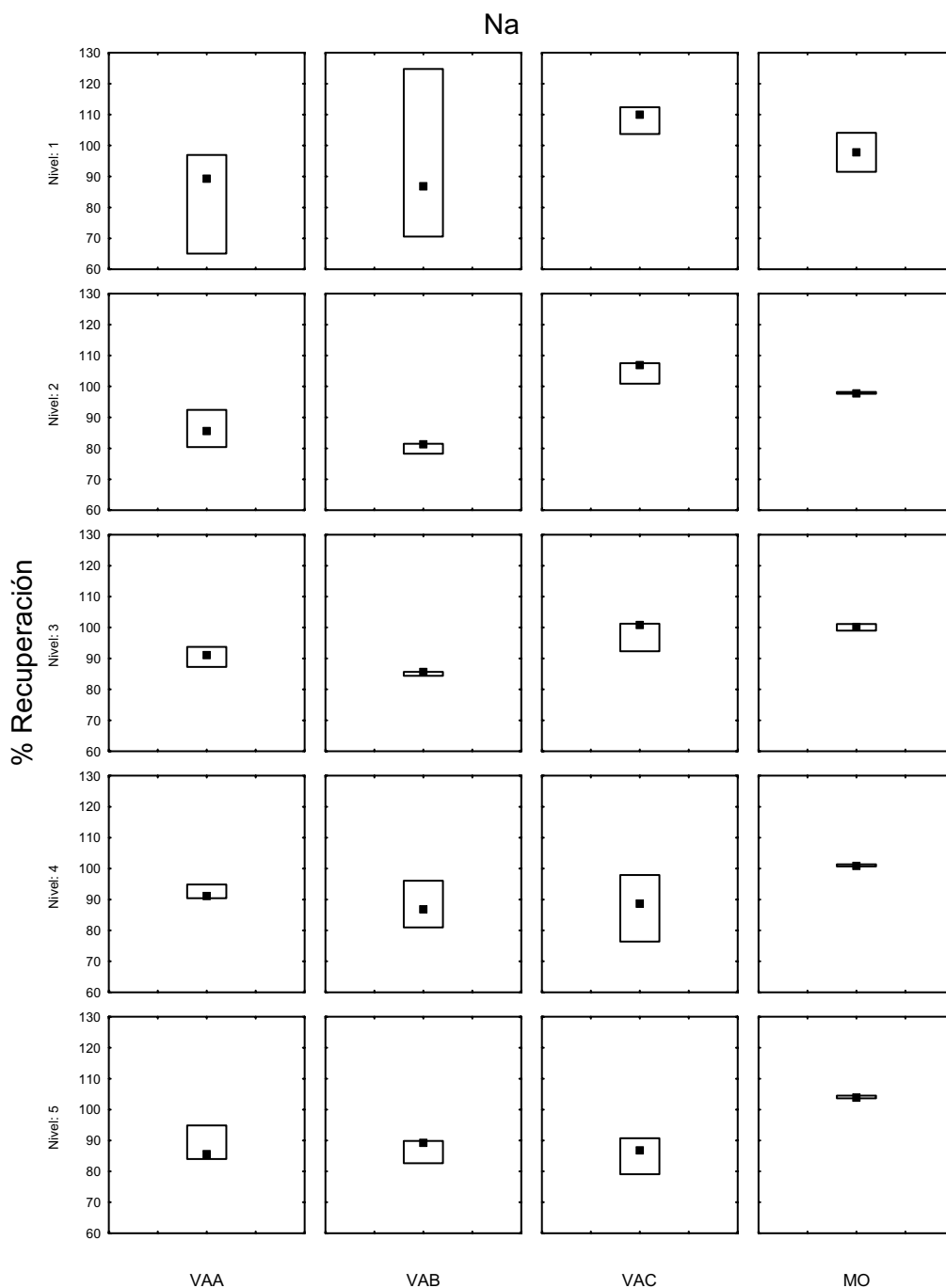


Figura 30. Recuperaciones Na mineralización muestras de tequila

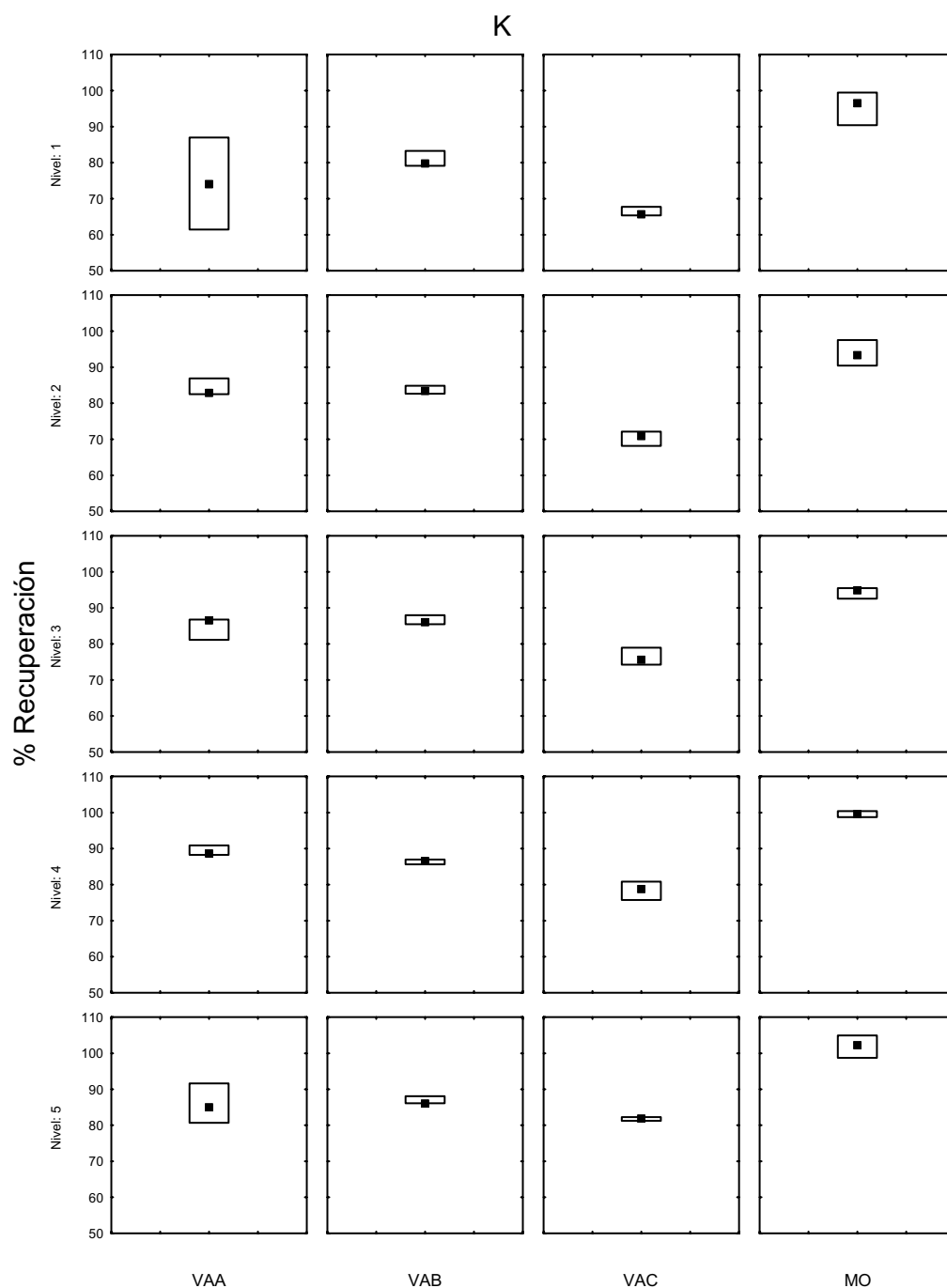


Figura 31. Recuperaciones K mineralización muestras de tequila

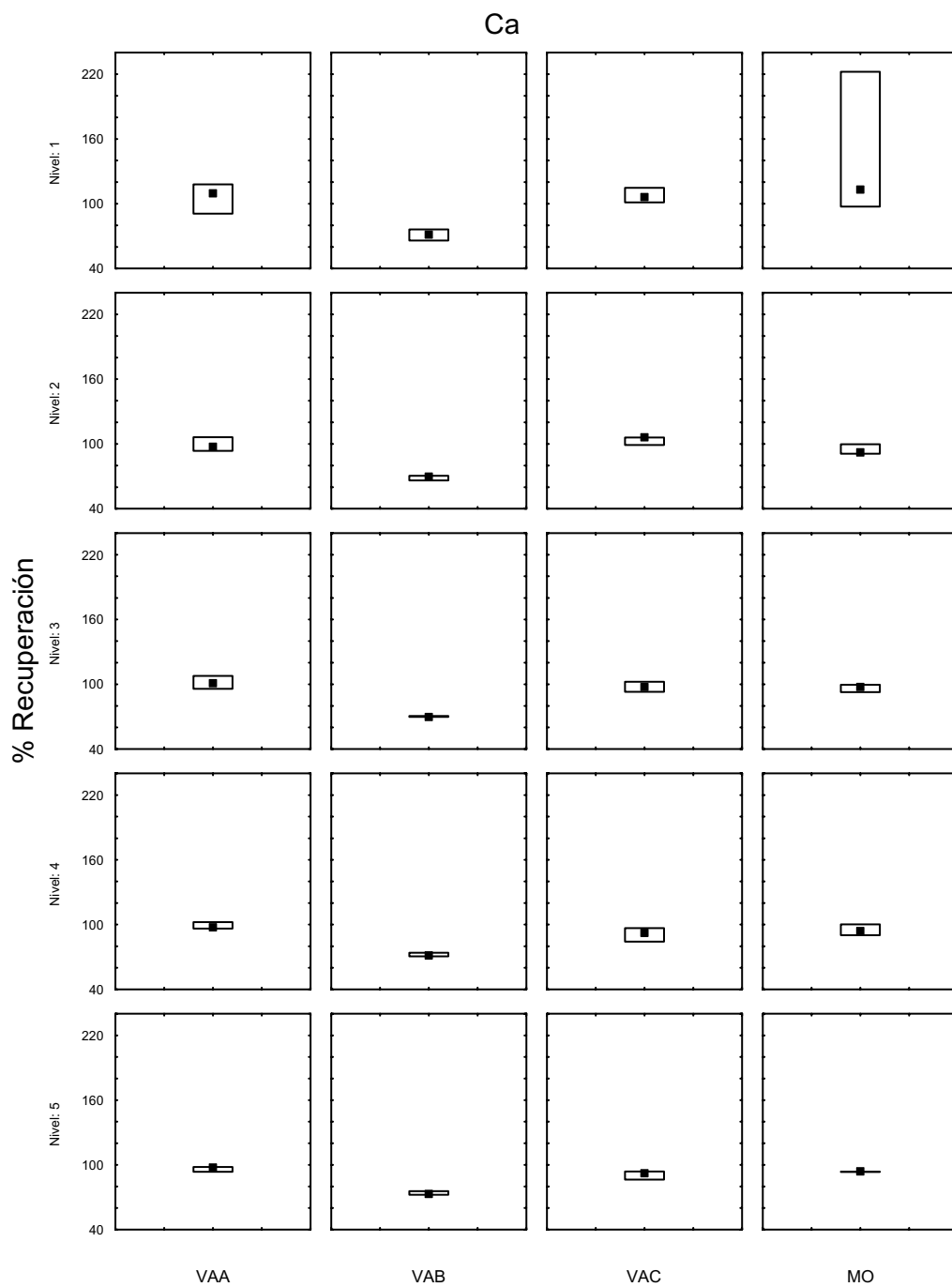


Figura 32. Recuperaciones Ca mineralización muestras de tequila

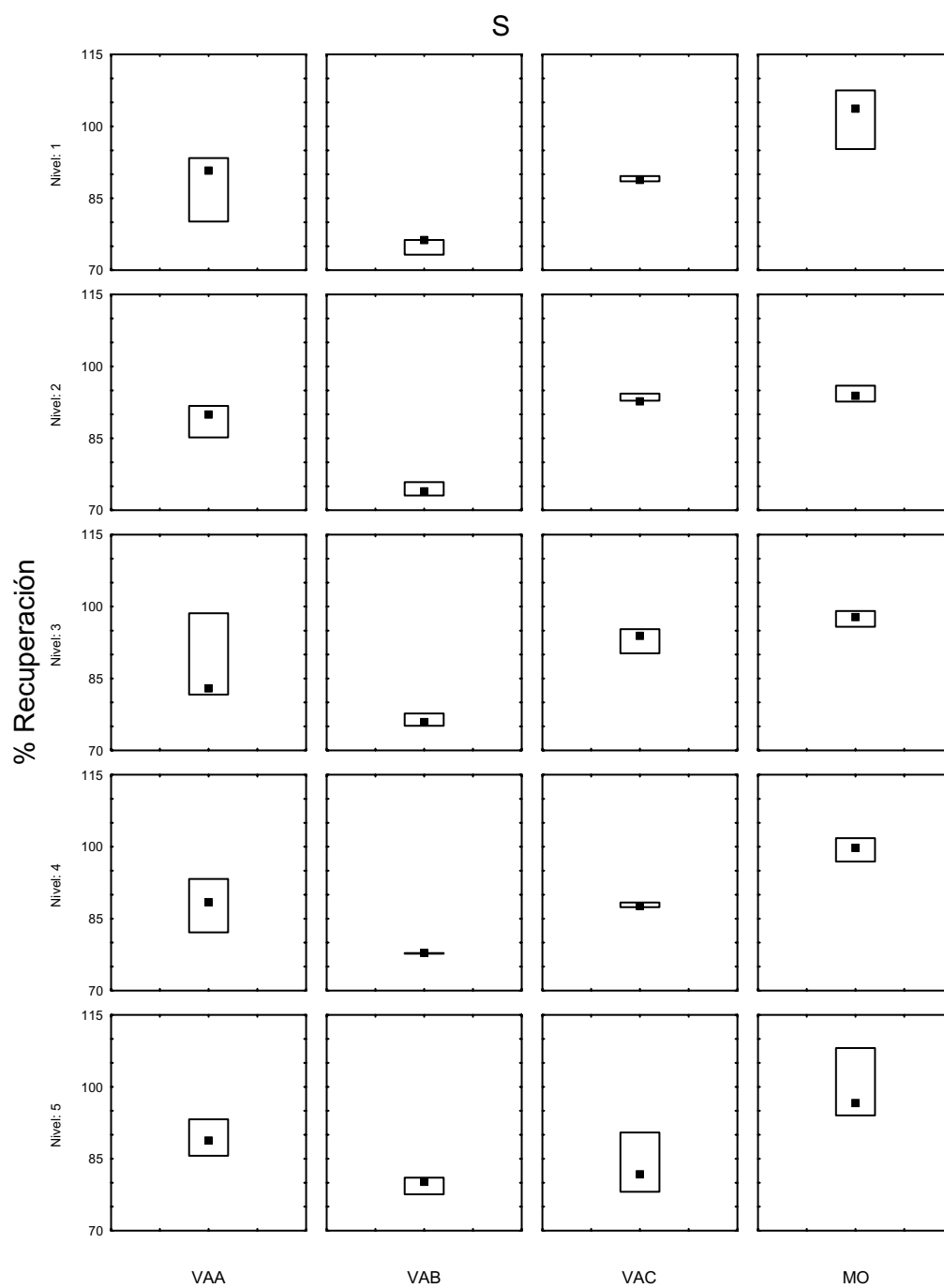


Figura 33. Recuperaciones S mineralización muestras de tequila

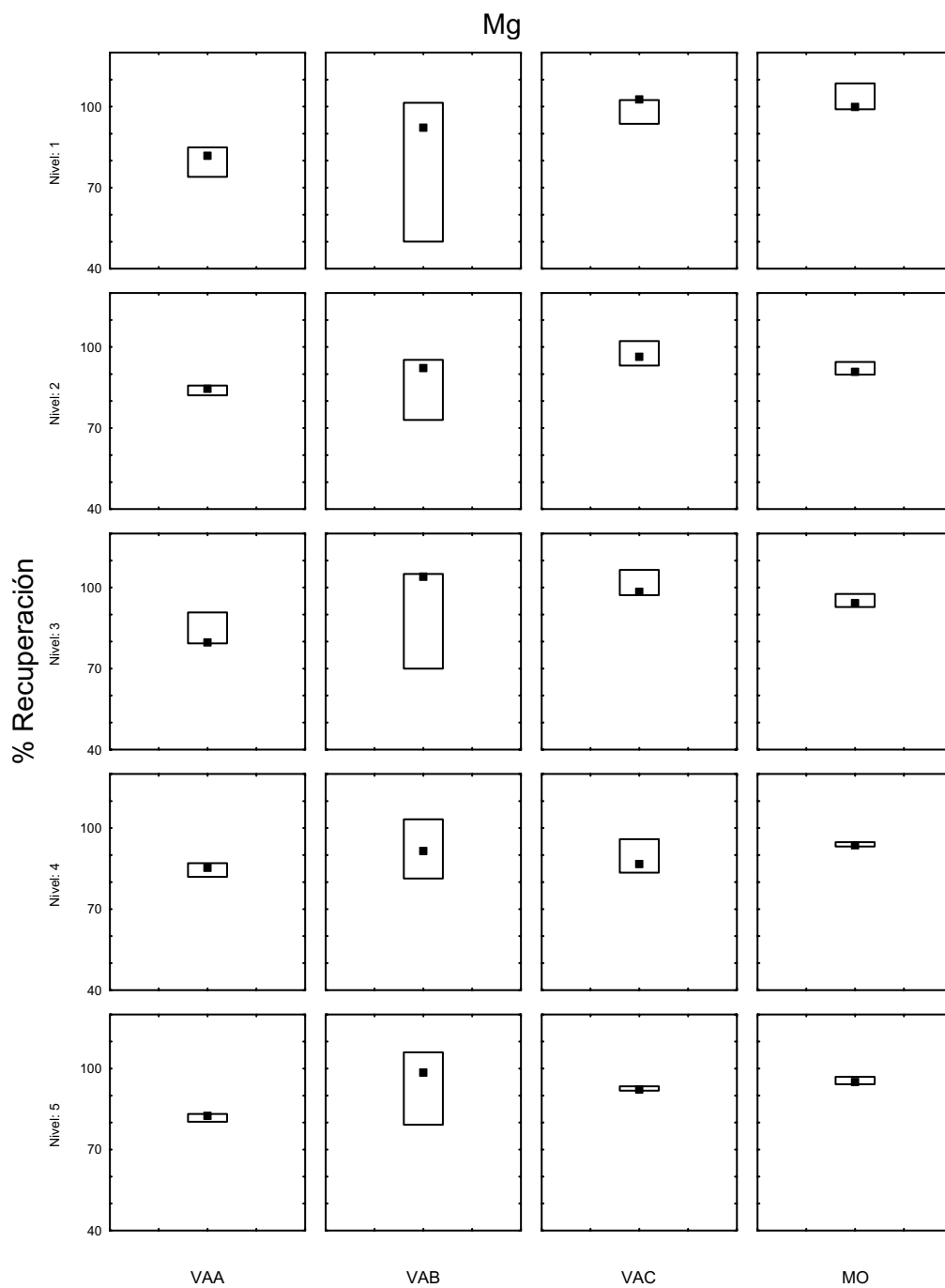


Figura 34. Recuperaciones Mg mineralización muestras de tequila

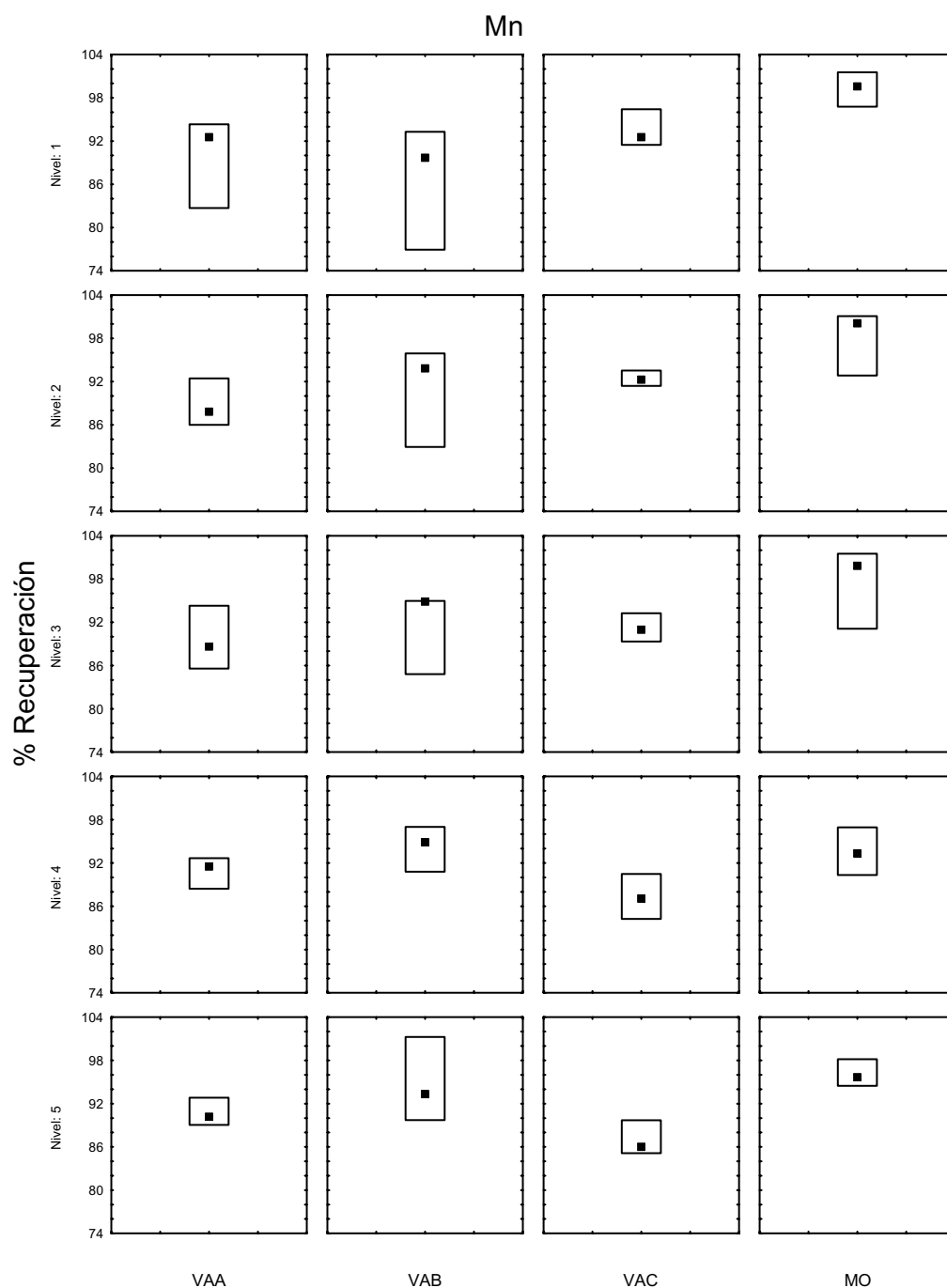


Figura 35. Recuperaciones Mn mineralización muestras de tequila

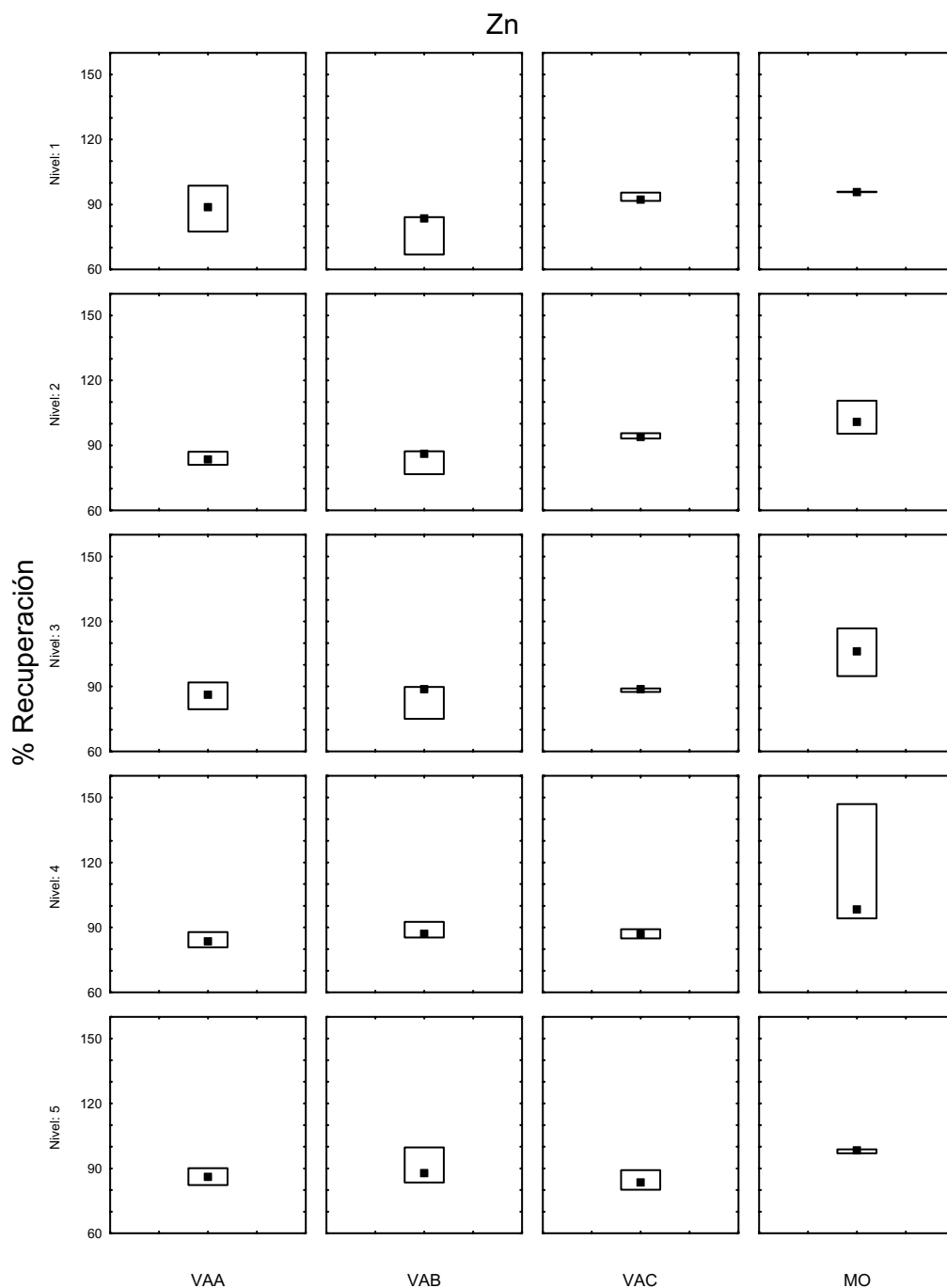


Figura 36. Recuperaciones Zn mineralización muestras de tequila

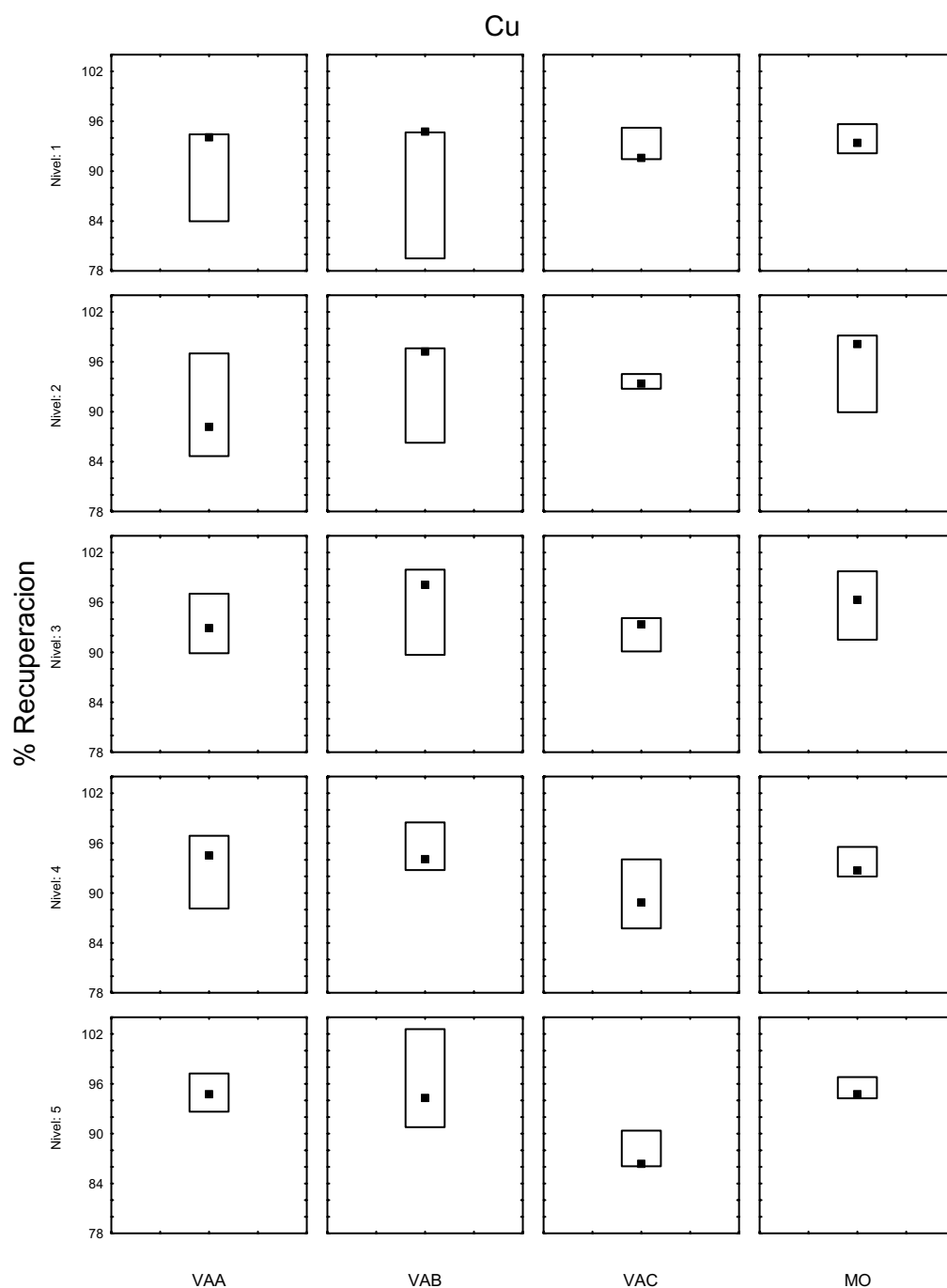


Figura 37. Recuperaciones Cu mineralización muestras de tequila

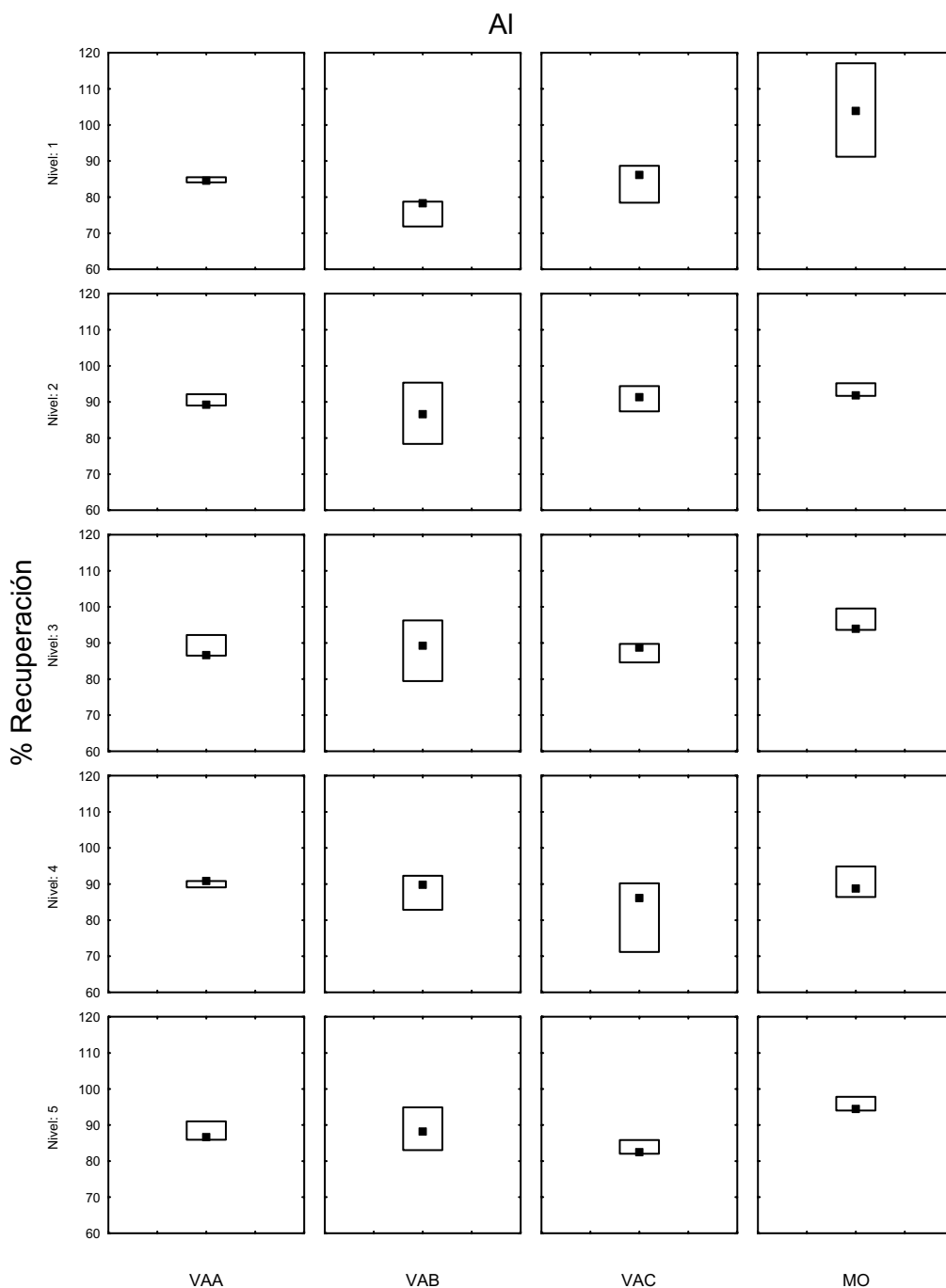


Figura 38. Recuperaciones AI mineralización muestras de tequila

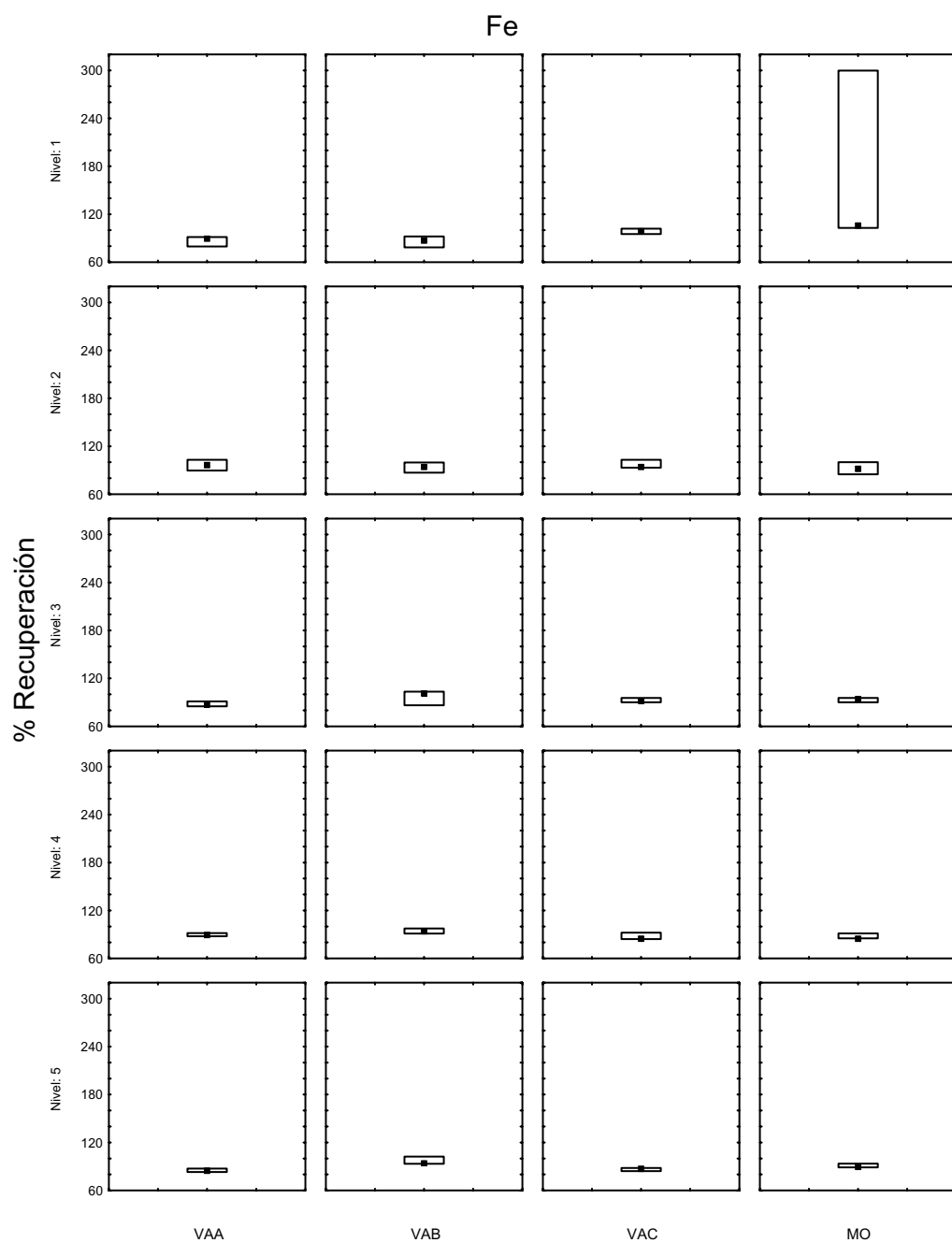


Figura 39. Recuperaciones Fe mineralización muestras de tequila

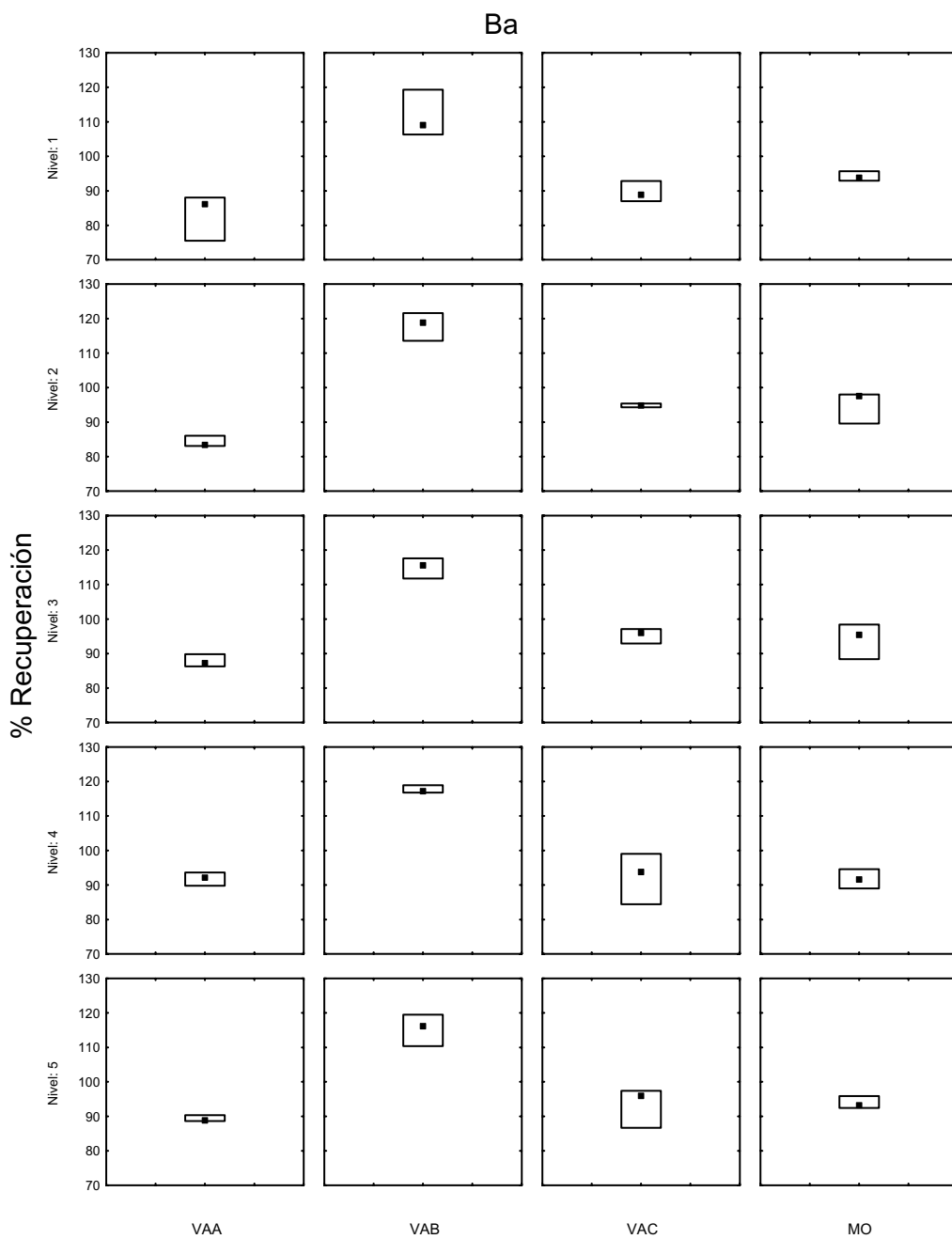


Figura 40. Recuperaciones Ba mineralización muestras de tequila

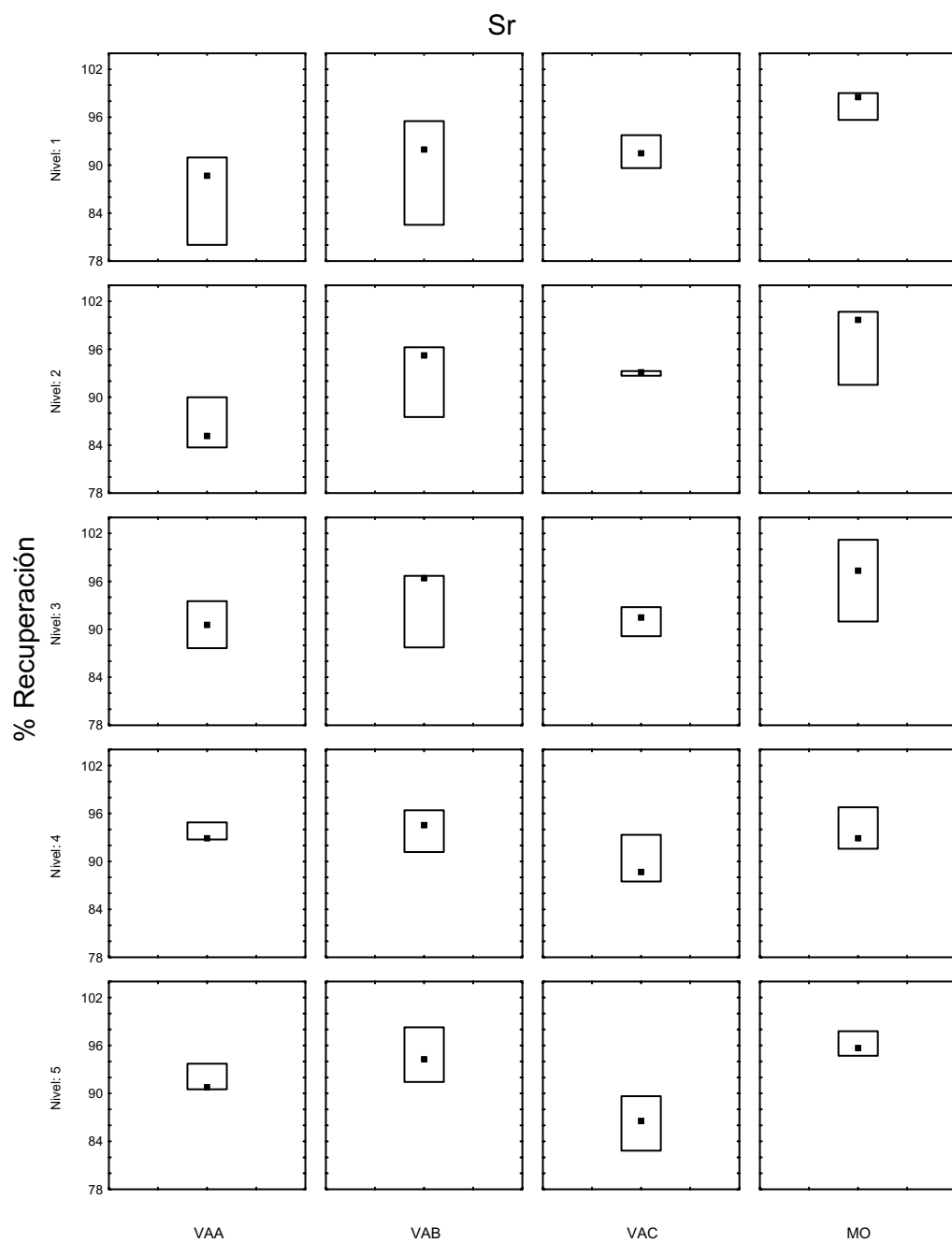


Figura 41. Recuperaciones Sr mineralización muestras de tequila

Para la detección de outliers centrales se realizó un ensayo de Grubbs [173]. Este ensayo se aplica cuando en una serie de resultados encontramos algún valor sospechoso que se diferencia del resto. Se trata de realizar un ensayo estadístico para la detección de valores extremos. En la mayoría de estos ensayos se calcula la distancia relativa del valor sospechoso respecto de la media global y se comprueba, mediante la comparación con valores tabulados, si existen diferencias significativas entre el valor sospechoso y dicha media global. Los ensayos apropiados para detectar outliers dependen del caso que encontremos:

- Un solo valor sospechoso que corresponde con el primero o el último de los valores ordenados.
- Dos valores sospechosos, alejados del resto y en extremos opuestos.
- Dos valores extremos, alejados del resto, pero vecinos entre sí.

Un ejemplo de cada tipo se puede ver en la figura 42.

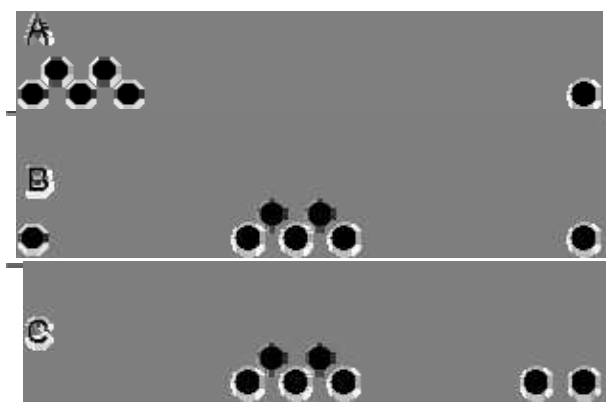


Figura 42. Ejemplos de valores extremos simples (A), dobles separados diametralmente (B) y dobles vecinos (C).

La mayoría de los ensayos detectan un solo outlier (outliers simples), pero no parejas de outliers que se enmascaran mutuamente (outliers dobles). El ensayo de Grubbs permite detectar outliers en los

tres casos anteriormente descritos [173]. La forma de llevar a cabo cada uno de estos ensayos se detalla a continuación.

a) *Ensayo G1 para outliers simples*. Se utiliza para comprobar si un resultado sospechoso es anómalo, es decir, si es mucho mayor o menor que la media de todos los resultados. El estadístico G1 se calcula como:

$$G1 = \frac{|\bar{x} - x_i|}{s} \quad 123$$

Siendo x_i el valor sospechoso, \bar{x} y s la media y desviación estándar, respectivamente, del conjunto global de valores.

b) *Ensayo G2 para outliers dobles separados diametralmente*. Se utiliza en la detección de dos outliers que aparecen uno a cada extremo de los demás resultados. El estadístico G2 se calcula según:

$$G2 = \frac{x_n - x_1}{s} \quad 124$$

Siendo x_n el valor extremo superior de la serie, x_1 el inferior y s la desviación estándar del conjunto de resultados.

c) *Ensayo G3 para outliers dobles vecinos*. Mediante este ensayo se comprueba la posible anomalía de dos valores sospechosos situados en el mismo extremo. El estadístico G3 se calcula:

$$G3 = 1 - \left[\frac{(n-3) \cdot s_{n-2}^2}{(n-1) \cdot s^2} \right] \quad 125$$

Donde n es el número total de valores, s^2 su varianza y s_{n-2}^2 la varianza de los valores excluyendo los dos sospechosos.

Los valores de estos tres estadísticos así calculados se comparan con los valores tabulados para un nivel de confianza dado. Si sus valores son mayores que los obtenidos de las tablas los valores sospechosos se consideraran outliers según el criterio anteriormente establecido.

Dentro de los niveles de concentración para algunos elementos hay valores que son muy diferentes a los demás. Se aplicó el método de Grubbs antes mencionado a estos niveles. En el caso de las digestiones por vaso abierto aunque se observaron valores que se pensaba que podría ser anómalos al aplicar el test de Grubbs no dieron positivo. Es el caso de VAA para el nivel 1 de K y Na. VAB para el nivel 1 del Na y nivel 3 del Mg.

En el método de digestión por microondas sin embargo si existieron valores que dieron positivo en el test de Grubbs. En el nivel 1 del Ca se aplicó el *ensayo G3 para outliers dobles vecinos*, el G3 calculado fue de 0,9845 y es mayor al G3 tabulado para el 99% de confianza (0,9814). También en el nivel 4 del Zn se detectaron posibles outliers, y se aplicó el ensayo correspondiente *G3 para outliers dobles vecinos* el G3 calculado es de 0,9940 siendo mayor que el tabulado al 99% confianza (0,9814). Finalmente, se estudió la presencia de outliers en el nivel 1 del Fe. Al aplicar el test correspondiente para outliers dobles vecinos se obtuvo un G3 calculado de 0,9993 siendo mayor que el tabulado al 99% confianza (0,9814).

En los gráficos que se muestran en las figuras 43-54 se presentan los porcentajes de recuperación promedio con su desviación estándar obtenidos para cada uno de los métodos de digestión testados una vez eliminados los outliers correspondientes.

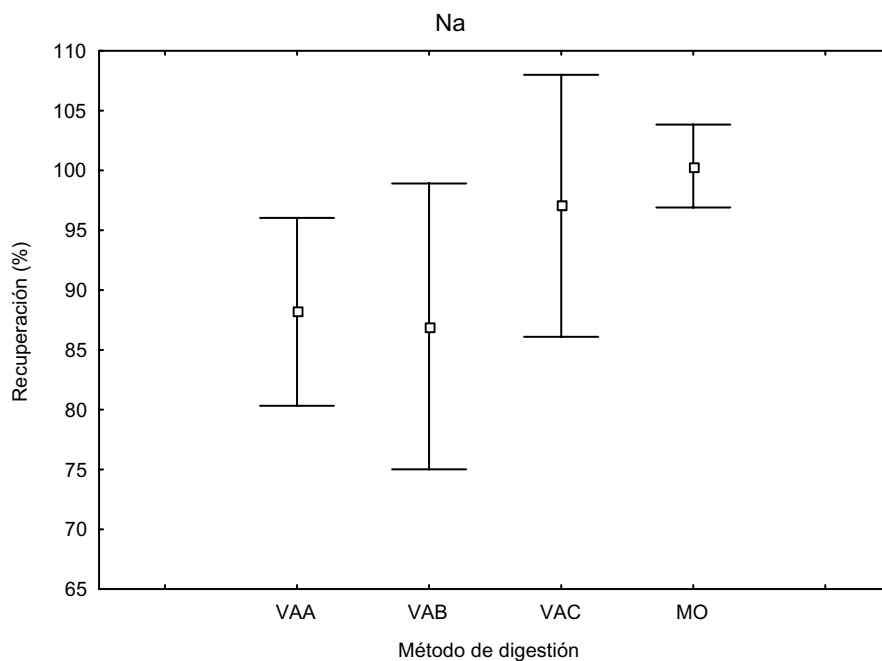


Figura 43. Recuperaciones medias \pm SD para Na mineralización muestras tequila.

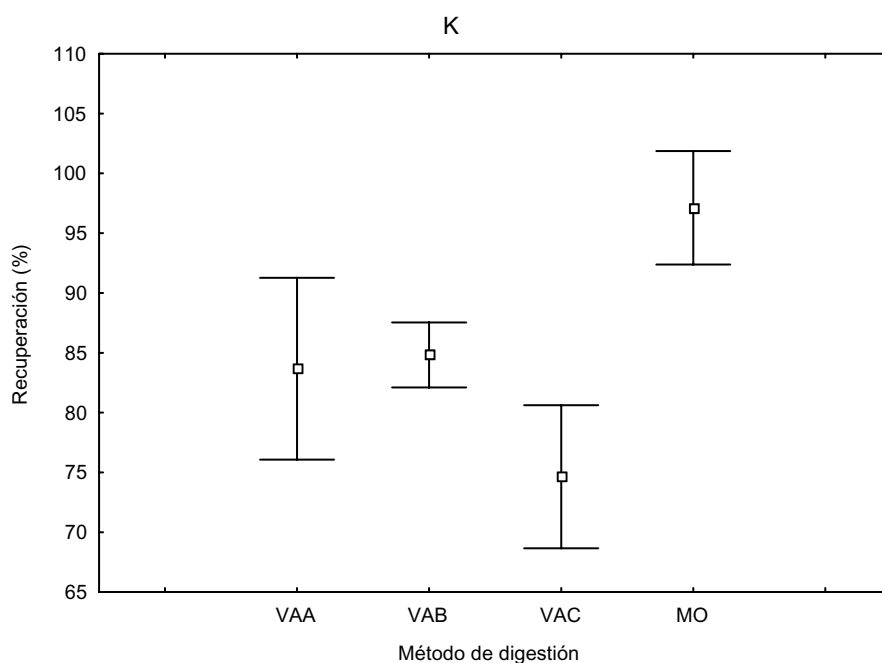


Figura 44. Recuperaciones medias \pm SD para K mineralización muestras tequila.

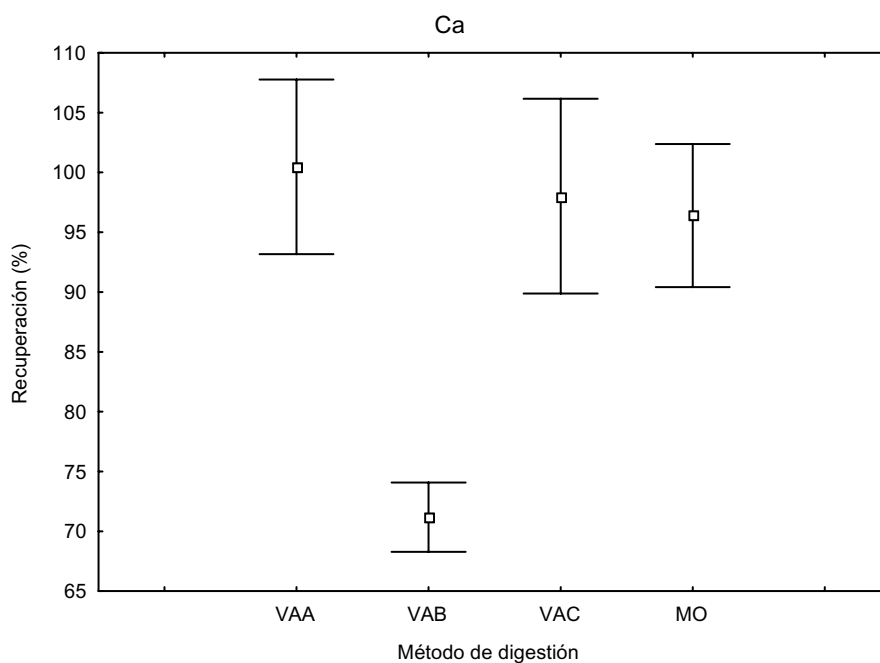


Figura 45. Recuperaciones medias \pm SD para Ca mineralización muestras tequila.

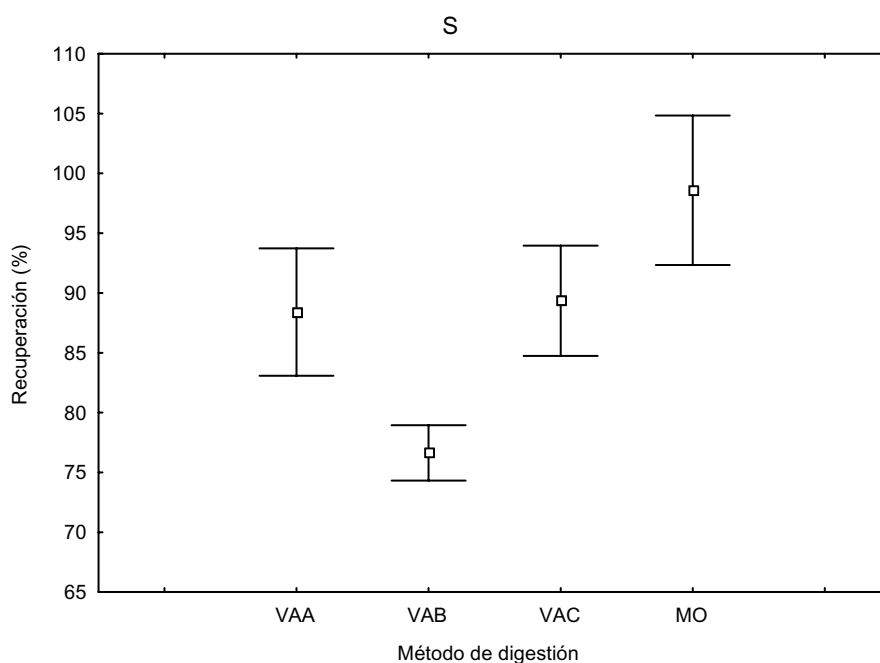


Figura 46. Recuperaciones medias \pm SD para S mineralización muestras tequila.

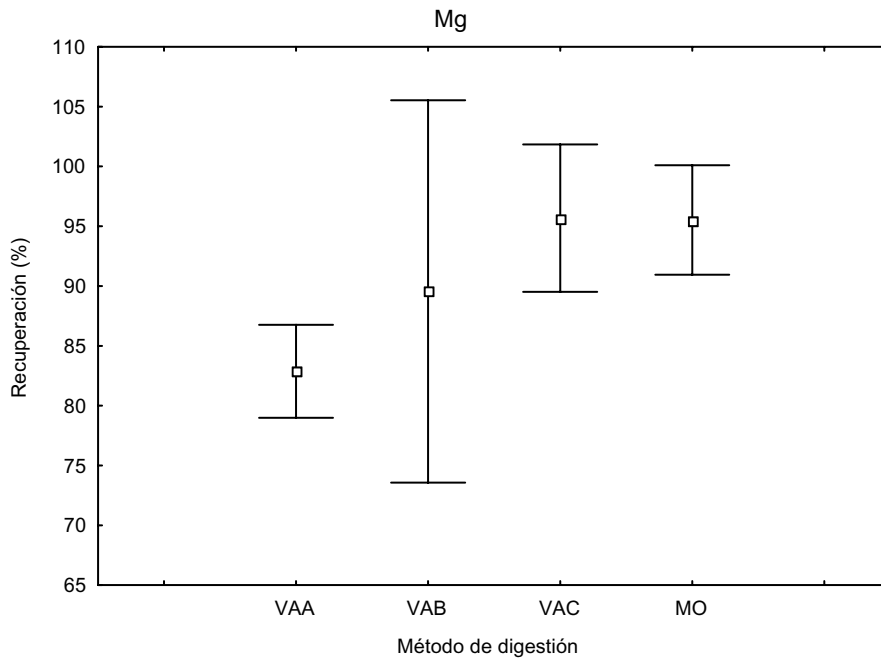


Figura 47. Recuperaciones medias \pm SD para Mg mineralización muestras tequila.

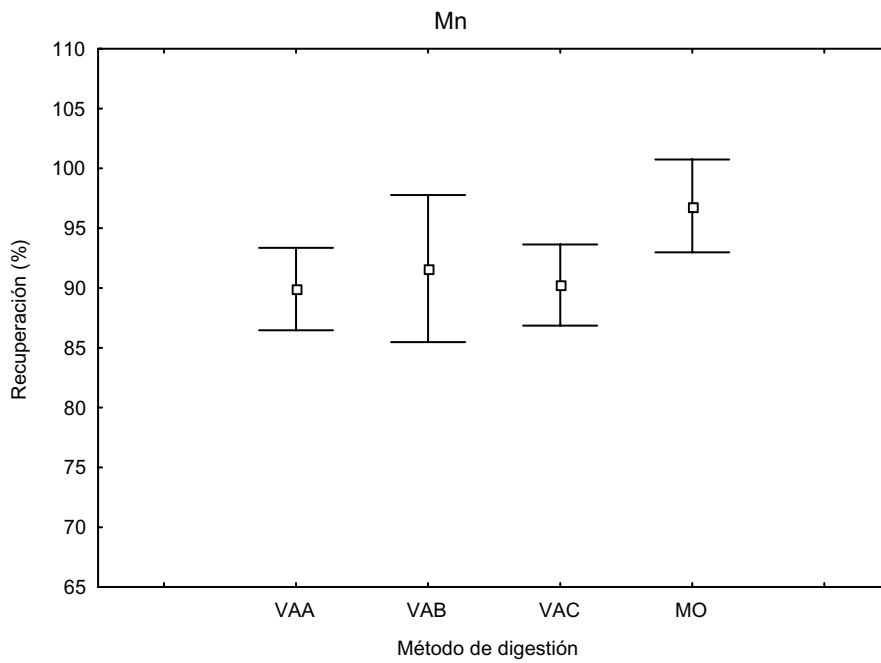


Figura 48. Recuperaciones medias \pm SD para Mn mineralización muestras tequila.

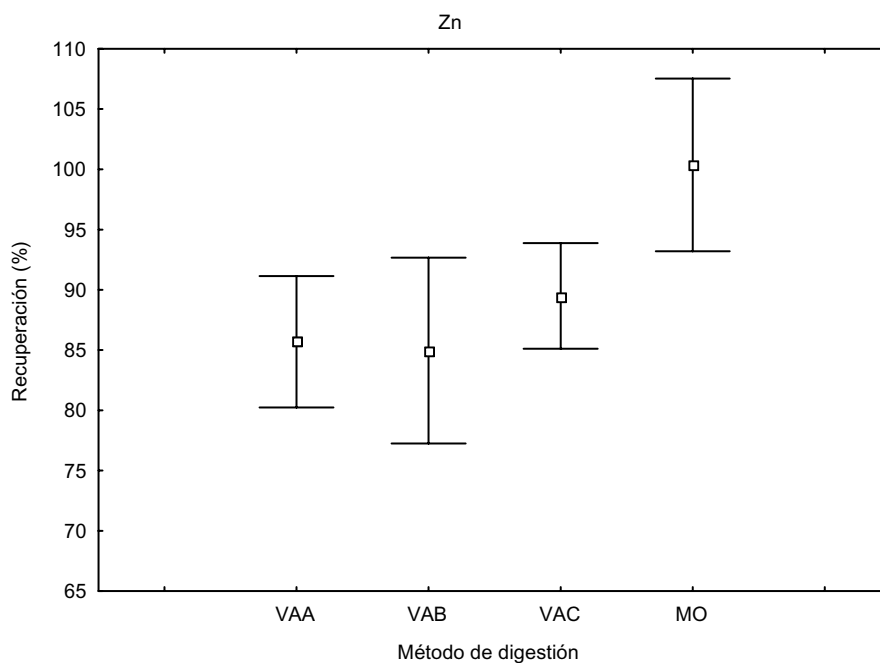


Figura 49. Recuperaciones medias \pm SD para Zn mineralización muestras tequila.

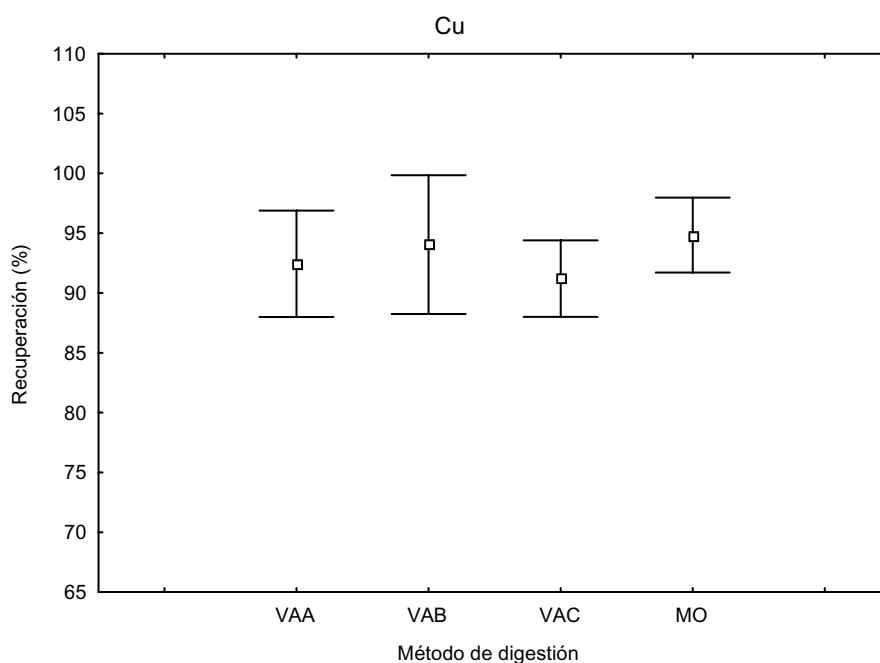


Figura 50. Recuperaciones medias \pm SD para Cu mineralización muestras tequila.

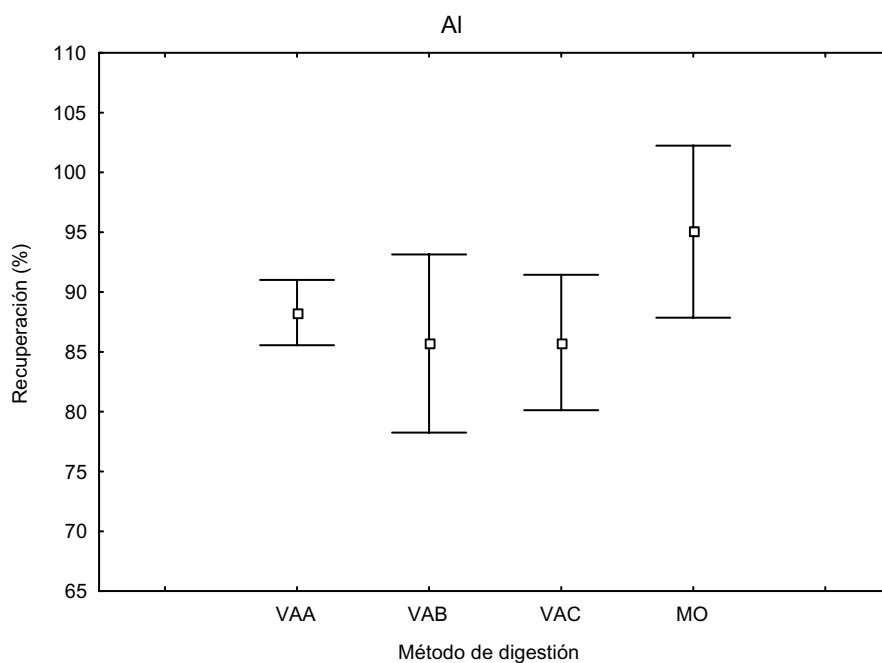


Figura 51. Recuperaciones medias \pm SD para Al mineralización muestras tequila.

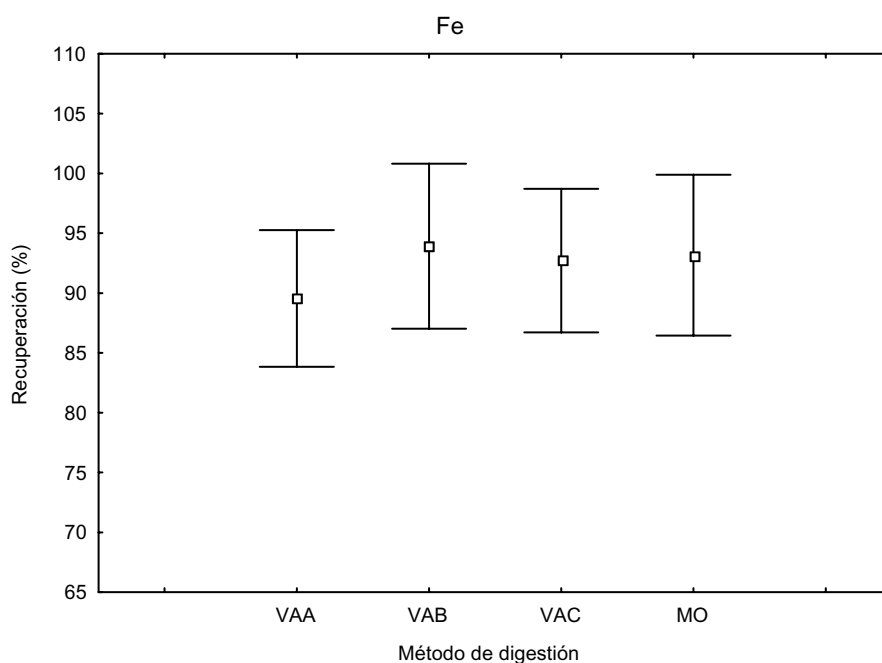


Figura 52. Recuperaciones medias \pm SD para Fe mineralización muestras tequila.

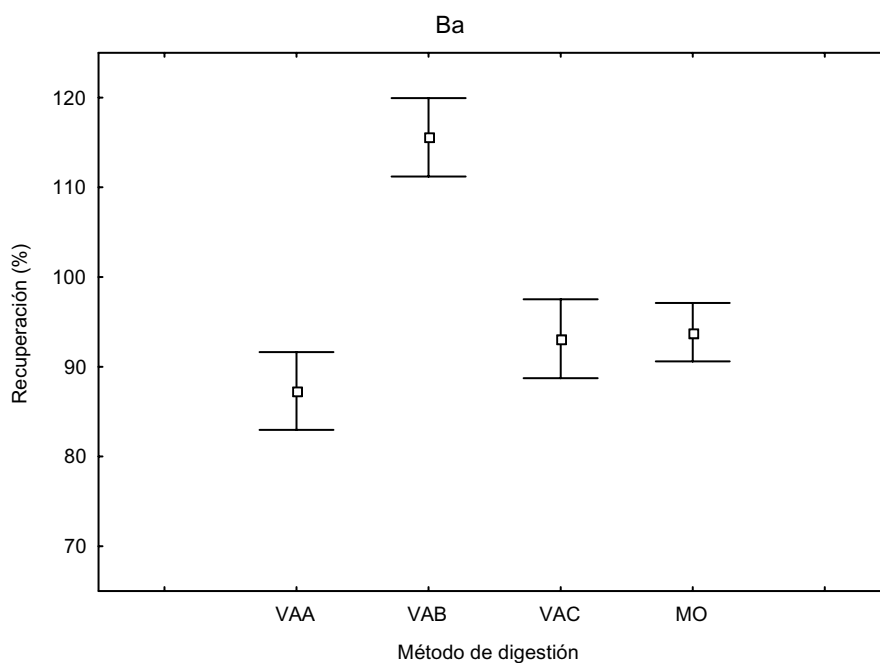


Figura 53. Recuperaciones medias \pm SD para Ba mineralización muestras tequila.

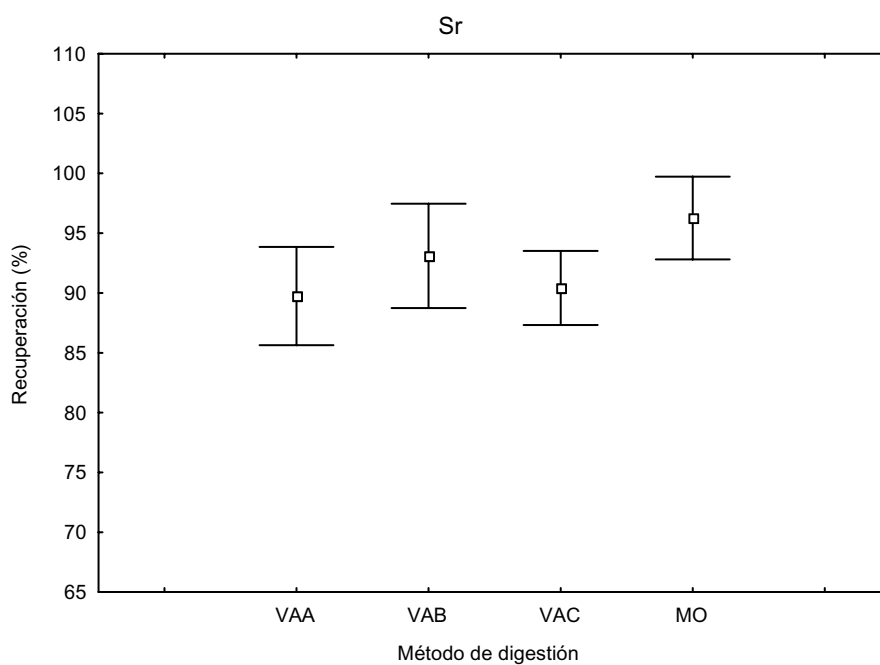


Figura 54. Recuperaciones medias \pm SD para Sr mineralización muestras tequila.

La tabla 10 muestra las recuperaciones medias obtenidas para cada uno de los elementos analizados por los cuatro métodos de digestión considerados con sus respectivas incertidumbres expandidas (U).

Tabla 10. Recuperaciones* métodos de digestión

Elemento	VAA	VAB	VAC	MO
Na	88 ± 7	87 ± 10	97 ± 20	100 ± 5
K	84 ± 10	85 ± 5	75 ± 12	97 ± 7
Ca	100 ± 7	71 ± 4	98 ± 15	97 ± 9
S	88 ± 2	77 ± 4	89 ± 8	99 ± 5
Mg	83 ± 4	93 ± 8	96 ± 10	96 ± 8
Mn	89 ± 2	92 ± 6	90 ± 6	97 ± 4
Zn	86 ± 4	85 ± 10	90 ± 8	99 ± 9
Cu	92 ± 4	94 ± 5	91 ± 5	95 ± 2
Ba	87 ± 7	116 ± 5	93 ± 5	94 ± 2
Fe	90 ± 9	94 ± 9	93 ± 11	94 ± 9
Al	88 ± 5	86 ± 11	86 ± 7	96 ± 9
Sr	90 ± 6	93 ± 4	90 ± 5	96 ± 3

% ± U. n= 3

Se puede observar que para los tratamientos realizados en vaso abierto las recuperaciones, en algunos casos, son menores del 80%, como ocurre con Ca y S en VAB, y para el K en VAC. Además, algunos de los valores de incertidumbre son 10 o mayores como el K en VAA, Mg, Na, Zn y Al en VAB y Na, K, Ca y Mg para VAC.

En el método que utiliza la mezcla HNO₃/ V₂O₅ con microondas se obtuvieron recuperaciones próximas a 100% en todos los casos. Todos los valores están dentro del rango 80-110% propuesto por la AOAC [174] para la validación de la exactitud en los rangos de concentración

ensayados. La incertidumbre expandida presenta valores inferiores a 10. Dado que el procedimiento se lleva a cabo en un reactor de teflón cerrado herméticamente disminuye la posibilidad de contaminación y pérdida por volatilización. Por ello, el método elegido para llevar la mineralización de las muestras fue el que utiliza la mezcla $\text{HNO}_3/\text{V}_2\text{O}_5$ y microondas.

IV.1.2 Parámetros de calidad del método

Como se ha indicado en el apartado anterior, la exactitud del método se estudió mediante ensayos de recuperación. Asimismo, los valores de recuperación obtenidos para el método de mineralización seleccionado se encuentran en la tabla 10 ya comentada.

La precisión del método se estudió en condiciones intermedias, repitiendo el análisis de una misma muestra cuatro veces a lo largo de un periodo de 2 meses. En la tabla 11 se muestran los resultados obtenidos para cada elemento. Los valores oscilan entre 1 y 10%.

El rango lineal para cada elemento se estudió de acuerdo a la concentración existente en las muestras de tequila. Se determinó la linealidad (%) a partir de la pendiente de la recta de calibrado y su desviación estándar [175], siendo todos los valores mayores al 98%.

Para el estudio de la sensibilidad se calcularon los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) [176], que se obtuvieron a partir de las medidas de la señal del blanco. Las desviaciones estándar correspondientes a la señal del blanco se multiplicaron por 3 y por 10, respectivamente para obtener LOD y LOQ. Estos valores se dividieron por la pendiente para expresarlos como concentración. Los datos

correspondientes a la precisión, linealidad, LOD, LOQ y el rango lineal calculados para cada uno de los elementos se presentan en la tabla 11.

Tabla 11. Precisión, linealidad, LOD y LOQ

Elemento	Linealidad (%)	LOD (mg/l)	LOQ (mg/l)	Precisión intermedia %
Na	99,50	0,018	0,061	7
K	99,09	0,071	0,235	5
Ca	99,35	0,017	0,057	1
S	98,79	0,007	0,022	8
Mg	99,09	0,002	0,009	10
Mn	99,39	0,001	0,006	3
Al	99,16	0,006	0,021	9
Sr	99,33	0,0008	0,0029	10
Zn	99,64	0,023	0,078	2
Cu	99,67	0,003	0,0099	5
Ba	99,24	0,001	0,003	2
Fe	99,45	0,035	0,119	1

LOD: límite de detección; LOQ: límite de cuantificación

Las figuras 55-66 representan las rectas de calibrado obtenidas junto con su ecuación correspondiente y el coeficiente de correlación para cada uno de los elementos analizados.

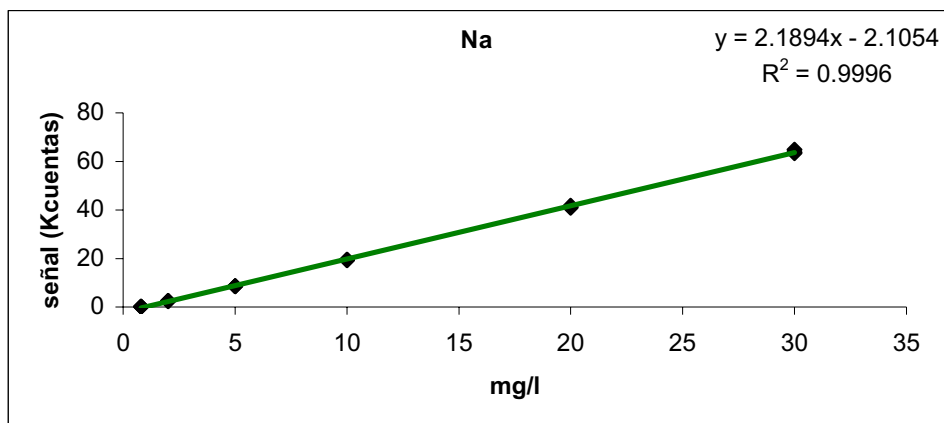


Figura 55. Recta de calibrado del sodio.

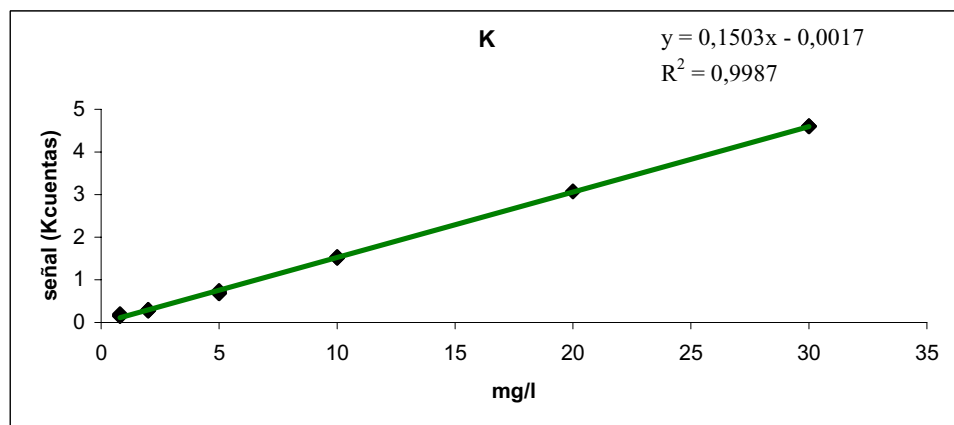


Figura 56. Recta de calibrado del potasio.

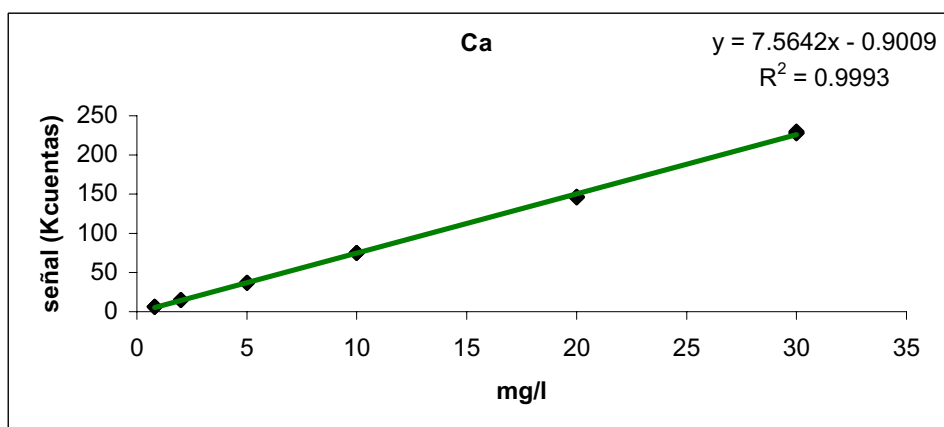


Figura 57. Recta de calibrado del calcio.

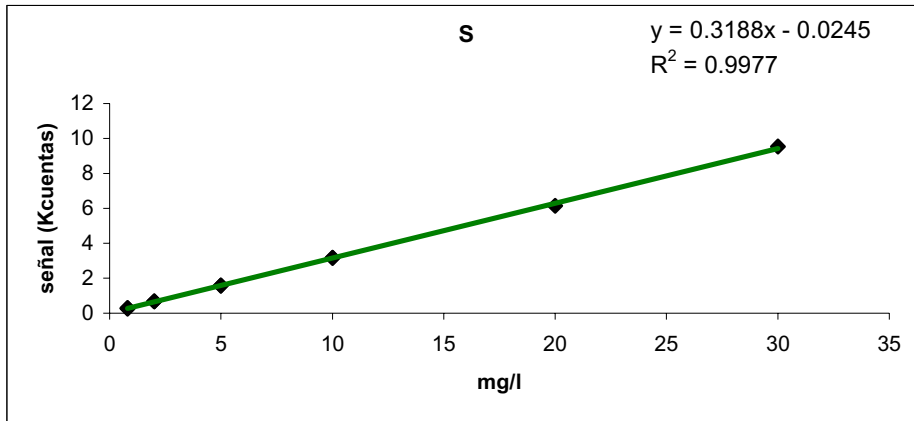


Figura 58. Recta de calibrado del azufre.

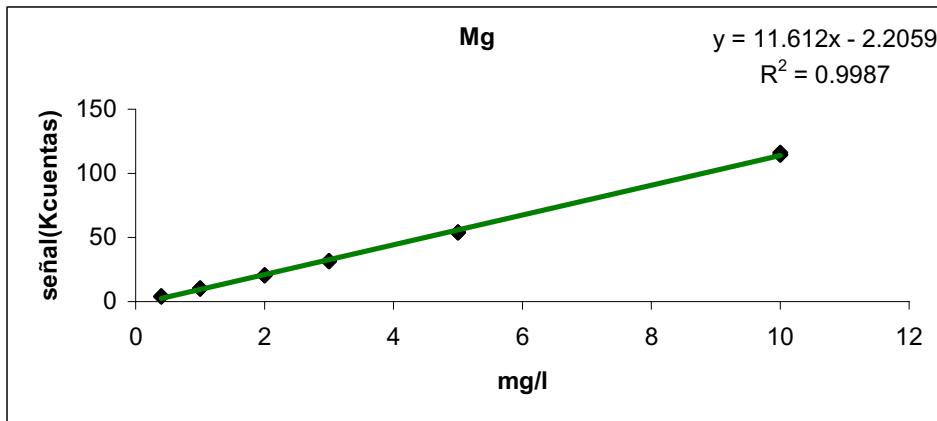


Figura 59. Recta de calibrado del magnesio.

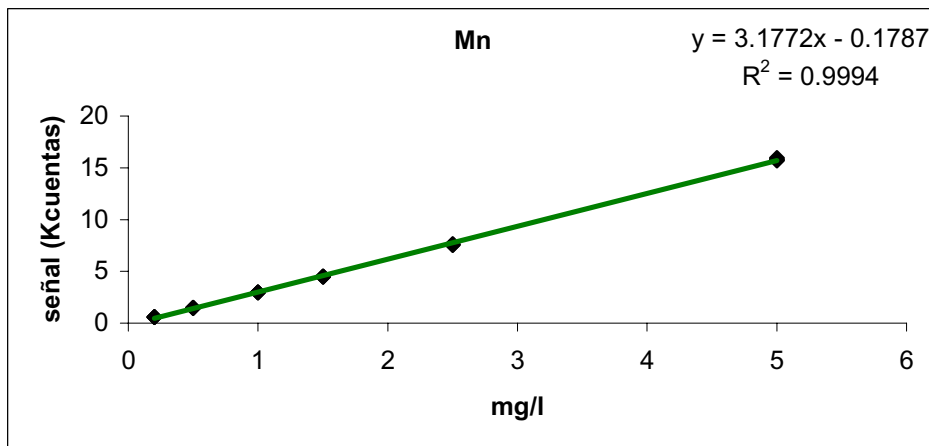


Figura 60. Recta de calibrado del manganeso.

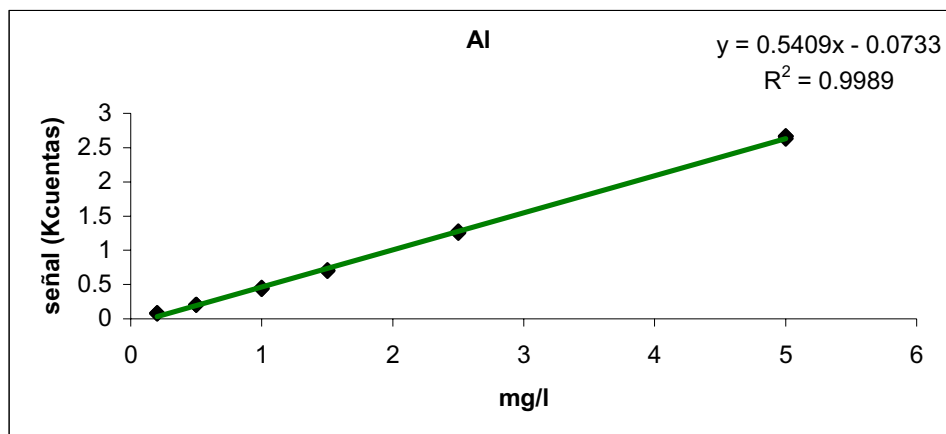


Figura 61. Recta de calibrado del aluminio.

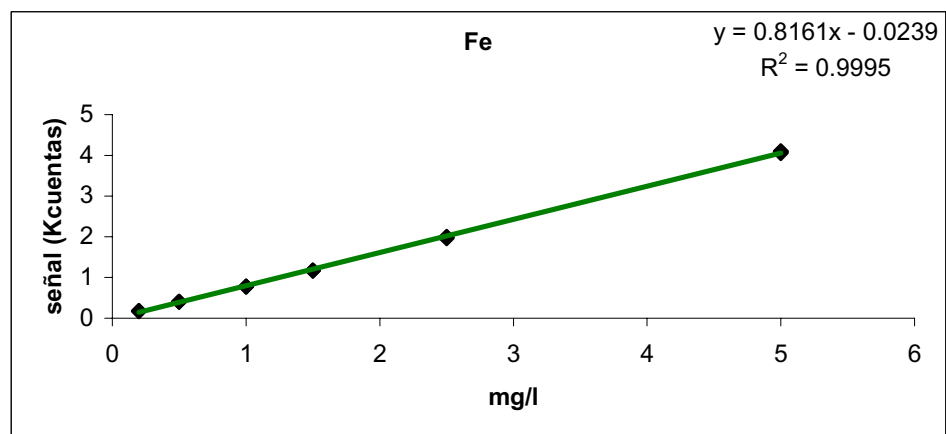


Figura 62. Recta de calibrado del hierro.

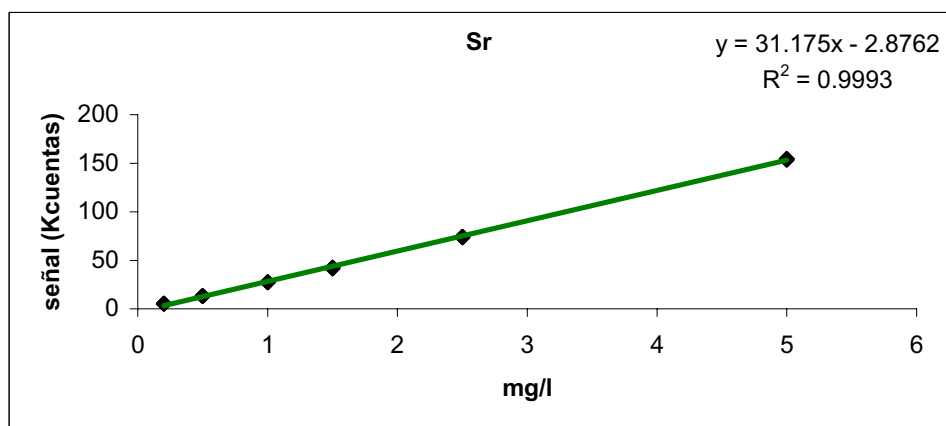


Figura 63. Recta de calibrado del estroncio.

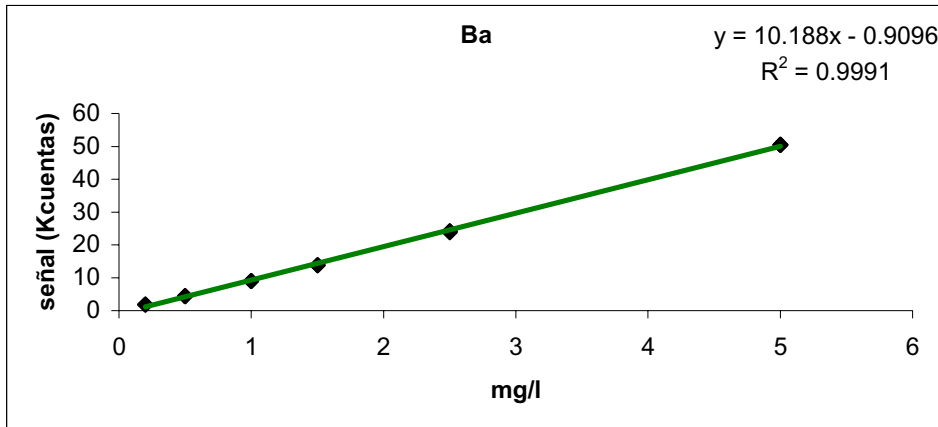


Figura 64. Recta de calibrado del bario.

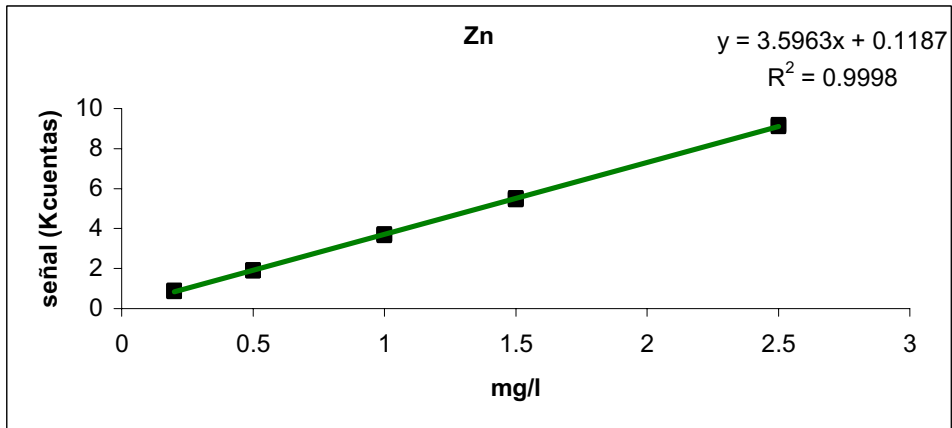


Figura 65. Recta de calibrado del zinc.

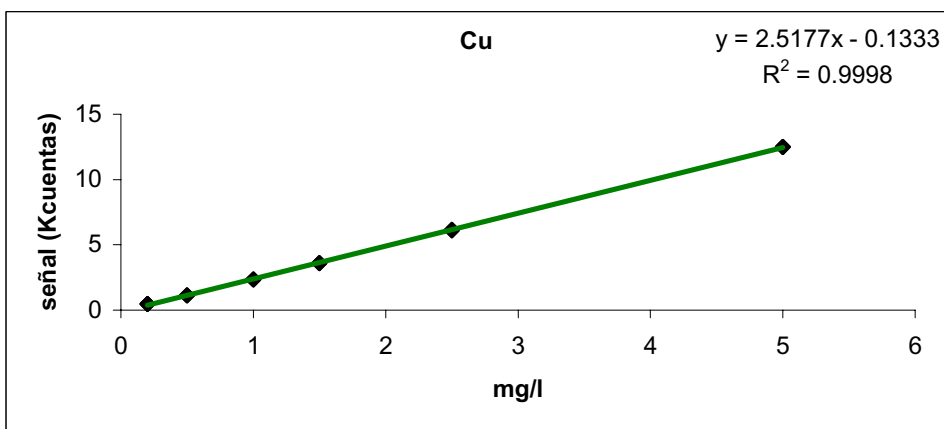


Figura 66. Recta de calibrado del cobre.

En la tabla 12 se resumen los valores de los parámetros de calibración obtenidos.

Tabla 12. Parámetros de calibración de metales analizados.

Elemento	Rango lineal (mg/l)	b	S _b	a	S _a	S _{x/y}	r
Na	0,8 - 30	2,19	0,01	-2,1	0,2	0,49	0,9998
K	0,8 - 30	0,150	0,001	-0,002	0,021	0,06	0,9993
Ca	0,8 - 30	7,56	0,05	-0,9	0,7	2,18	0,9997
S	0,8 - 30	0,319	0,004	-0,02	0,05	0,17	0,9988
Mg	0,4 - 10	11,6	0,1	-2,2	0,5	1,45	0,9993
Mn	0,2 - 5	3,18	0,02	-0,17	0,04	0,13	0,9997
Al	0,2 - 5	0,541	0,004	-0,07	0,01	0,03	0,9994
Sr	0,2 - 5	31,2	0,2	-2,9	0,5	1,43	0,9993
Zn	0,2 - 5	3,60	0,01	0,11	0,01	0,04	0,9999
Cu	0,2 - 5	2,518	0,008	-0,13	0,02	0,06	0,9999
Ba	0,2 - 5	10,19	0,08	-0,9	0,2	0,52	0,9995
Fe	0,2 - 5	0,816	0,004	-0,02	0,01	0,03	0,9998

b: pendiente de la recta de calibrado; S_b: desviación estándar de la pendiente; a: ordenada en el origen; S_a: desviación estándar de la ordenada; S_{x/y}: error típico de la recta de calibrado; r: coeficiente de correlación.

IV.1.3 Contenido metálico de tequila y mezcal

Una vez realizada la validación, el contenido de Na, K, Ca, S, Mg, Mn, Al, Sr, Zn, Cu, Ba y Fe se determinó según el método propuesto en muestras de tequila y mezcal. Cada muestra fue analizada por triplicado. La concentración de metales encontrada en cada una de las muestras analizadas y su desviación estándar se presentan en el apéndice I.

Para una mejor visualización de los datos obtenidos las figuras 67-78 incluyen los gráficos de caja y bigotes correspondientes a las concentraciones de metales encontradas para cada tipo de tequila: blanco (B), oro (G), reposado (R) y añejo (A) y para el mezcal (M).

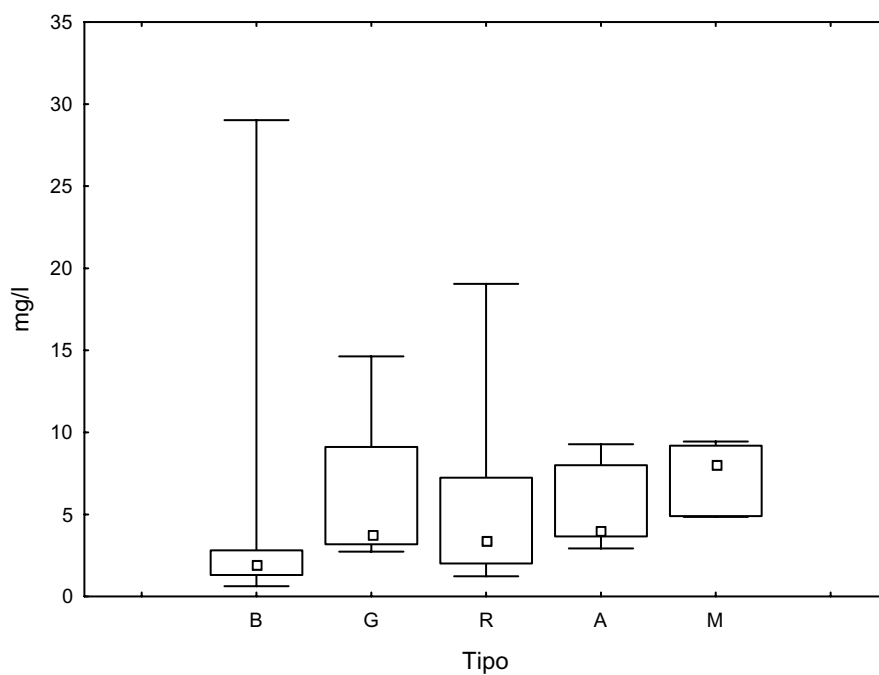


Figura 67. Contenido de Na en bebidas de tequila y mezcal. B, blanco; G, oro; R, reposado; A, añejo; M, mezcal.

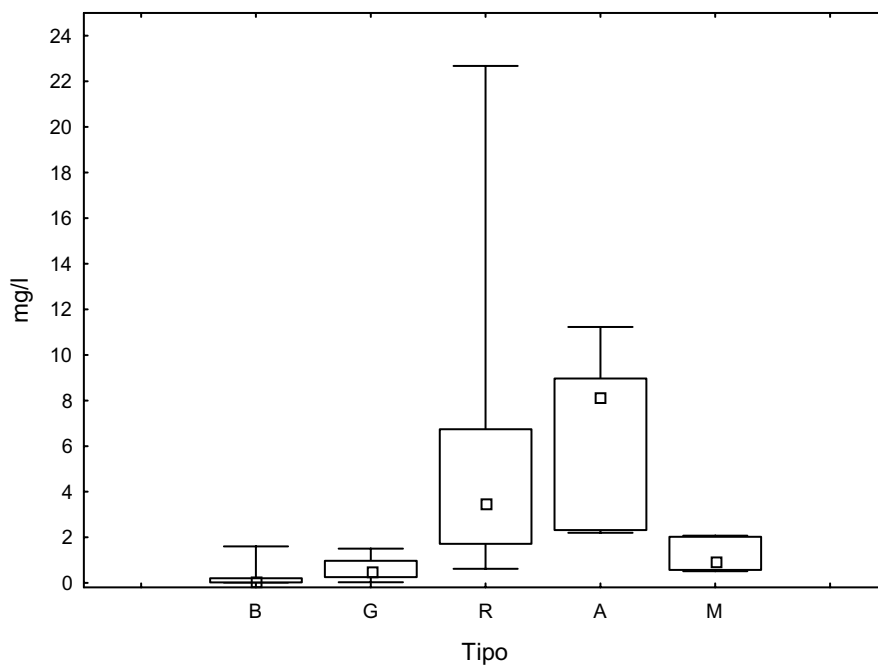


Figura 68. Contenido de K en bebidas de tequila y mezcal. B, blanco; G, oro; R, reposado; A, añejo; M, mezcal.

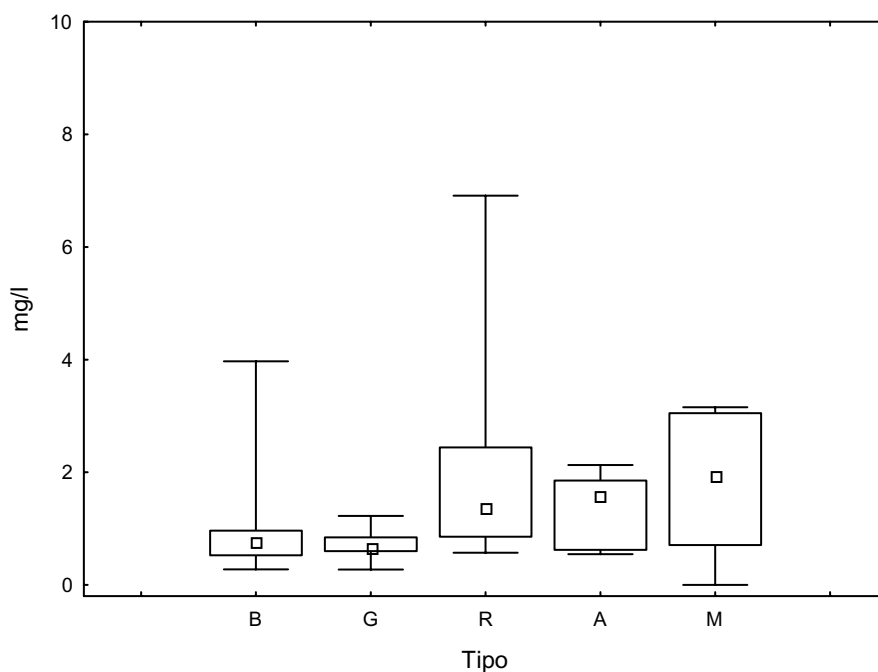


Figura 69. Contenido de Ca en bebidas de tequila y mezcal. B, blanco; G, oro; R, reposado; A, añejo; M, mezcal.

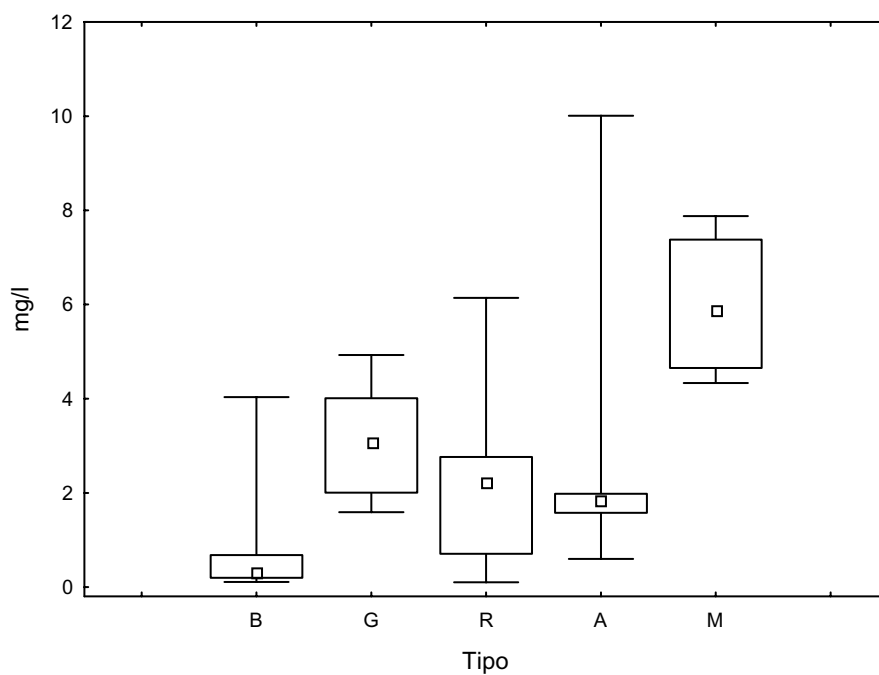


Figura 70. Contenido de S en bebidas de tequila y mezcal. B, blanco; G, oro; R, reposado; A, añejo; M, mezcal.

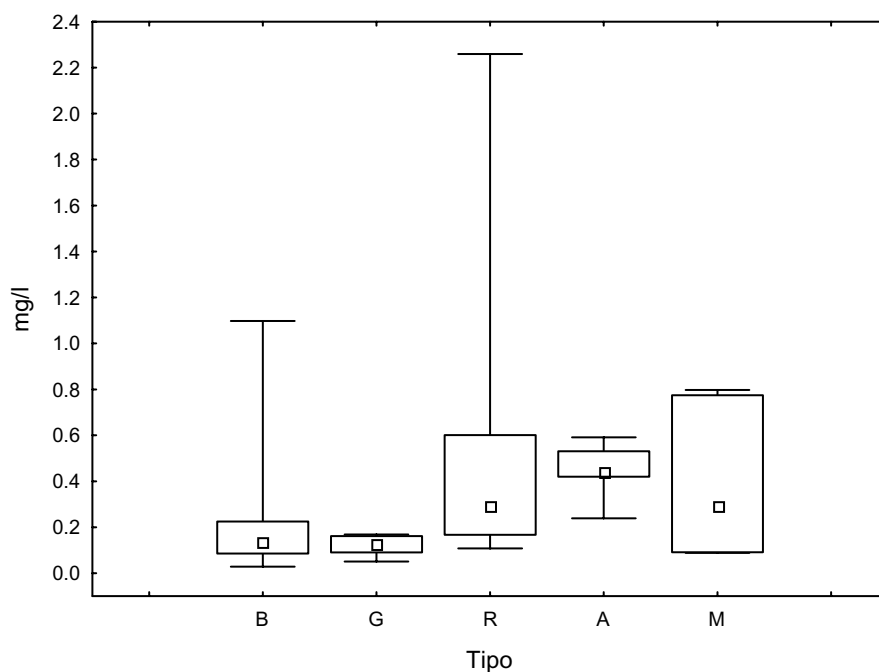


Figura 71. Contenido de Mg en bebidas de tequila y mezcal. B, blanco; G, oro; R, reposado; A, añejo; M, mezcal.

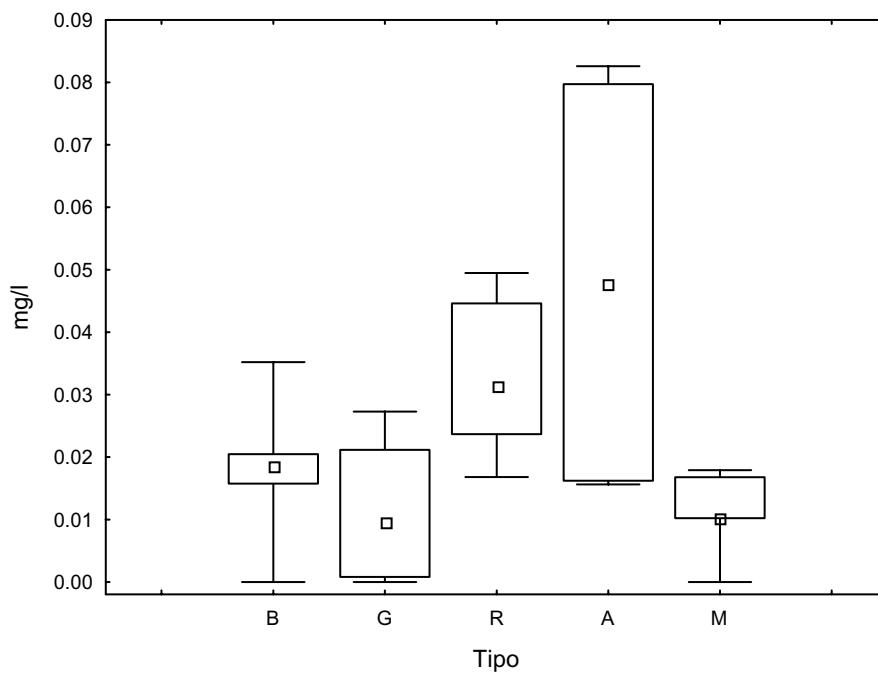


Figura 72. Contenido de Mn en bebidas de tequila y mezcal. B, blanco; G, oro; R, reposado; A, añejo; M, mezcal.

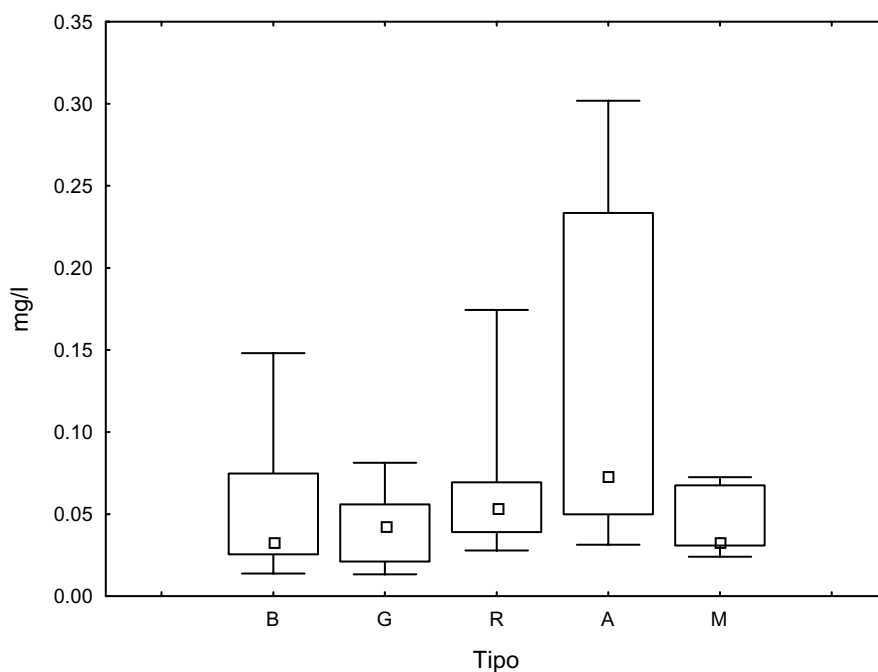


Figura 73. Contenido de Fe en bebidas de tequila y mezcal. B, blanco; G, oro; R, reposado; A, añejo; M, mezcal.

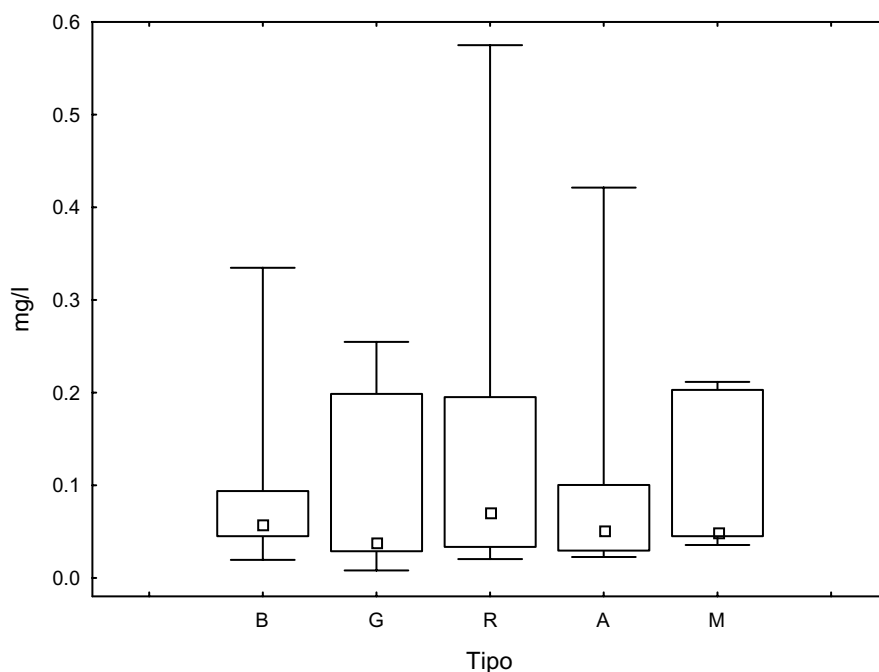


Figura 74. Contenido de Zn en bebidas de tequila y mezcal. B, blanco; G, oro; R, reposado; A, añejo; M, mezcal.

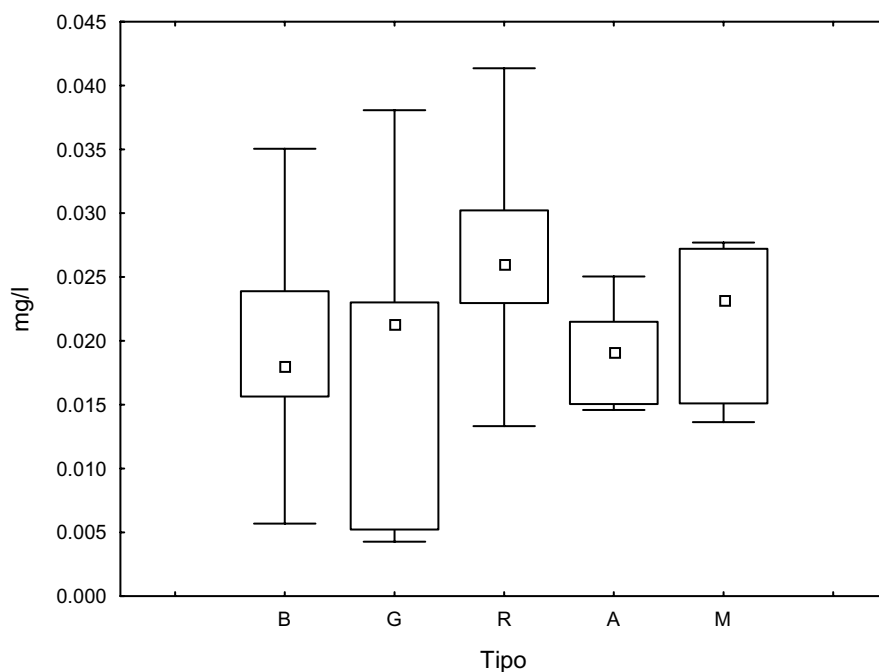


Figura 75. Contenido de Sr en bebidas de tequila y mezcal. B, blanco; G, oro; R, reposado; A, añejo; M, mezcal.

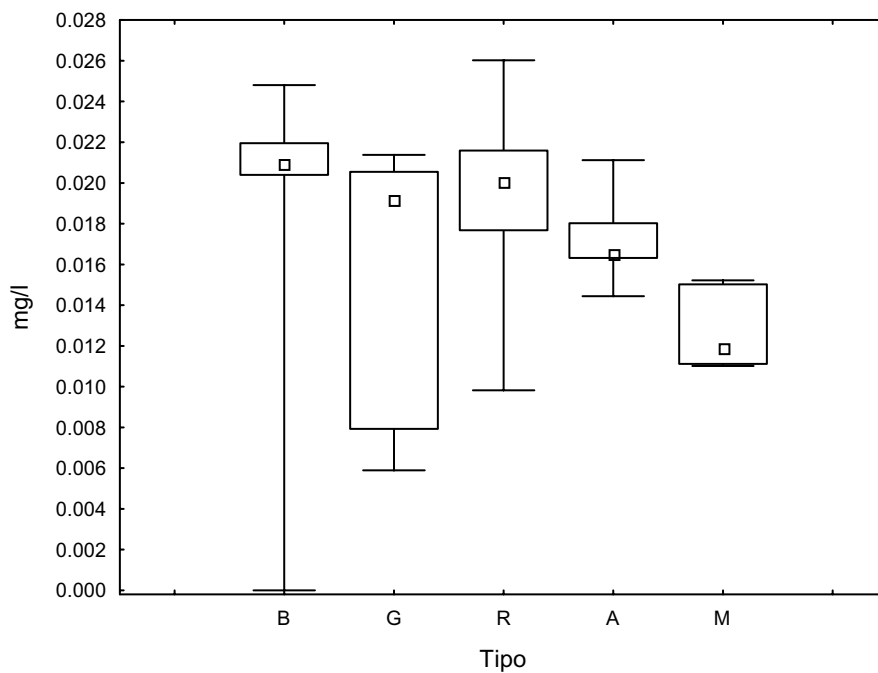


Figura 76. Contenido de Ba en bebidas de tequila y mezcal. B, blanco; G, oro; R, reposado; A, añejo; M, mezcal.

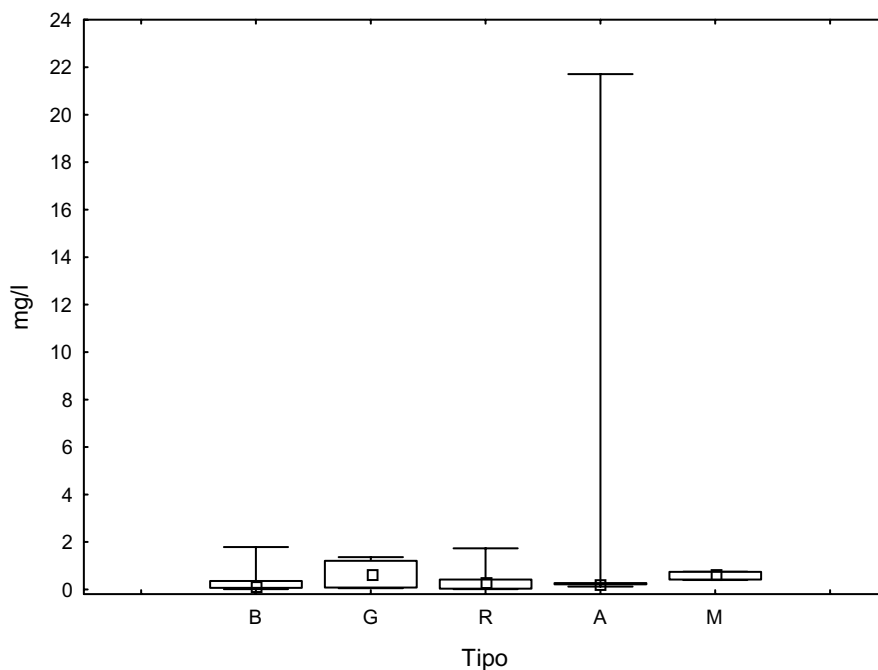


Figura 77. Contenido de Cu en bebidas de tequila y mezcal. B, blanco; G, oro; R, reposado; A, añejo; M, mezcal.

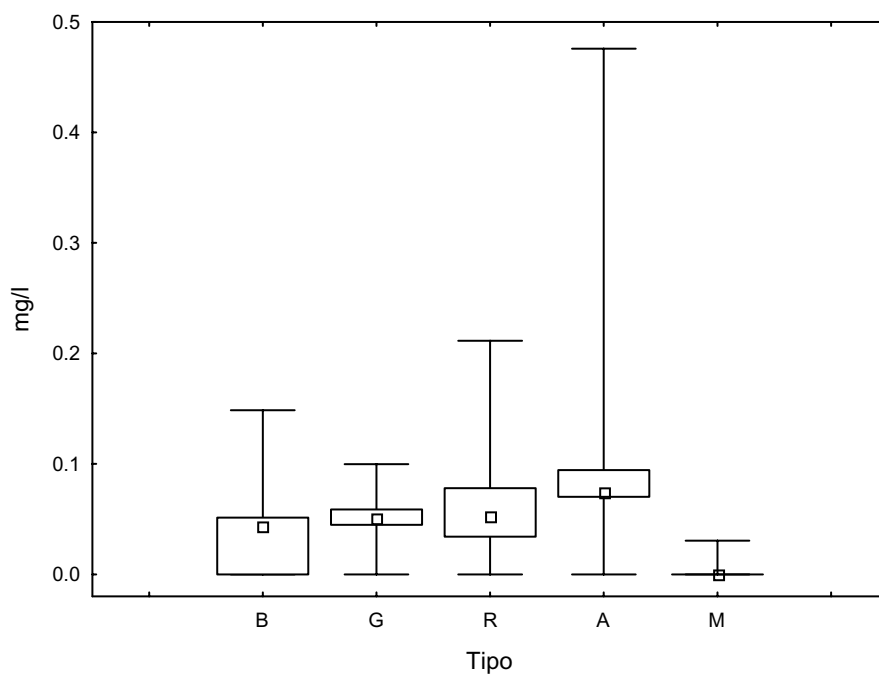


Figura 78. Contenido de Al en bebidas de tequila y mezcal. B, blanco; G, oro; R, reposado; A, añejo; M, mezcal.

En la tabla 13 se muestran los rangos de concentración para cada uno de los elementos analizados.

Tabla 13. Rangos de concentración (mg/l) de metales en los tipos de tequila y mezcal analizados.

Elemento	Blanco	Oro	Reposado	Añejo	Mezcal
Na	29,030-0,0630	13,666-2,016	19,050-1,240	9,282-2,929	9,440-4,860
K	0,550-0,0140	1,503-0,030	22,673-0,623	11,228-0,193	2,070-0,510
Ca	3,960-0,280	1,225-0,274	6,911-0,574	2,129-0,546	3,150-0,670
S	4,040-0,110	4,927-1,587	6,139-0,102	10,009-0,598	7,900-4,330
Mg	1,100-0,064	0,169-0,051	2,259-0,108	0,591-0,238	0,797-0,088
Mn	0,035-n.d.	0,027-n.d.	0,049-0,018	0,083-0,016	0,017-n.d.
Fe	0,127-0,014	0,081-0,013	0,172-0,028	0,302-0,031	0,073-0,024
Zn	0,335-0,020	0,255-0,016	0,346-0,020	0,421-0,022	0,212-0,035
Sr	0,035-0,006	0,038-0,004	0,040-0,013	0,025-0,015	0,028-0,014
Ba	0,025-n.d.	0,021-0,006	0,026-0,013	0,021-0,014	0,015-0,011
Cu	1,787-0,016	1,350-n.d.	1,733-0,016	21,705-0,124	0,747-0,401
Al	0,149-n.d.	0,100-n.d.	0,149-n.d.	0,476-n.d.	0,030-n.d.

n.d. no detectado

Los elementos con mayores niveles de concentración son Na, K, Ca y S. Los rangos de concentración presentan gran variabilidad. En el caso del Na, excepto en los tequilas blancos, las concentraciones oscilan alrededor de 4 mg/l. En los tequilas blancos hay algunas muestras con valores muy extremos, tanto para concentraciones altas, 29,03 mg/l, como bajas 0,063 mg/l. Para el K se observan concentraciones medianas menores, 1 mg/l para tequila blanco, oro y mezcal, 8,1 mg/l para el añejo y 3,5 mg/l para el reposado, aunque para esta última se observaron concentraciones extremadamente altas de 22,67 mg/l. En el caso del Ca las concentraciones se encuentran alrededor de 1 mg/l, aunque también existen valores superiores extremos de 3,96 y 6,911 mg/l para el tequila blanco y reposado, respectivamente; también hay valores a concentraciones muy bajas en el mezcal de 0,67 mg/l. El rango de concentración del azufre varía mucho entre cada tipo de bebida, siendo las medianas son 0,3, 3,0, 2,0, 1,8 y 5,8 mg/l para los tequilas blanco,

oro, reposado, añejo y mezcal, respectivamente. También se observan valores extremos, como en el tequila añejo de 10 mg/l.

El Mg se encuentra a niveles intermedios de concentración con respecto a los otros elementos analizados. Las medianas para las bebidas se encuentran entre 0,12 a 0,43 mg/l aunque se observan valores superiores extremos en comparación con el resto de 1,10 mg/l para el tequila blanco y 2,259 mg/l para el tequila reposado.

Los niveles de concentración más bajos los presentan Mn, Fe, Zn, Sr, Ba, Cu y Al, estando todos por debajo de 1 mg/l. En el caso del Mn la mediana de concentración es de 0,01 mg/l y como extremo inferior del rango n. d. para los tequilas blanco, oro y mezcal. En el caso del tequila reposado y añejo las medianas son un poco superiores, de 0,031 y 0,048 mg/l, respectivamente. La mediana de concentración del Fe es de alrededor 0,04 mg/l excepto para el tequila añejo, que presenta una dispersión mayor de los datos con mediana igual a 0,07 mg/l y con un valor superior extremo de 0,302 mg/l. En el Zn se encontraron medianas de concentración de alrededor de 0,05 mg/l y todos los tequilas presentan valores superiores extremos que van desde 0,255 mg/l para el tequila oro hasta 0,346 mg/l para el añejo. Los valores medios en el Sr se encuentran alrededor de 0,02 mg/l, siendo 0,004 mg/l la concentración mínima encontrada en el tequila oro y la máxima de 0,040 mg/l encontrada en el tequila reposado. Los rangos de concentración de Ba son muy variables entre las muestras analizadas. Las medianas son 0,021, 0,019, 0,020, 0,016 y 0,012 mg/l para tequila blanco, oro, reposado, añejo y mezcal, respectivamente, y en el caso del blanco hubo muestras en las que no se detectó. El rango de concentración para el Cu es muy parecido para todas las bebidas, aunque existe un valor extremo muy elevado en el tequila añejo de 21,705 mg/l y de n.d. para el tequila

oro. Finalmente, las medianas de los valores de concentración del Al están alrededor de 0,05 mg/l para el tequila blanco, oro y reposado. Para el tequila añejo es de 0,074 mg/l con un valor extremo superior de 0,476 mg/l; en todos los casos el valor inferior fue n.d. Cabe mencionar que en muy pocas muestras de mezcal se detectó Al.

IV.1.4 Diferenciación de tequilas y mezcal según su perfil metálico

Uno de los objetivos de este trabajo es comprobar la eficacia de los metales analizados como descriptores químicos para clasificar los diferentes tipos de tequila. Con éste propósito, se aplicaron métodos de reconocimiento de patrones (PRM). De esta forma, se pueden obtener las reglas de clasificación que permitan diferenciar los tipos de tequila de acuerdo al contenido metálico calculado. Se utilizó el programa STATISTICA 6.0 para el análisis de datos.

IV.1.4.1 Análisis en componentes principales

El primer paso de este tratamiento consistió en aplicar PCA como método de visualización. Permite encontrar posibles relaciones entre los datos y establecer cuales son las variables más discriminantes. Se realizó un PCA considerando los metales analizados como variables y las muestras de tequila y mezcal como casos, construyendo una matriz de datos de 12 columnas (metales) y 130 filas (muestras). Se calcularon tres componentes principales, que explicaban el 51% del total de la varianza de los datos. PC1, PC2 Y PC3 explican el 27%, 14% y 10% de la varianza, respectivamente [113]. En el caso de PC1, las variables con mayor peso son K, Ca, Mg y Sr. Para PC2 Na, S y Fe son las de mayor

peso. Finalmente en PC3 S, Mn, Sr, Ba y Cu son las más discriminantes. Representando las muestras en el espacio tridimensional de los PCs calculados (figura 79), no se observan tendencias claras que permitan establecer alguna separación.

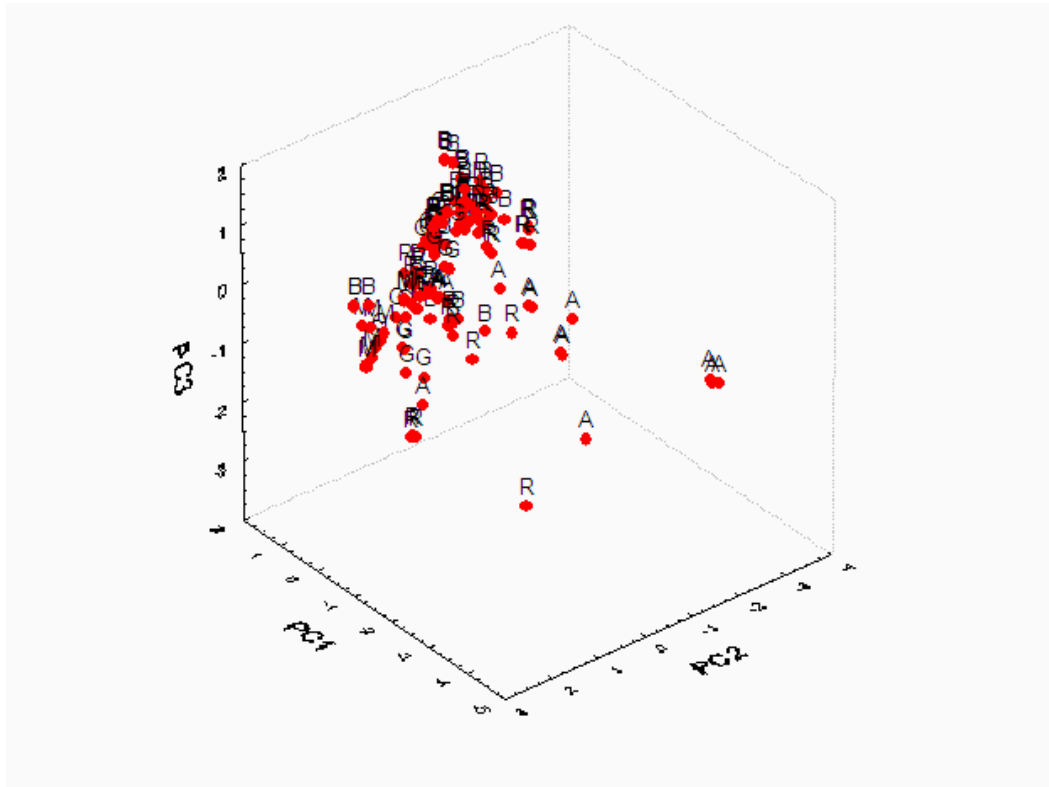


Figura 79. Muestras de tequila y mezcal en el espacio de los tres primeros PCs. B, blanco; G, oro; R, reposado; A, añejo; M, mezcal.

IV.1.4.2 Análisis discriminante lineal

Una vez realizado el PCA, se aplicó una técnica de reconocimiento de patrones supervisado. Usando LDA pueden obtenerse reglas de clasificación adecuadas que permitan diferenciar las muestras. En nuestro caso hay 130 muestras pertenecientes a 5 clases: 44 a tequila blanco, 40 tequila reposado, 17 tequila añejo, 20 tequila oro y 9 mezcal.

Cada una de estas clases se dividió aleatoriamente en dos grupos de entrenamiento y verificación. Éste método asume el conocimiento *a priori* del número de clases y la pertenencia de cada clase en el entrenamiento de los datos. El porcentaje de muestras en cada uno de estos grupos fue del 50%. Para seleccionar las variables incluidas en el análisis, se utilizó el análisis discriminante “stepwise forward” [138, 177]. De esta forma se consideran las variables más importantes para la discriminación entre clases. En nuestro caso, los descriptores seleccionados fueron: S, K, Sr, Mn, Fe, Mg, Ca, Al, Zn, Cu, y Ba, calculándose cuatro funciones discriminantes (DF) cuyas ecuaciones se detallan a continuación.

$$DF1 = -0,49 S + 1,08 K - 0,11 Sr + 0,38 Mn - 0,33 Fe - 0,33 Mg + 0,39 Ca - 0,16 Al - 0,36 Zn - 0,13 Cu + 0,24 Ba$$

$$DF2 = 0,91 S + 0,23 K + 0,03 Sr + 0,17 Mn + 0,25 Fe - 0,27 Mg + 0,13 Ca + 0,01 Al - 0,05 Zn + 0,15 Cu - 0,29 Ba$$

$$DF3 = - 0,10 S + 0,73 K + 0,74 Sr - 0,62 Mn - 0,10 Fe - 0,39 Mg + 0,45 Ca - 0,66 Al - 0,25 Zn - 0,31 Cu - 0,02 Ba$$

$$DF4 = - 0,11 S + 0,98 K + 0,60 Sr - 0,55 Mn - 0,89 Fe - 0,99 Mg - 0,29 Ca + 0,82 Al + 0,10 Zn + 0,09 Cu - 0,11 Ba$$

La figura 80 representa las muestras en el plano definido por DF1 y DF2. Como puede observarse, existe cierta tendencia a la agrupación de muestras pertenecientes a un mismo tipo de bebida, sin embargo, no se logra una separación completa entre las distintas clases.

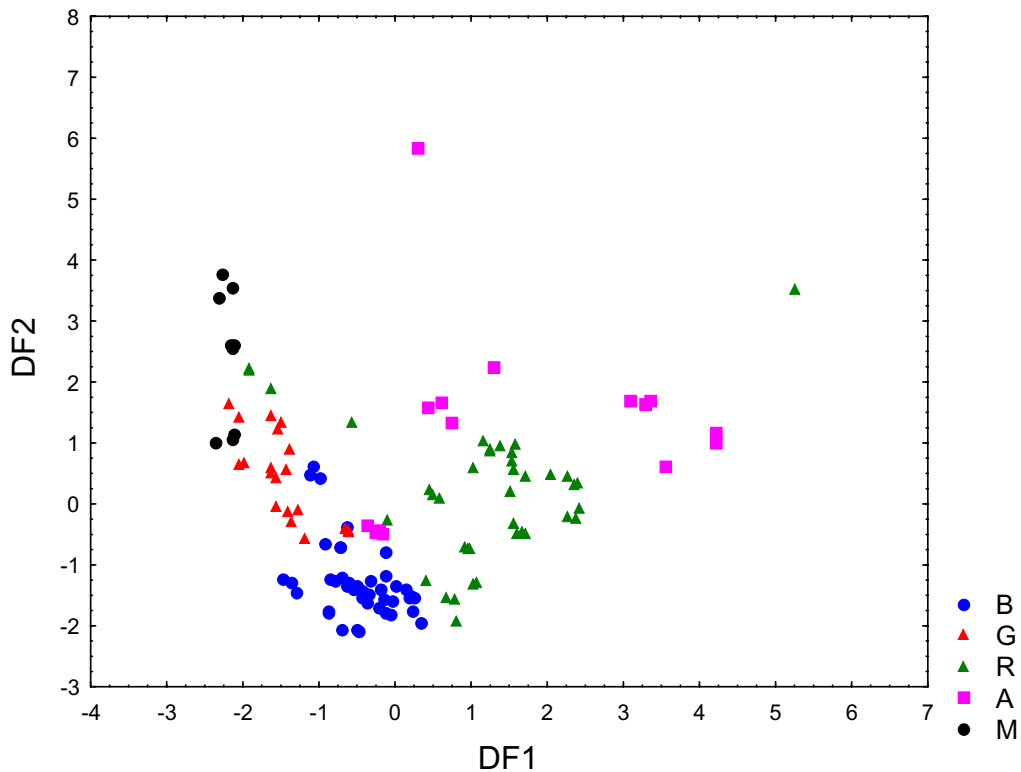


Figura 80. Distribución de las muestras en el plano definido por DF1 y DF2. B, blanco; G, oro; R, reposado; A, añejo; M, mezcal.

Considerando las reglas de clasificación, se calcularon los falsos positivos y negativos. A partir de estos parámetros se pueden calcular la especificidad y sensibilidad para cada tipo de bebida. La sensibilidad se refiere al número de casos que perteneciendo a una clase son correctamente clasificados en la misma. Especificidad es el número de casos que no pertenecientes a una clase son correctamente considerados a pertenecer a clases diferentes [128, 178]. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 14.

Tabla 14. Especificidad y sensibilidad obtenidos con LDA.

	Blanco	Oro	Reposado	Añejo	Mezcal
Falsos Positivos	15	3	0	1	4
Especificidad (%)	83	97	100	99	97
Falsos Negativos	3	4	9	7	0
Sensibilidad (%)	93	80	78	59	100

Se observa que la especificidad presenta valores altos, superiores al 80% para todas las clases, por lo que cabe decir que hay pocos falsos positivos. En el caso de la sensibilidad, para el tequila añejo es baja, por lo tanto el número de falsos negativos es alto para dicha clase. En cambio, para el resto de las clases la sensibilidad es alta y para el mezcal es del 100%.

IV.1.4.3 Algoritmos neuronales artificiales

Las ANN son herramientas muy eficientes para la clasificación y discriminación de muestras. En este caso, se usó PNN. La función de densidad de probabilidad para cada clase se basa en los casos entrenados y la optimización se basa en los parámetros r-kernel [151, 160, 179]. La función de densidad de probabilidad define las fronteras de cada clase y clasifica un nuevo caso de acuerdo a su probabilidad de pertenecer a una clase. En la figura 81 se presenta la estructura de la red que ofreció mejores resultados. La capa de entrada contiene 9 neuronas

que corresponden al contenido de Na, K, Ca, S, Mg, Fe, Sr, Cu y Zn. La capa de patrones esta compuesta de un número de neuronas que equivalen al número de muestras del grupo de entrenamiento. La capa de suma contiene 5 neuronas que corresponden a la probabilidad de que las muestras pertenezcan a una de las 5 clases consideradas. Finalmente, la capa de decisión de la red que consiste en una neurona que indica la probabilidad más alta de una muestra de pertenecer a una de las clases de tequila o mezcal.

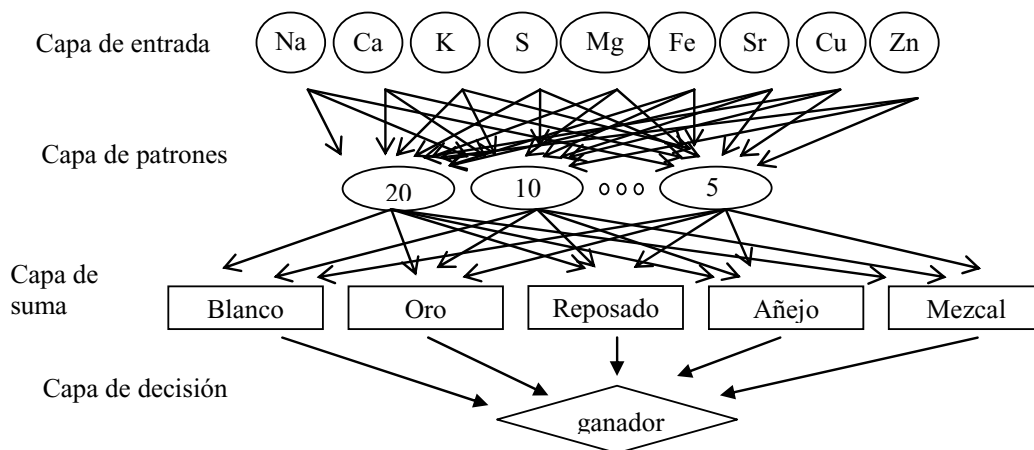


Figura 81. Algoritmo neuronal probabilístico.

Una vez aplicada la PNN, se obtuvo una buena clasificación de las muestras atendiendo al tipo de bebida al que pertenecen. También, se calcularon los falsos positivos y negativos, así como la especificidad y sensibilidad. Dichos parámetros se muestran en la tabla 15.

Tabla 15. Especificidad y sensibilidad obtenidos con PNN.

	Blanco	Oro	Reposado	Añejo	Mezcal
Falsos Positivos	2	0	0	0	1
Especificidad (%)	95	100	100	100	98
Falsos Negativos	0	0	2	1	0
Sensibilidad (%)	100	100	90	89	100

Los valores de especificidad y sensibilidad calculados son elevados, siendo 100% en varios casos, por lo que cabe afirmar que hay un número reducido de falsos negativos y positivos. A partir de estos resultados podemos concluir que PNN permite obtener reglas de clasificación más eficaces que las obtenidas a partir de LDA. Este comportamiento puede deberse a la naturaleza no-lineal de la distribución de las clases.

IV.2 Determinación de compuestos volátiles mediante HS-SPME- GC-MS

En este apartado se incluyen los resultados obtenidos sobre el estudio llevado a cabo para la determinación de algunos de los compuestos químicos, que forman parte de la fracción volátil de tequila y mezcal. Igual que en otros destilados los compuestos volátiles son responsables importantes del flavor. Para llevar a cabo este estudio se ha utilizado cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas. Como técnica de inyección se ha usado microextracción en fase sólida por espacio de cabeza. Se han determinado alcoholes superiores y acetato de etilo. Además, se ha estudiado la presencia de los compuestos que forman parte de la fracción volátil.

IV.2.1 Optimización del procedimiento de microextracción en fase sólida

Para llevar a cabo la extracción de los compuestos volátiles del tequila, se empleó microextracción en fase sólida (SPME) debido a sus prestaciones de sensibilidad, fácil manejo, análisis libre de disolvente, muestreo rápido y bajo coste. Teniendo en cuenta las características de la fibra [180], así como la bibliografía existente sobre el uso de SPME en muestras similares [181], se utilizó una fibra de carboxenopolidimetilsiloxano (CAR/PDMS). Este tipo de fibra es muy adecuado para la extracción de volátiles a nivel de trazas [67]. La extracción se realizó por espacio de cabeza, ya que el método es más rápido, limpio y se extraen menos interferencias [182].

Para llevar a cabo la extracción se optimizaron varios parámetros: concentración de etanol en las muestras, tiempo de extracción, temperatura, volumen de muestra y fuerza iónica de la disolución durante la extracción.

El contenido de etanol en el tequila es de alrededor del 38%. Este hecho puede influir de manera negativa en el proceso de extracción. Algunos autores [36, 40, 68] han encontrado que una concentración alta de etanol disminuye la eficiencia de la extracción debido a que el etanol satura la fibra impidiendo una buena adsorción de compuestos volátiles traza. Debido a esto, se ensayaron diferentes porcentajes de etanol (11,4, 19, 21 y 22,8 % v:v) añadiendo agua a las muestras de tequila y manteniendo el volumen final en 10 ml. Tras el análisis mediante cromatografía de gases, se comprobó que el porcentaje de 11,4 % fue el que proporcionó mejores resultados experimentales en cuanto a extracción de compuestos volátiles.

El estudio de la influencia de la temperatura se llevo a cabo ensayándose 3 temperaturas diferentes: 20, 35, y 60 °C. Los resultados indican que conforme aumenta la temperatura se adsorbe más etanol en comparación con los otros compuestos. Esto produce un efecto negativo porque se produce un solapamiento del pico del etanol con otros picos vecinos. Por tanto, la temperatura óptima de extracción se estableció en 35 °C.

Otro parámetro a evaluar fue el tiempo de extracción. De acuerdo con la bibliografía [36, 39, 40] los tiempos de extracción más utilizados para bebidas alcohólicas están en el intervalo de 30 a 60 min. Así se probaron 30, 45 y 60 min. Los cromatogramas muestran que la extracción

de los compuestos es independiente del tiempo de extracción a partir de 30 min por lo que se decidió realizar la extracción durante 30 min.

Finalmente, se estudió la influencia de la fuerza iónica en la extracción, realizando una prueba con y sin adición de NaCl (0,17M) a la muestra. Los resultados demostraron que al añadir solución salina, los picos cromatográficos correspondientes al 2-metil-butanol y 3-metil-butanol no quedaban bien resueltos, por lo tanto se decidió realizar la extracción sin añadir NaCl.

IV.2.2 Optimización de las condiciones de GC-MS

Para llevar a cabo las determinaciones de compuestos volátiles se seleccionó una columna con 5%fenil-dimetilpolisiloxano, que es adecuada para este tipo de análisis, y además tiene una temperatura máxima de trabajo elevada. De esta forma, se tiene una mayor versatilidad y posibilidades de uso.

Para optimizar las condiciones experimentales se tuvieron en cuenta el programa de temperatura del inyector, y la relación de split. Las temperaturas de la interfase y la fuente de ionización se fijaron en 250 y 300 °C, respectivamente. De esta forma se asegura que los compuestos eluidos de la columna se mantengan en fase vapor. De acuerdo con la bibliografía, los aceites de fusel se separan usando una isoterma a temperaturas relativamente bajas. Por lo tanto, el programa de temperatura se inició con una isoterma de 40 °C durante 30 min. Posteriormente se aplicó una rampa de temperatura hasta alcanzar una temperatura final de 280 °C, manteniéndola durante 10 min. De esta forma se eluyen otros presentes en la muestra inyectada. Considerando

los cromatogramas obtenidos en estas condiciones, se observó que no era necesario un periodo isoterma inicial tan prolongado, ya que a partir de los 10 min no aparecieron otros picos de interés. Por esta misma razón tampoco era necesario mantener la temperatura final de 280 °C tanto tiempo. Finalmente, el programa óptimo consistió en una elución isoterma a 40 °C durante 10 min, posteriormente se aplicó una rampa de 8 °C/min hasta alcanzar 250 °C temperatura que se mantuvo durante 1 min. El flujo del gas portador se ajustó a 1 ml/min.

Inicialmente, la temperatura del inyector se fijó en 150 °C, para evitar una posible descomposición de los compuestos. Se probaron temperaturas más altas sin que se detectaran descomposición de los analitos. Finalmente se optó por 220 °C ya que así se obtuvieron mejores resultados debido a que la desorción es rápida y se obtienen picos más estrechos.

Para la optimización de la relación de split se ensayaron diversos valores. Los resultados indican que en modo split con una relación 1:15 la columna no se satura y por lo tanto el equilibrio entre fase móvil y estacionaria es más rápido, obteniéndose mayor selectividad y mayor resolución de picos.

El detector de masas se utilizó en modo SCAN, con un intervalo de barrido de masa/carga de 35-400 m/z. Finalmente, y considerando la masa molecular de los analitos, el intervalo se fijó en 35-250 m/z. Se utilizaron las espectrotescas WILEY y N.I.S.T. 98. Una vez obtenidos los espectros de masas se estudió la fragmentación característica de cada analito. Se identificaron y cuantificaron los siguientes compuestos volátiles: n-propanol, acetato de etilo, 2-metil-propanol, 3-metil-butanol y

2-metil-butanol. En la figura 82 se presenta un cromatograma de patrones obtenido bajo las condiciones cromatográficas optimizadas.

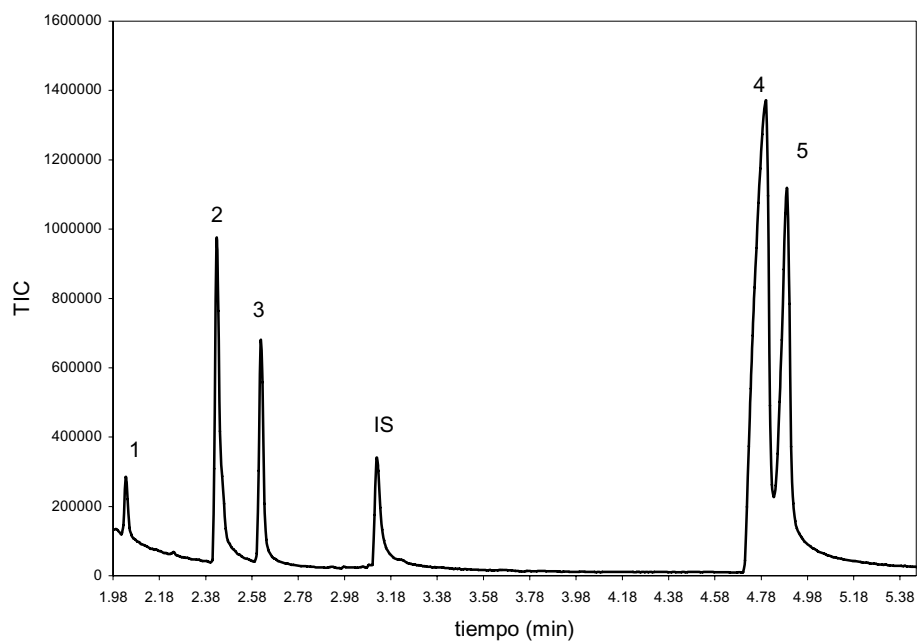


Figura 82. Cromatograma de patrones obtenido bajo las condiciones optimizadas. 1) n-propanol 100 mg/l, 2) acetato de etilo 40 mg/l, 3) 2-metil-propanol 150 mg/l, 4) 3-metil-butanol 200 mg/l, 5) 2-metil-butanol 80 mg/l, IS) Patrón interno n-butanol 60 mg/l

El primer compuesto que se eluye es el n-propanol, con un tiempo de retención de 2,03 min, después se eluyen acetato de etilo y 2-metil-propanol con tiempos de retención iguales a 2,43 y 2,61 min, respectivamente. 3-metil-butanol y 2-metil-butanol aparecen a 4,78 y 4,88 min, respectivamente. El pico correspondiente al patrón interno, n-butanol, aparece a 3,11 min.

Se calculó la resolución para los compuestos 3-metil-butanol y 2-metil-butanol, la presencia de n-propanol, acetato de etilo, 2-metil-propanol, 3-metil-butanol y 2-metil-butanol en las muestras analizadas se confirmó mediante espectrometría de masas y adición patrón, obteniéndose un valor de 1,5. En las figuras 83-87 se presentan los espectros de masas de los compuestos cuantificados.

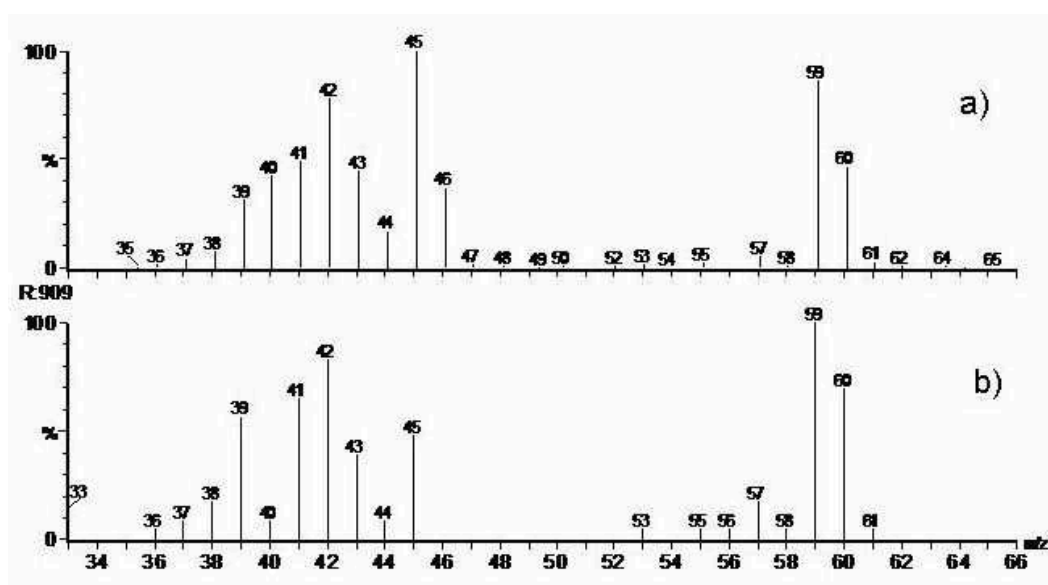


Figura 83. Espectros de masas del n-propanol. a) Experimental; b) Librería.

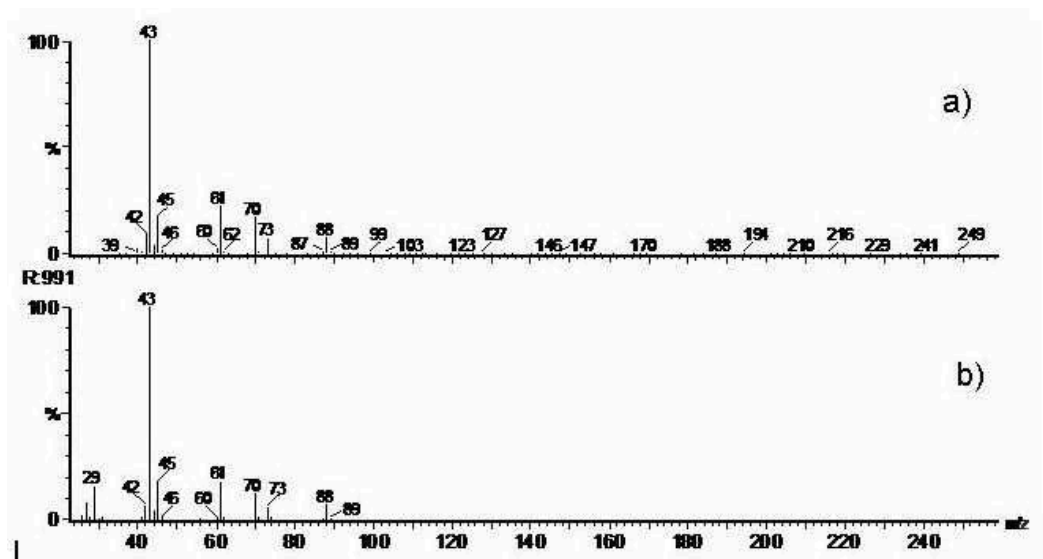


Figura 84. Espectros de masas del acetato de etilo. a) Experimental; b) Librería.

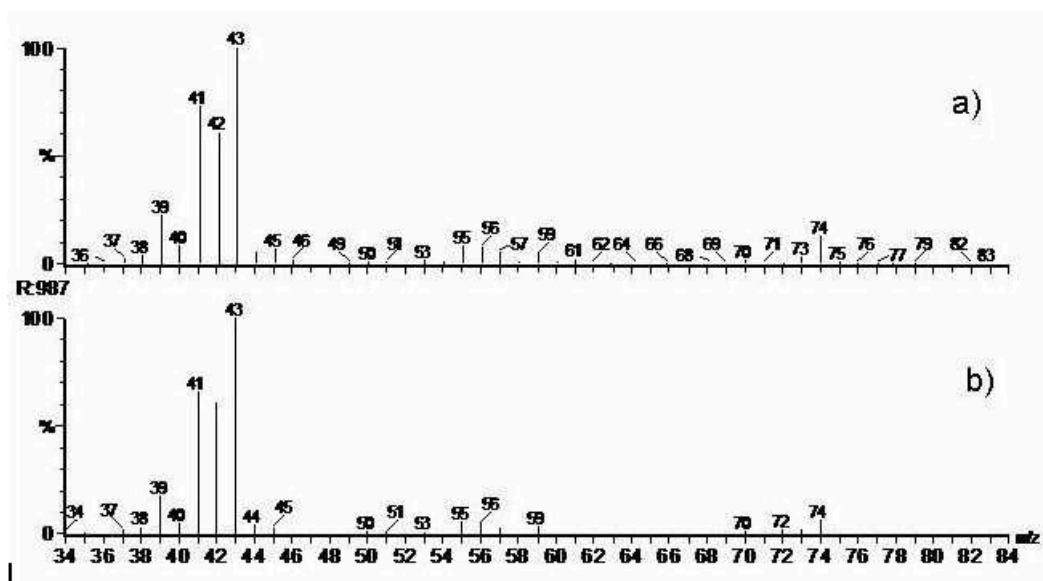


Figura 85. Espectros de masas del 2-metil-propanol. a) Experimental; b) Librería.

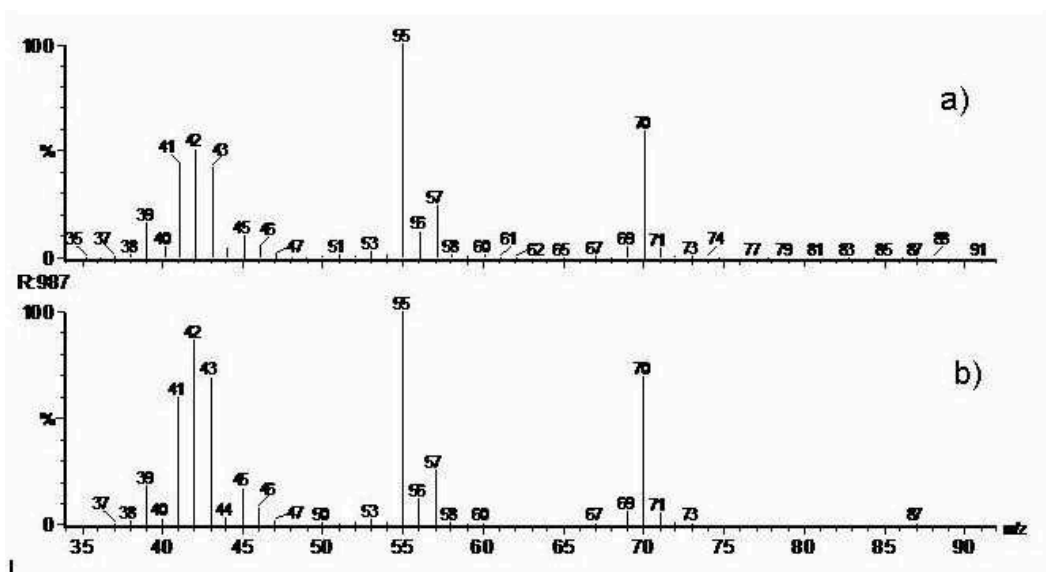


Figura 86. Espectros de masas del 3-metil-butanol. a) Experimental; b) Librería.

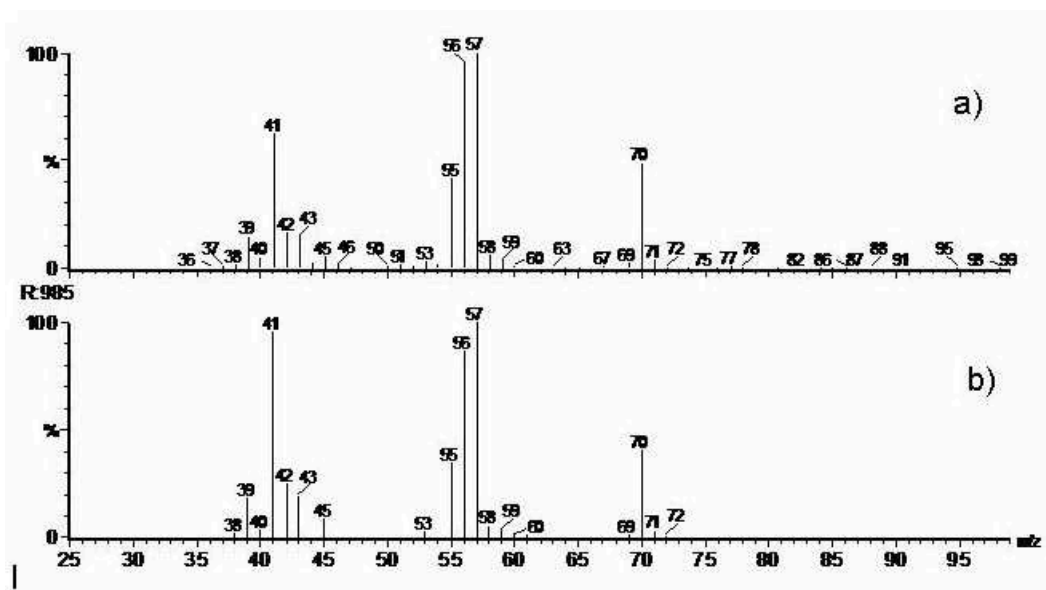


Figura 87. Espectros de masas del 2-metil-butanol. a) Experimental; b) Librería.

Se puede comprobar que la similitud entre los espectros experimentales y de la librería es muy elevada.

IV.2.3 Efecto matriz

Para descartar la presencia de efecto matriz en el análisis de las muestras de tequila, se compararon las pendientes de las rectas de calibrado de adición patrón y calibrado externo.

Una vez obtenidas ambas rectas, se realizó una comparación estadística de las pendientes, para ver si existen diferencias significativas entre ambas. Obtuvimos el cociente (R) entre ambas pendientes y calculamos la desviación estándar asociada al mismo (S_R). Se calculó la t de Student para dicha comparación.

$$R = \frac{b_{CE}}{b_{AP}} \quad 126$$

$$S_R = R \sqrt{\left(\frac{S_{b_{CE}}^2}{b_{CE}^2} + \frac{S_{b_{AP}}^2}{b_{AP}^2} \right)} \quad 127$$

$$t_{cal} = \frac{|R-1|}{S_R} \quad 128$$

El valor calculado (t_{tab}) se compara con el tabulado para $n_{CE}+n_{AP}-4$ grados de libertad a un 95% de nivel de confianza. Siendo n_{CE} y n_{AP} el número de puntos utilizados para el cálculo de las rectas de calibrado externo y adición patrón, respectivamente. Los resultados de esta comparación se presentan en la tabla 16. En todos los casos el valor t_{cal} es menor que t_{tab} (2,365), al 95% de confianza y con 7 grados de libertad. Por lo tanto, no se detecta la presencia de efecto matriz.

Tabla 16. Efecto matriz tratamiento HS-SPME

Compuesto	Calibrado externo $b \pm Sb$	Adición patrón $b \pm Sb$	t calculada
n-propanol	0,0032 \pm 0,0002	0,00297 \pm 0,00005	1,338
Acetato de etilo	0,053 \pm 0,003	0,061 \pm 0,003	2,051
2-metil-propanol	0,0090 \pm 0,0005	0,0089 \pm 0,0003	0,120
3-metil-butanol	0,039 \pm 0,001	0,049 \pm 0,005	2,091
2-metil-butanol	0,066 \pm 0,001	0,069 \pm 0,004	0,716

b: pendiente de la recta de calibrado; Sb: desviación estándar de la pendiente.

IV.2.4 Validación del método

El método de análisis propuesto se validó para los compuestos n-propanol, acetato de etilo, 2-metil-propanol, 3-metil-butanol y 2-metil-butanol. Se utilizó n-butanol como patrón interno. La exactitud del método se estudió a partir de ensayos de recuperación debido a la falta de material de referencia. Se establecieron cinco niveles de fortificación para cada compuesto y para cada nivel se realizaron las medidas por triplicado. Estos valores se encuentran desglosados en la tabla 17.

Tabla 17. Niveles de fortificación (mg/l) utilizados para cada compuesto.

Compuesto	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3	Nivel 4	Nivel 5
n-propanol	30	60	90	120	150
Acetato de etilo	10	20	40	50	60
2-metil-propanol	30	60	90	120	150
3-metil-butanol	30	60	90	120	150
2-metil-butanol	10	30	40	60	80

Los valores medios de recuperación encontrada para cada compuesto dentro del rango mencionado se presentan en la tabla 18.

Tabla 18. Recuperación (%) con su desviación estándar de los 5 niveles de adición.

Niveles	n-propanol	Acetato de etilo	2-metil-propanol	3-metil-butanol	2-metil-butanol
1	95 ± 4	109 ± 1	93 ± 6	87 ± 6	101 ± 4
2	87 ± 9	101 ± 11	85 ± 6	97 ± 4	93 ± 3
3	89 ± 10	94 ± 3	96 ± 8	93 ± 6	91 ± 2
4	100 ± 4	90 ± 5	98 ± 11	106 ± 3	96 ± 2
5	90 ± 8	97 ± 5	104 ± 5	107 ± 3	98 ± 5
Total	92 ± 4	100 ± 7	95 ± 4	98 ± 2	96 ± 2

Se aplicó el test de Grubbs [173] para la detección de outliers, dando negativo en todos los casos. Las recuperaciones obtenidas para cada compuesto son mayores al 80% en todos los casos. Las desviaciones estándar obtenidas para el n-propanol, 3-metil-butanol y 2-metil-butanol fueron menores de 10, excepto para los niveles 2 del acetato de etilo y 4 del 2-metil-propanol, para los que se obtuvieron valores de 11. Los valores obtenidos se pueden considerar aceptables [174] con lo que la exactitud queda validada.

Se calculó el rango lineal para cada compuesto considerando la concentración de éstos en las muestras estudiadas. La linealidad (%) se calculó a partir de los valores de las pendientes de la recta de calibración y sus desviaciones estándar. Los valores obtenidos son cercanos al 100% [175].

El estudio de la sensibilidad se llevo a a cabo calculando los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ). Estos parámetros se calcularon como las concentraciones correspondientes a un valor de señal igual a 3 y 10 veces la relación señal/ruido (S/N), respectivamente [176].

Finalmente, se calculó la precisión en condiciones de repetitividad y precisión intermedia. La repetitividad se determinó analizando una muestra por quintuplicado consecutivamente durante 1 día bajo las mismas condiciones experimentales. La reproducibilidad en condiciones de precisión intermedia se estudió repitiendo el análisis de una muestra a lo largo de un periodo de un mes. Estos parámetros de validación se presentan en la tabla 19.

Tabla 19. Parámetros de validación

Compuesto	Linealidad (%)	LOD (mg/l)	LOQ (mg/l)	Repetitividad %	Precisión intermedia %
n-propanol	98	0,3	0,9	3,8	9
Acetate de etilo	98	2,5	8,1	0,6	4
2-metil-butanol	97	1,6	5,2	1,9	6
3-metil-butanol	97	0,8	2,6	6,5	6
2-metil-butanol	97	0,4	1,4	3,3	6

Para la calibración se tuvieron en cuenta las concentraciones de cada compuesto que podían encontrarse en las muestras. Como señal analítica se utilizó la relación de áreas analito/patrón interno.

En las figuras 88-92 se presentan las rectas de calibrado obtenidas para n-propanol, acetato de etilo, 2-metil-propanol, 3-metil-butanol y 2-metil-butanol. Para la cuantificación se utilizó el método del patrón

interno, usando n-butanol como estándar interno. Previamente se comprobó que este compuesto no estaba presente en las muestras.

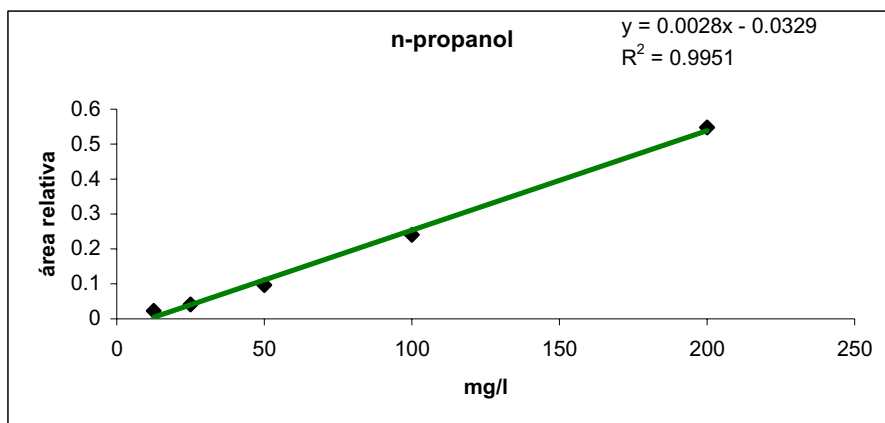


Figura 88. Recta de calibrado del n-propanol.

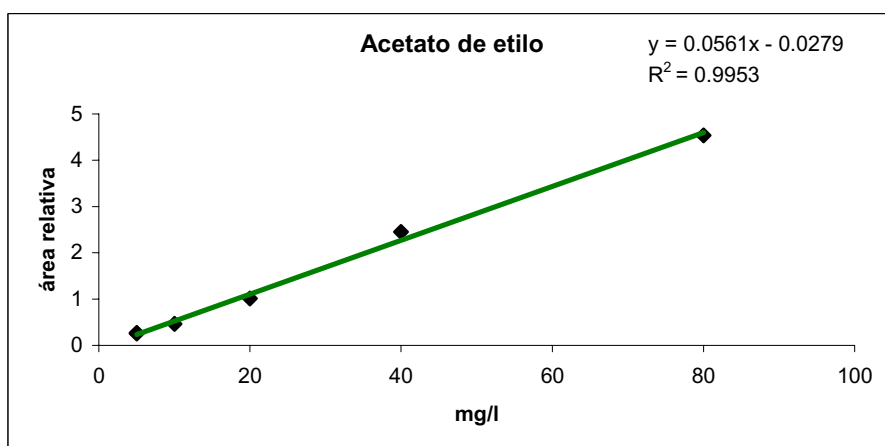


Figura 89. Recta de calibrado del acetato de etilo.

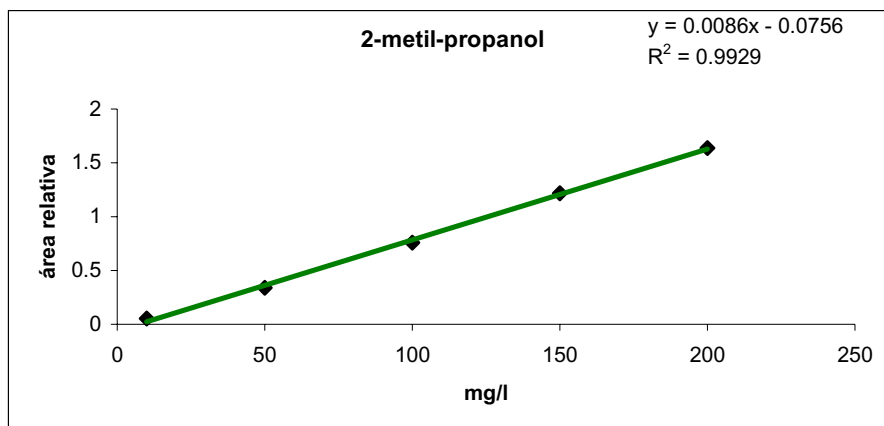


Figura 90. Recta de calibrado del 2-metil-propanol.

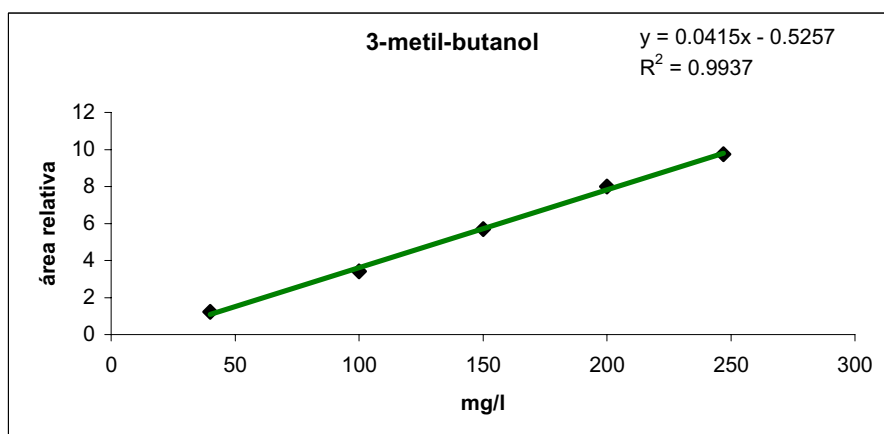


Figura 91. Recta de calibrado del 3-metil-butanol.

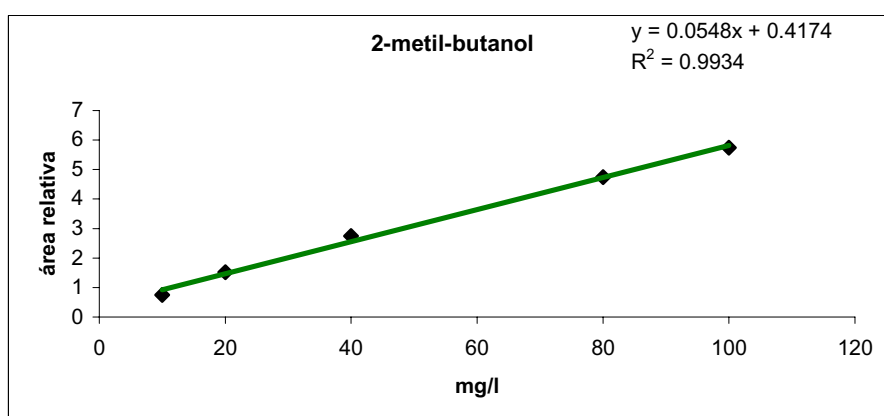


Figura 92. Recta de calibrado de 2-metil-butanol.

En la tabla 20 se resumen los parámetros de calibración obtenidos para cada uno de los compuestos analizados.

Tabla 20. Parámetros de calibración de compuestos volátiles analizados.

Elemento	Rango lineal (mg/l)	b	S _b	a	S _a	S _{x/y}	r
n-propanol	12,5-200	0,002	0,00007	-0,032	0,007	0,02	0,9975
Acetato de etilo	5-80	0,056	0,001	-0,03	0,05	0,11	0,9976
2-metil-propanol	10-200	0,0085	0,0002	-0,07	0,03	0,05	0,9964
3-metil-butanol	40-247	0,041	0,001	-0,5	0,1	0,26	0,9968
2-metil-butanol	10-100	0,054	0,001	0,41	0,09	0,17	0,9967

b: pendiente de la recta de calibrado; S_b: desviación estándar de la pendiente; a: ordenada en el origen; S_a: desviación estándar de la ordenada; S_{x/y}: error típico de la recta de calibrado; r: coeficiente de correlación.

IV.2.5 Determinación de n-propanol, acetato de etilo, 2-metil-propanol, 3-metil-butanol y 2-metil-butanol en muestras de tequila y mezcal

Una vez validado el método se procedió a analizar las muestras de tequila y mezcal. Se analizaron 92 muestras de tequila, de las cuales 24 eran tequila blanco, 16 oro, 36 reposado y 16 añejo; asimismo se analizaron también 12 muestras de mezcal. El análisis de las muestras se realizó por triplicado. Las concentraciones encontradas en las muestras se detallan en el apéndice II. En las figuras 93-97 se presentan cromatogramas correspondientes a muestras de distintos tipos de tequila y mezcal.

En estos cromatogramas se ha ampliado la zona en la que aparecen los picos correspondientes a n-propanol, acetato de etilo, 2-metil-propanol, 3-metil-butanol y 2-metil-butanol. Se utilizó un solvent

delay de 1,86 min para proteger el filamento de la fuente de ionización del detector de masas.

Los compuestos n-propanol, acetato de etilo, 2-metil-propanol, 3-metil-butanol y 2-metil-butanol se encontraron en todas las muestras analizadas. Los picos correspondientes a acetato de etilo y 2-metil-propanol se identifican claramente entre el pico de n-propanol y el de I.S. El pico de n-propanol es el mas pequeño. En el caso de tequila blanco y mezcal el pico es menor. El 3-metil-butanol siempre da un pico mayor que el de 2-metil-butanol, apareciendo ambos alrededor de los 4,7 min.

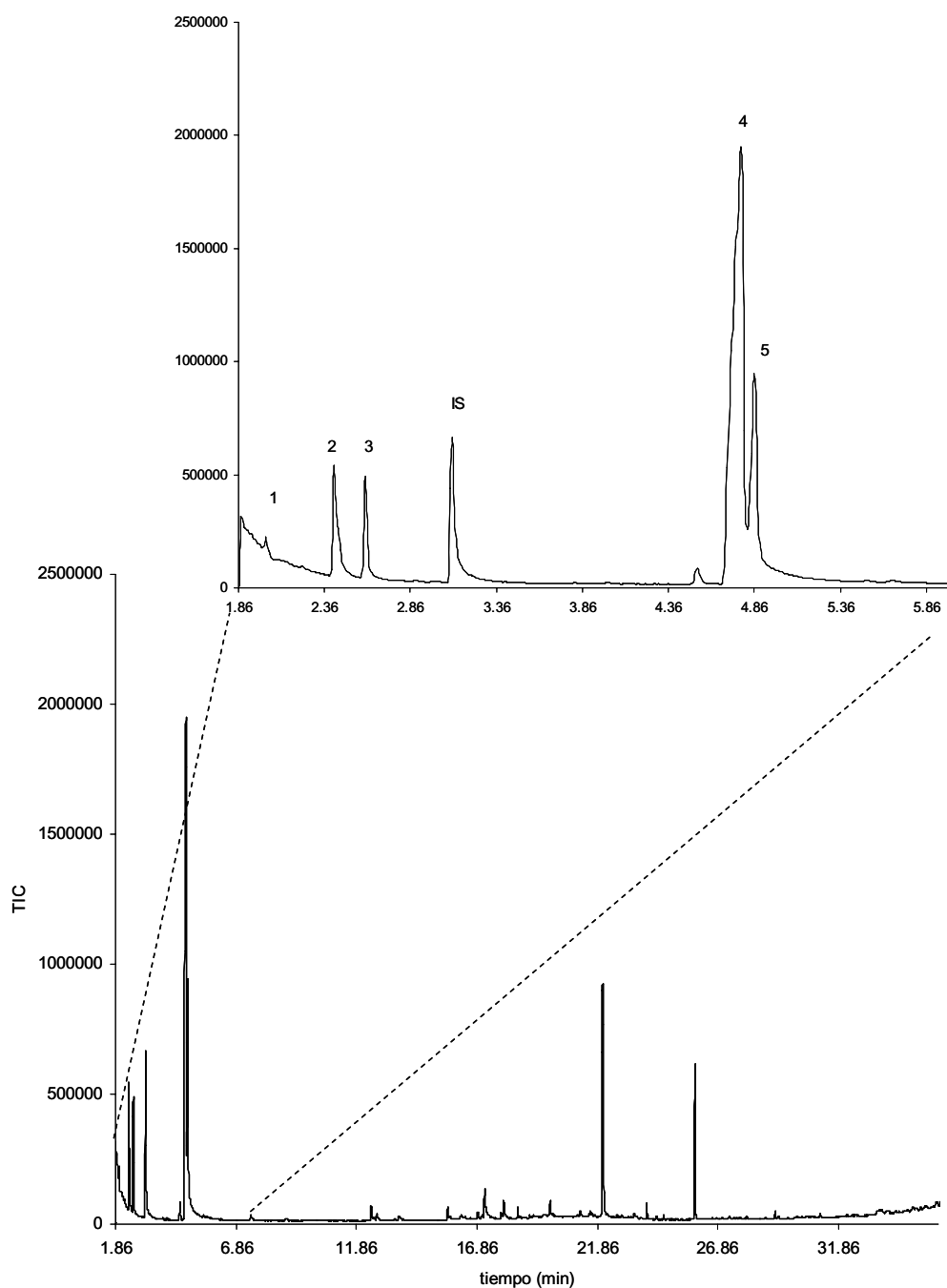


Figura 93. Cromatograma de tequila blanco. 1) n-propanol, 2) acetato de etilo, 3) 2-metil-propanol, 4) 3-metil-butanol, 5) 2-metil-butanol, IS) patrón interno.

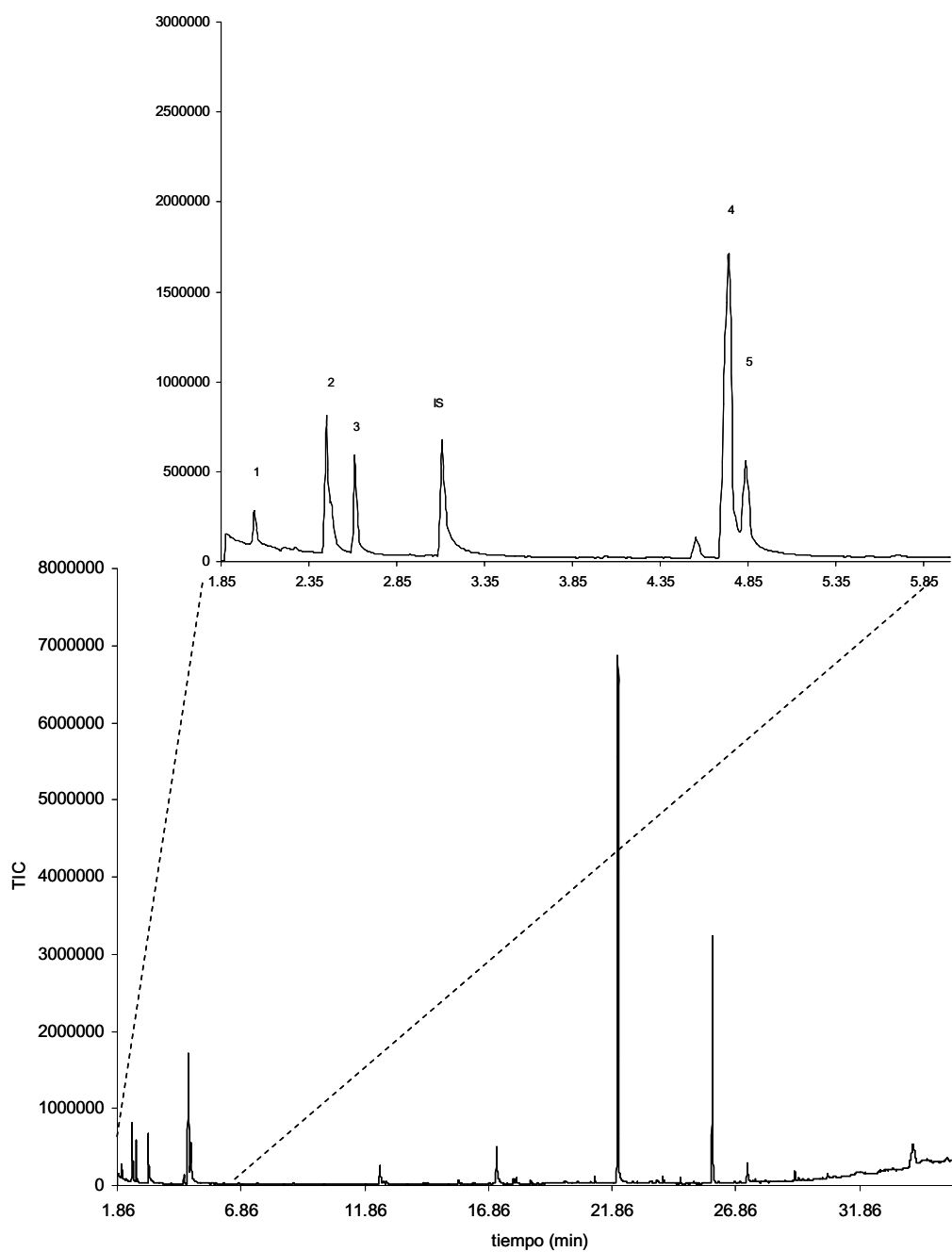


Figura 94. Cromatograma de tequila oro. 1) n-propanol, 2) acetato de etilo, 3) 2-metil-propanol, 4) 3-metil-butanol, 5) 2-metil-butanol, IS) patrón interno.

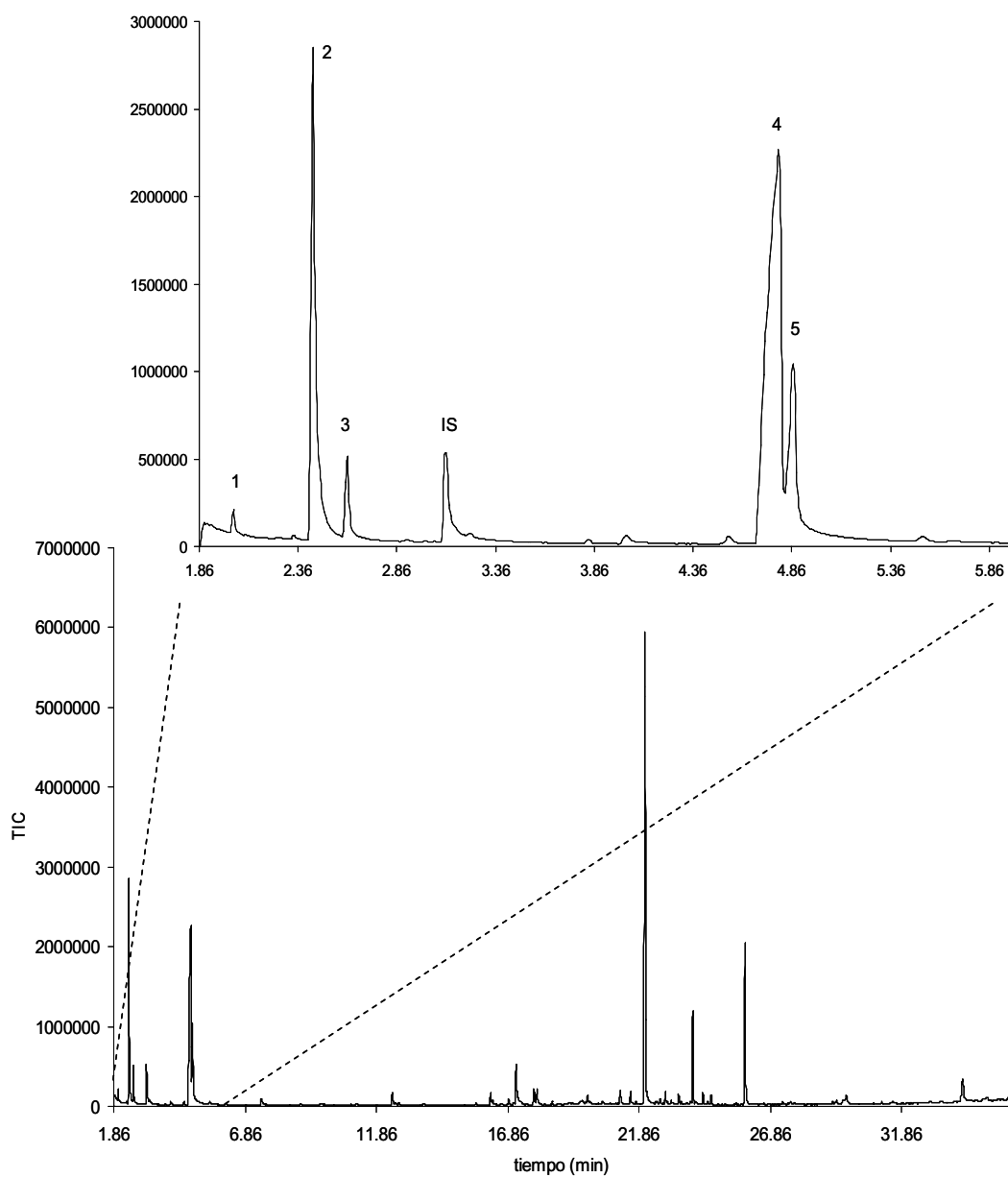


Figura 95. Cromatograma de tequila reposado. 1) n-propanol, 2) acetato de etilo, 3) 2-metil-propanol, 4) 3-metil-butanol, 5) 2-metil-butanol, IS) patrón interno.

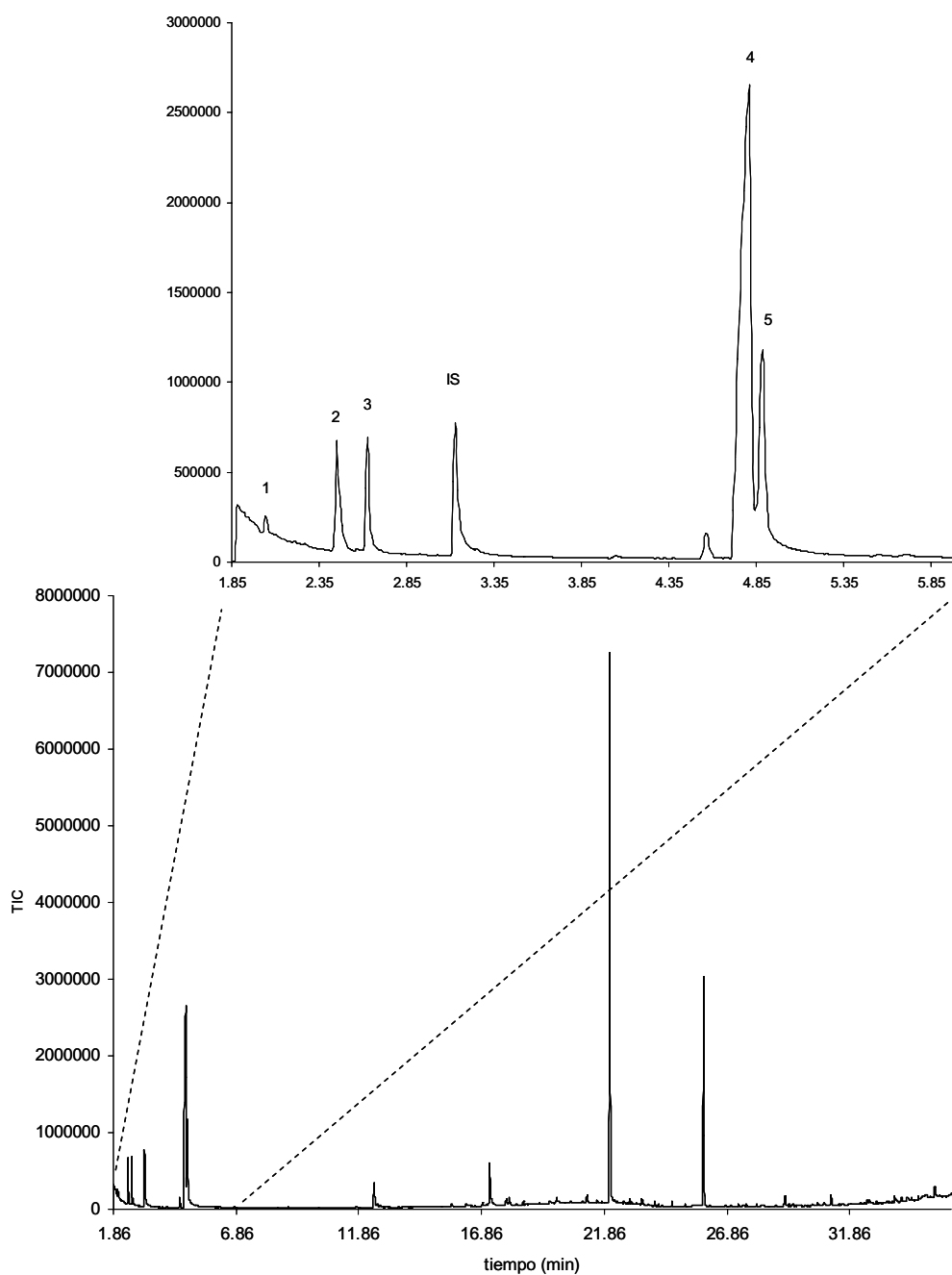


Figura 96. Cromatograma de tequila añejo. 1) n-propanol, 2) acetato de etilo, 3) 2-metil-propanol, 4) 3-metil-butanol, 5) 2-metil-butanol, IS) patrón interno.

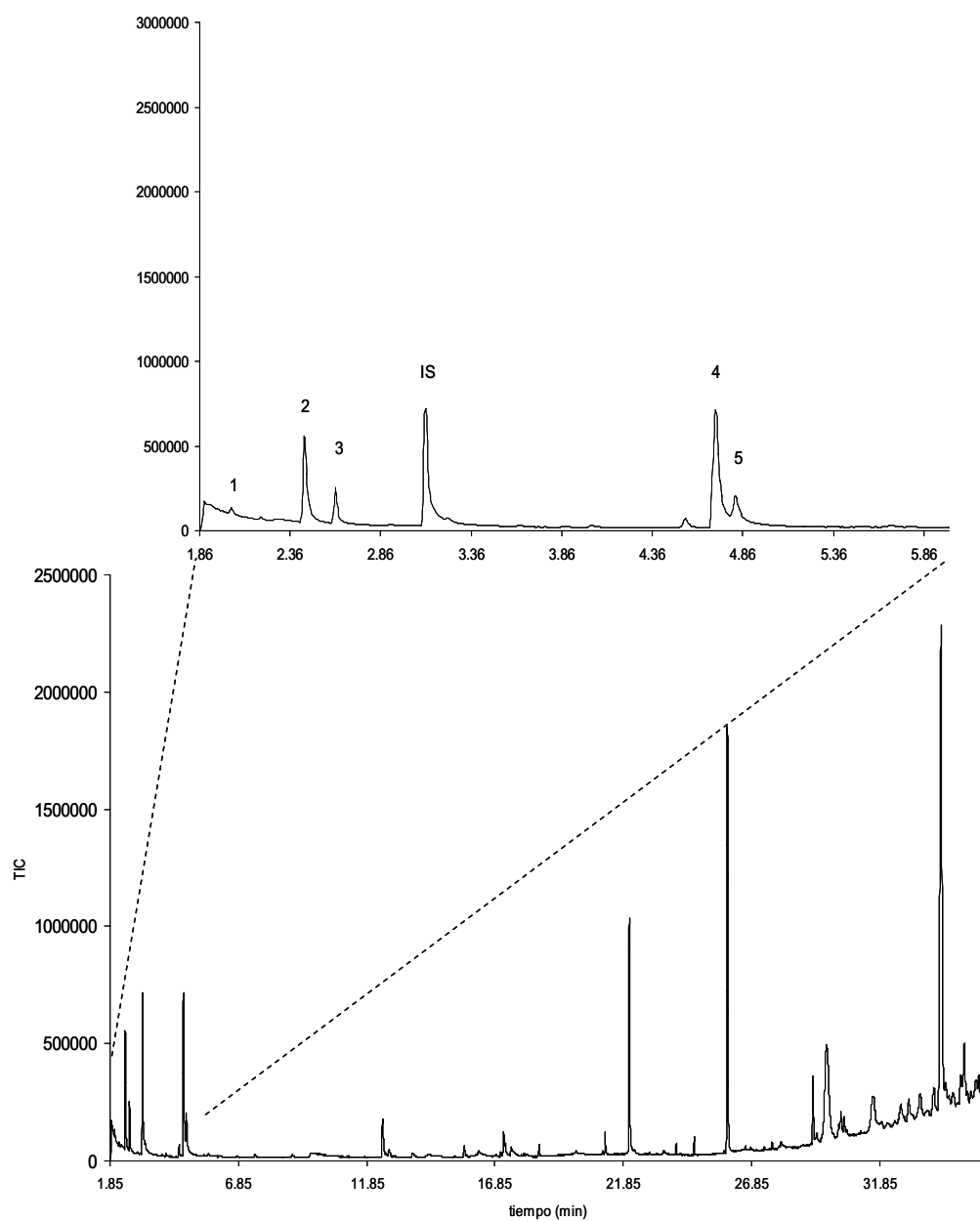


Figura 97. Cromatograma de mezcal. 1) n-propanol, 2) acetato de etilo, 3) 2-metil-propanol, 4) 3-metil-butanol, 5) 2-metil-butanol, IS) patrón interno.

En los diagramas de cajas y bigotes que se muestran en las figuras 98-102 se presentan las concentraciones encontradas de n-propanol, acetato de etilo, 2-metil-propano, 3-metil-butanol y 2-metil-butanol en muestras de los diferentes tipos de tequila: blanco (B), oro (G), reposado (R), añejo (A) y de mezcal (M).

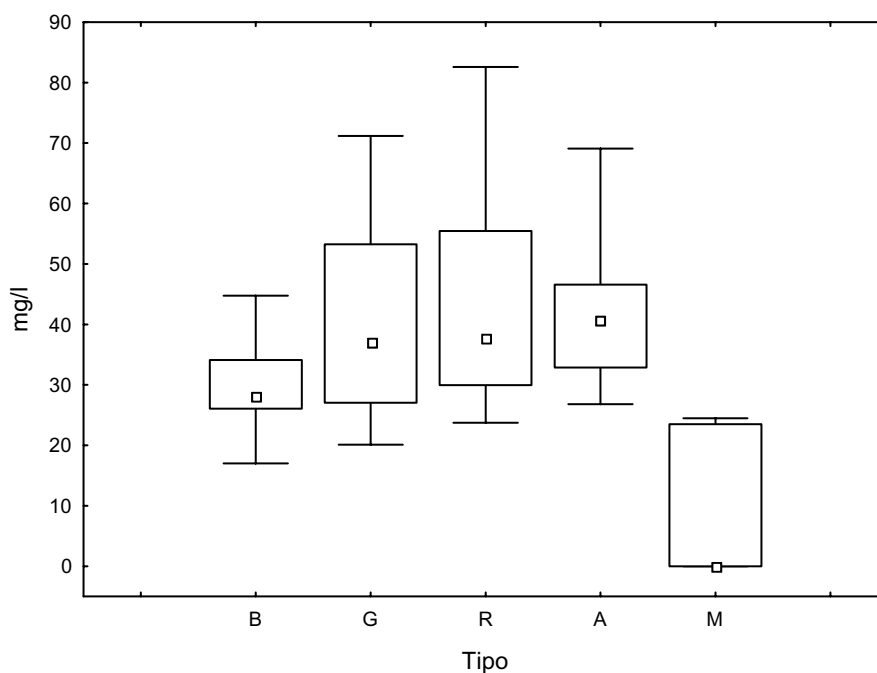


Figura 98. Concentraciones n-propanol. B, blanco; G, oro; R, reposado; A, añejo; M, mezcal.

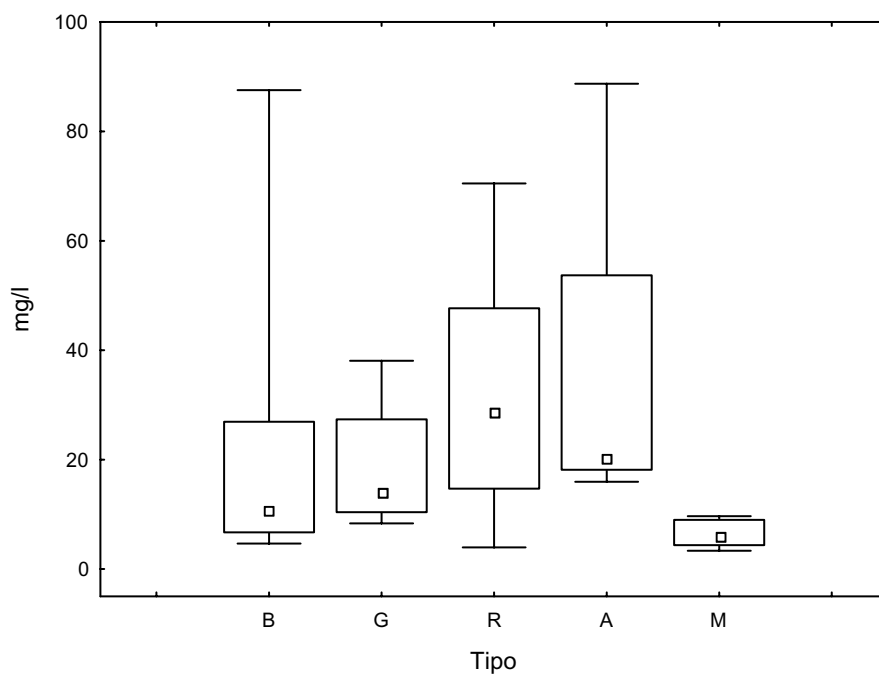


Figura 99. Concentraciones acetato de etilo. B, blanco; G, oro; R, reposado; A, añejo; M, mezcal.

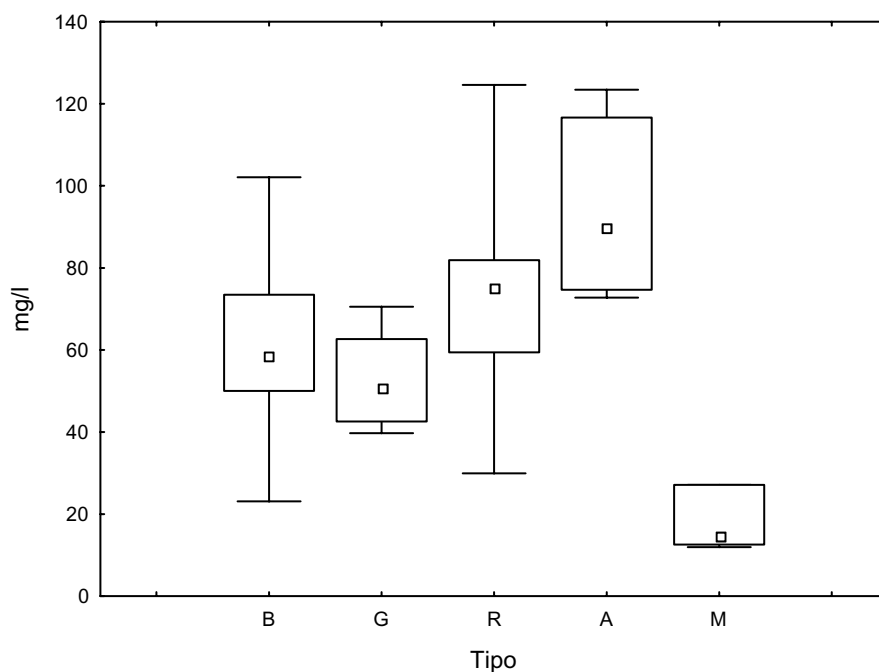


Figura 100. Concentraciones 2-metil-propanol. B, blanco; G, oro; R, reposado; A, añejo; M, mezcal.

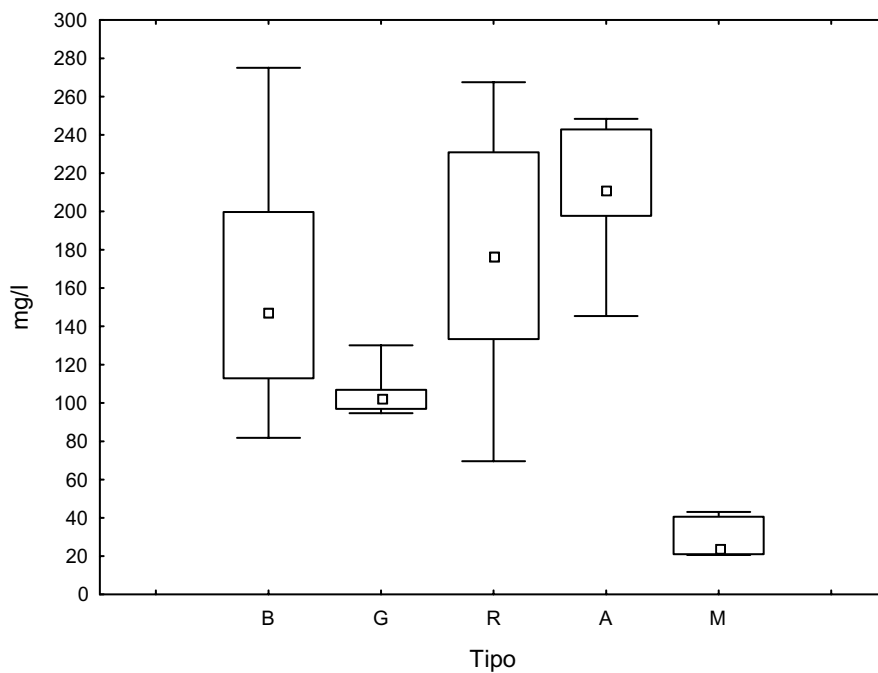


Figura 101. Concentraciones 3-metil-butanol. B, blanco; G, oro; R, reposado; A, añejo; M, mezcal.

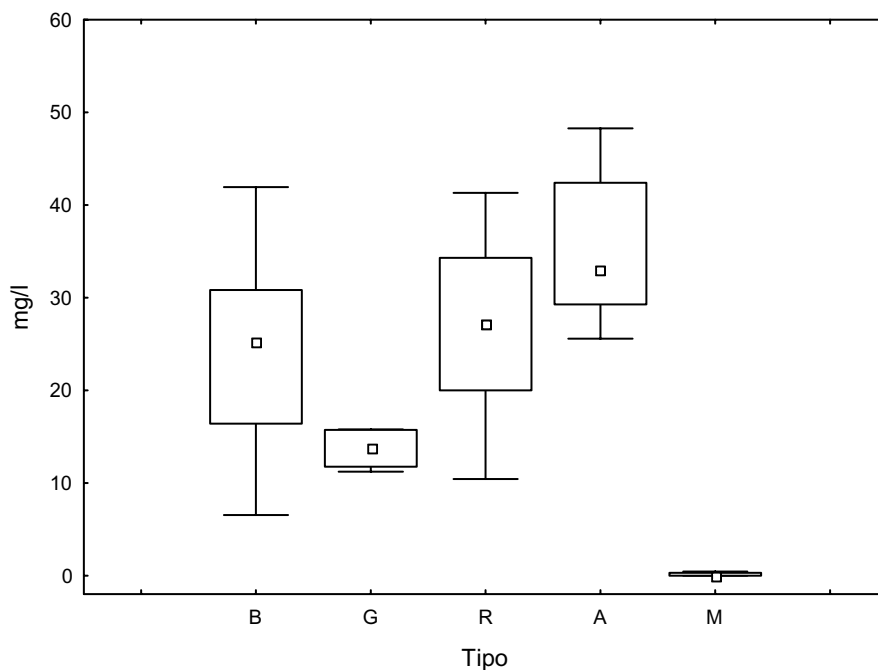


Figura 102. Concentraciones 2-metil-butanol. B, blanco; G, oro; R, reposado; A, añejo; M, mezcal.

En la tabla 21 se presentan los rangos de concentración encontrados para los compuestos volátiles analizados en cada tipo de tequila y mezcal.

Tabla 21. Rango de concentración de (mg/l) de n-propanol, acetato de etilo, 2-metil-propano, 3-metil-butanol y 2-metil-butanol en las muestras analizadas

Compuesto	Blanco	Oro	Reposado	Añejo	Mezcal
n-propanol	44,8-26	71-20	83-24	69-27	24-n.d.
Acetato de etilo	88-4,7	38-8	71-4	89-16	9,7-3,3
2-metil-propanol	102-23	71-40	125-30	123-73	27-12
3-metil-butanol	275-82	130-95	267-70	248-145	43-20,7
2-metil-butanol	42-6,5	16-11	41-10	48-26	0,5-n.d.

n.d. no detectado

Se puede observar en los gráficos de caja y bigotes que los rangos de concentración de tequila son mayores que la de mezcal. En el caso del n-propanol la mediana se encuentra alrededor de los 30 mg/l para todos los tequilas, con un valor extremo superior de 83 mg/l en el tequila reposado. En el caso del mezcal la mediana corresponde a n.d., aunque se encontraron concentraciones de hasta 24 mg/l en algunas muestras. En el acetato de etilo las medianas son de 11, 14, 28, 20 y 6 mg/l para los tequilas blanco, oro, reposado, añejo y mezcal, respectivamente. Con valores extremos superiores de 88 y 89 mg/l, respectivamente, en tequila blanco y añejo. La mediana en el caso del 2-metil-propanol va desde los 58 mg/l hasta los 89 mg/l en las muestras de tequila, y para el mezcal es de 14 mg/l. Se encontraron valores extremos superiores de 102 mg/l y 125 mg/l en tequila blanco y reposado, respectivamente. Y la concentración mínima encontrada fue de 12 mg/l en mezcal. El 3-metil-butanol es el compuesto que se encuentra a mayor concentración en las

muestras analizadas. Las medianas de concentración encontradas fueron de 147, 102, 176, 211 y 24 mg/l para tequilas blanco, oro, reposado, añejo y mezcal, respectivamente. La mayor concentración encontrada fue de 275 mg/l en tequila blanco y la inferior de 20,7 mg/l en mezcal. Por último, el 2-metil-butanol se encuentra por debajo de 0,5 mg/l en las muestras de mezcal analizadas y la mediana es n.d. En el caso del tequila los valores mínimo y máximo fueron de 6,5 mg/l y 42mg/l en el tequila blanco. Las medianas encontradas para cada tipo van desde los 13,8 mg/l para el tequila oro hasta 32,8 mg/l para el tequila añejo.

IV.2.6 Identificación de otros compuestos volátiles y semivolátiles

En los análisis por HS-SPME-GC-MS de las muestras de tequila y mezcal. Se obtienen cromatogramas en los que además de los picos correspondientes a los compuestos volátiles cuantificados aparecen otros picos. En las figuras 103-107 se presentan los cromatogramas correspondientes a muestras de cada uno de los tipos de tequila y mezcal. En cada caso se incluye la ampliación de una parte del cromatograma para poder apreciar mejor los picos. Las asignaciones de los compuestos se han realizado mediante espectrometría de masas.

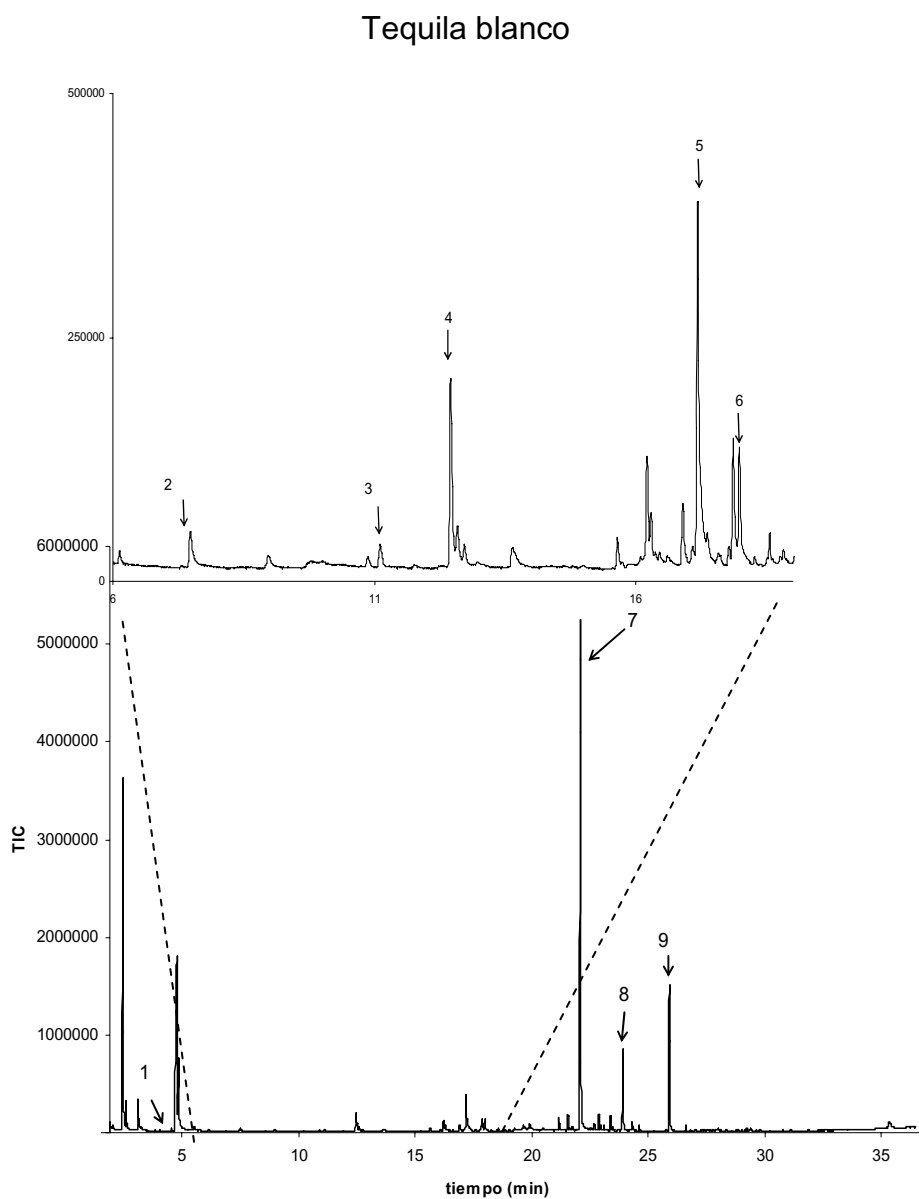


Figura 103. Cromatograma de una muestra de tequila blanco. 1) 1,1-dietoxietano, 2) butirato de etilo, 3) isovalerato de etilo, 4) 3-metilbutilacetato, 5) hexanoato de etilo, 6) limoneno, 7) octanoato de etilo, 8) vitispirano, 9) decanoato de etilo. Los números corresponden a los picos asignados mediante MS.

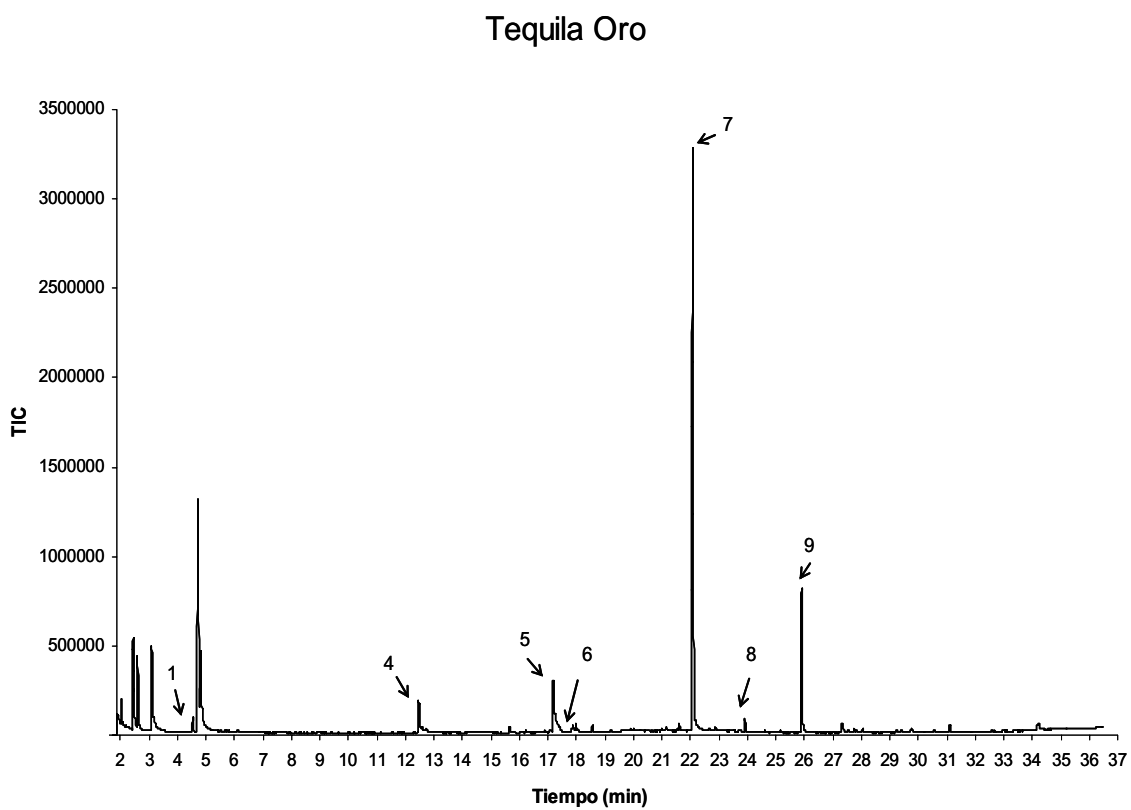


Figura 104. Cromatograma de una muestra de tequila oro. 1) 1,1-dietoxietano, 4) 3-metilbutil-acetato, 5) hexanoato de etilo, 6) limoneno, 7) octanoato de etilo, 8) vitispirano, 9) decanoato de etilo. Los números corresponden a los picos asignados mediante MS.

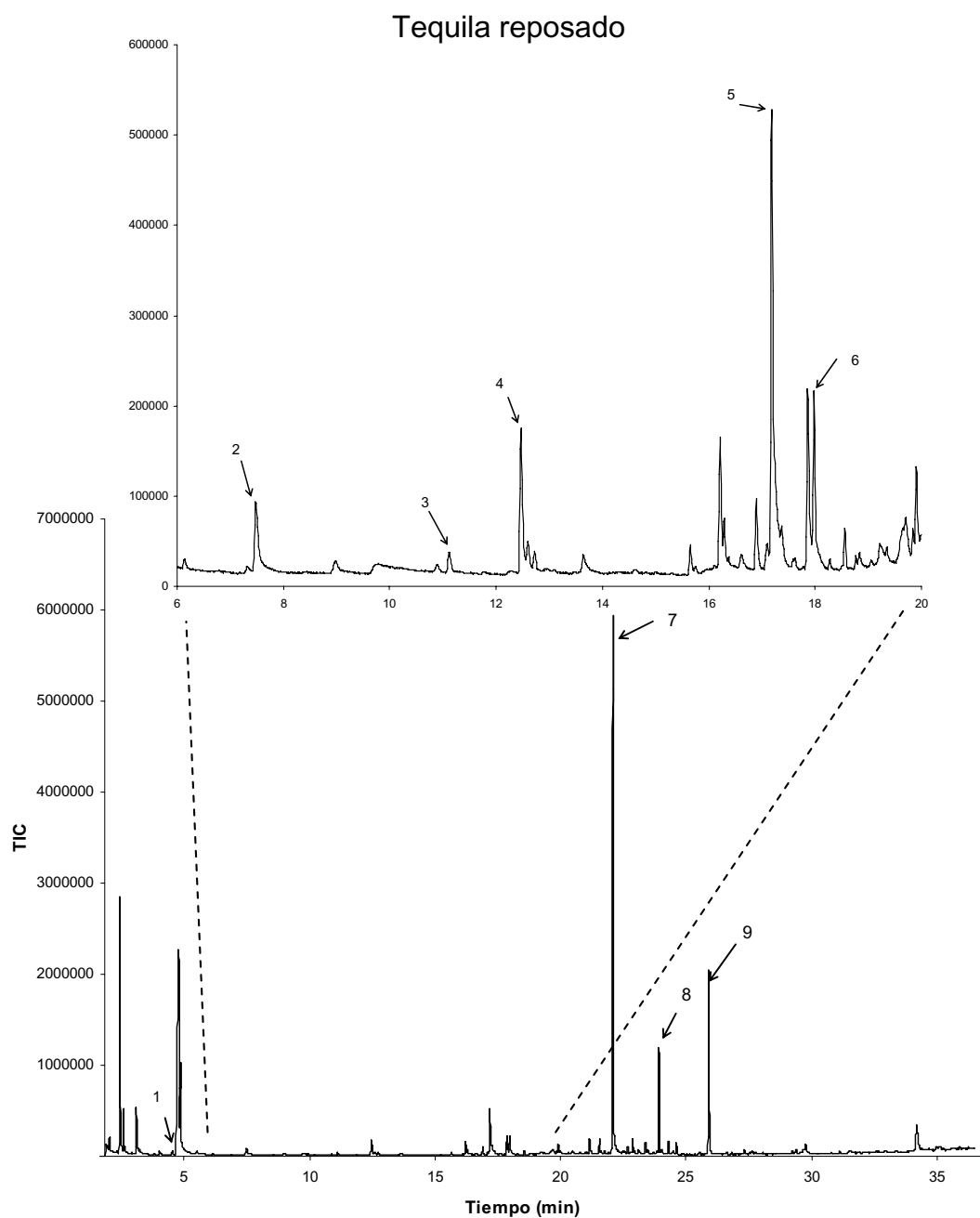


Figura 105. Cromatograma de una muestra de tequila reposado. 1) 1,1-dietoxietano, 2) butirato de etilo, 3) isovalerato de etilo, 4) 3-metilbutilacetato, 5) hexanoato de etilo, 6) limoneno, 7) octanoato de etilo, 8) vitispirano, 9) decanoato de etilo. Los números corresponden a los picos asignados mediante MS.

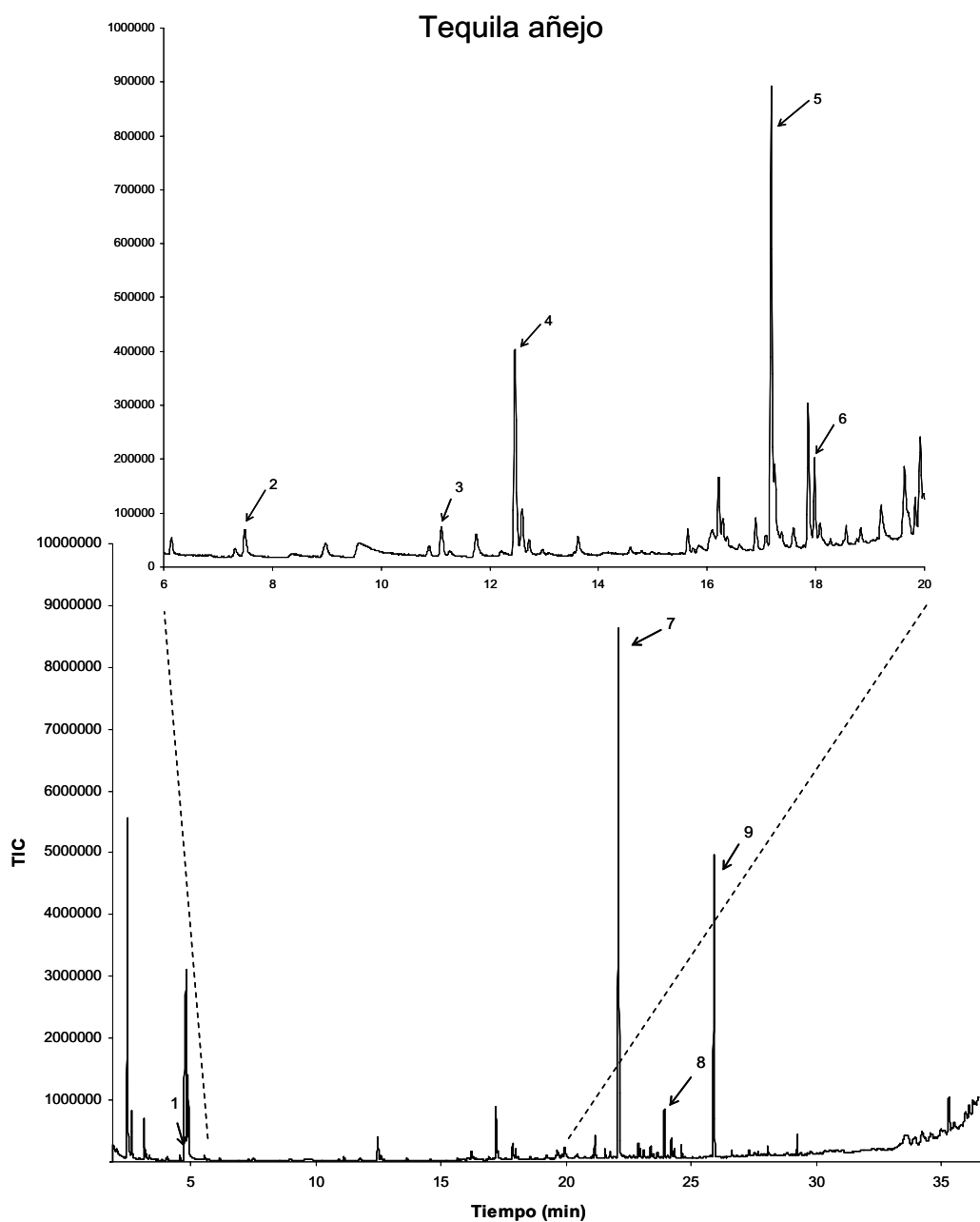


Figura 106. Cromatograma de una muestra de tequila añejo. 1) 1,1-dietoxietano, 2) butirato de etilo, 3) isovalerato de etilo, 4) 3-metilbutilacetato, 5) hexanoato de etilo, 6) limoneno, 7) octanoato de etilo, 8) vitispirano, 9) decanoato de etilo. Los números corresponden a los picos asignados mediante MS.

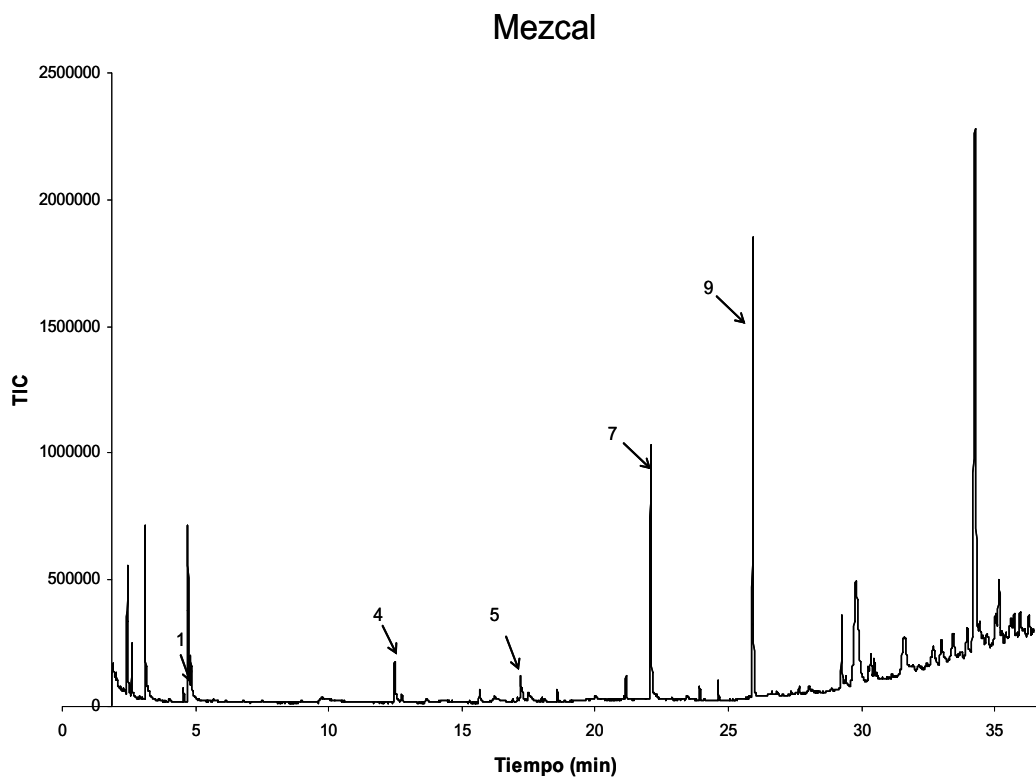


Figura 107. Cromatograma de una muestra de mezcal. 1) 1,1-dietoxietano, 4) 3-metilbutil-acetato, 5) hexanoato de etilo, 6) limoneno, 7) octanoato de etilo, 9) decanoato de etilo. Los números corresponden a los picos asignados mediante MS.

En la tabla 22 se incluyen los valores de m/z de los fragmentos más abundantes encontrados para cada compuesto.

Tabla 22. Patrones de fragmentación de los compuestos identificados.

Compuesto	Principales iones de fragmentación (m/z)
1,1-dietoxietano	29, 45, 73, 103
Butirato de etilo	29, 43, 71, 88
Isovalerato de etilo	41,57,70, 88, 115
Acetato de 3-metilbutilo	43, 95, 70, 87
Hexanoato de etilo	29, 43, 60, 88, 99
Limoneno	53, 68, 93, 121, 136
Octanoato de etilo	60, 73, 88, 101, 127
Vitispirano	93, 121, 136, 177, 192
Decanoato de etilo	43, 70, 88, 101, 157

A 4,53 min, antes de los picos correspondientes a 2-metil-butanol y 3-metil-butanol aparece un pico que se ha asignado al 1,1-dietoxietano. A los 7,78 min aparece el butirato de etilo. A los 11,11 y 12,45 min se observaron los picos del isovalerato de etilo y 3-metilbutilo, respectivamente. El pico asignado al hexanoato de etilo aparece a los 15,65 min. A continuación, se eluye el limoneno a los 17,98 min, después el octanoato de etilo a los 22,08 min y el pico del vitispirano se observa a los 23,91 min. Finalmente el último pico asignado es el del decanoato de etilo cuyo tiempo de retención es 25,89 min. En las figuras 108-116 se incluyen los espectros de masas obtenidos (a) y el correspondiente de la espectroteca (b) para cada uno de los compuestos mencionados. También se presenta el porcentaje de similitud (R) asignado por la librería a los espectros experimentales. Todos los valores obtenidos son cercanos a 1000.

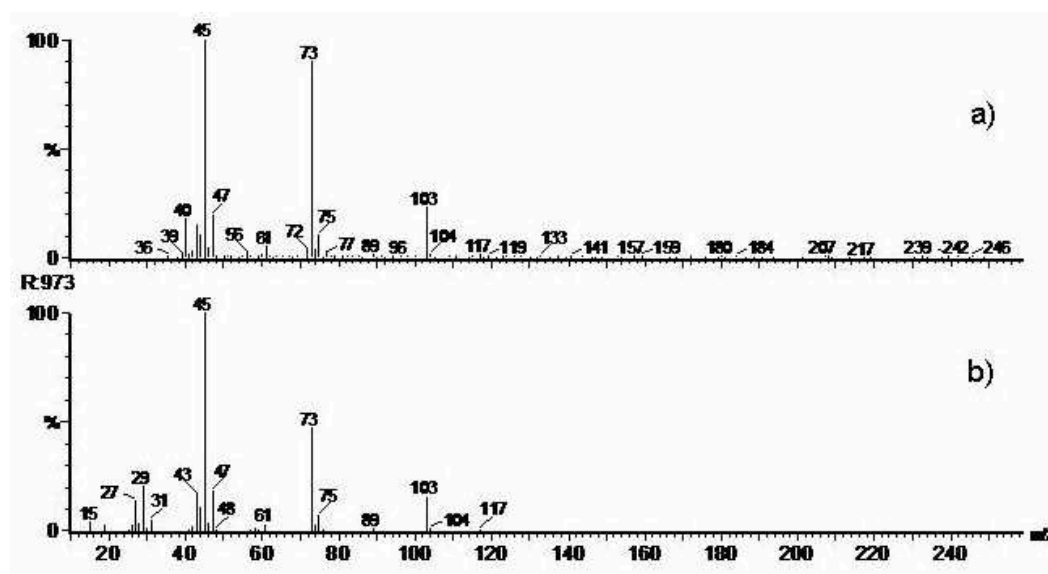


Figura 108. Espectro de masas del 1,1-dietoxetano. a) Experimental; b) Librería.

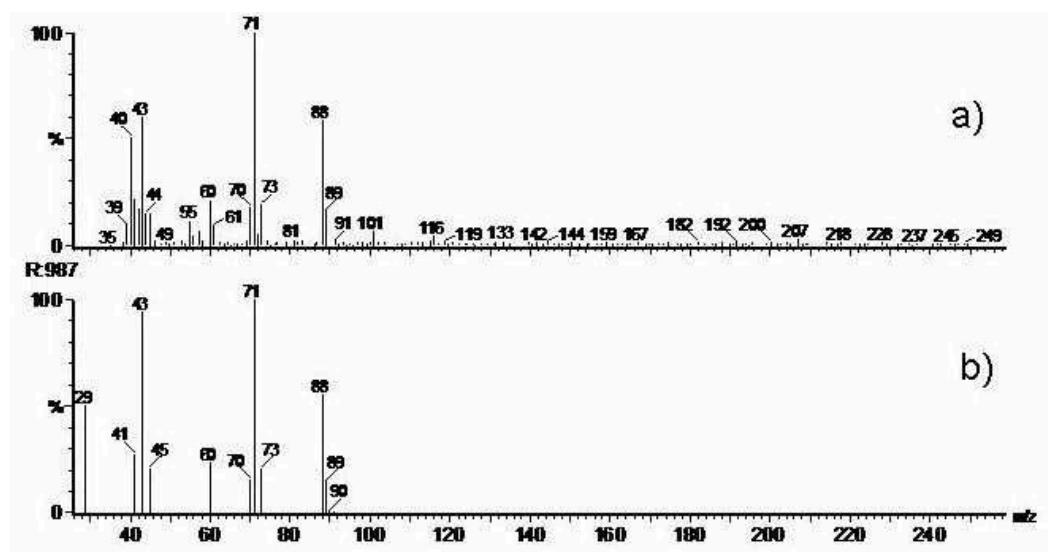


Figura 109. Espectro de masas del butirato de etilo. a) Experimental; b) Librería.

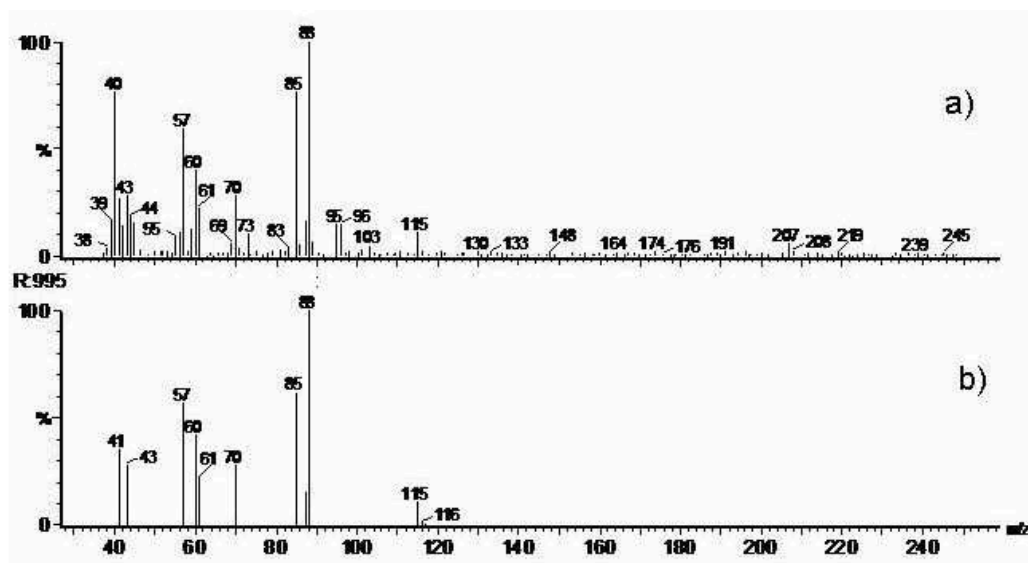


Figura 110. Espectro de masas del isovalerato de etilo. a) Experimental; b) Librería.

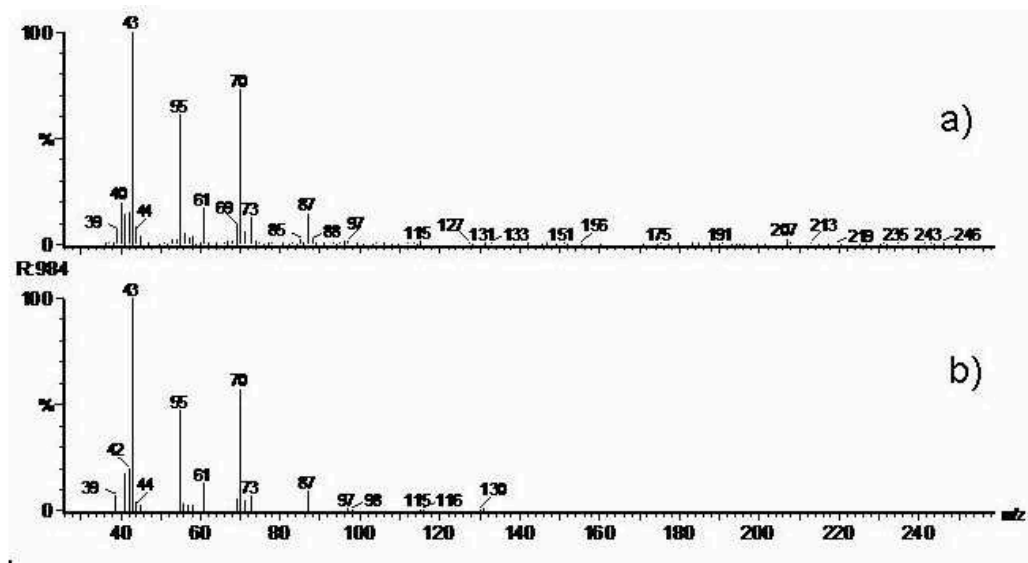


Figura 111. Espectro de masas del acetato 3-metilbutilo. a) Experimental; b) Librería.

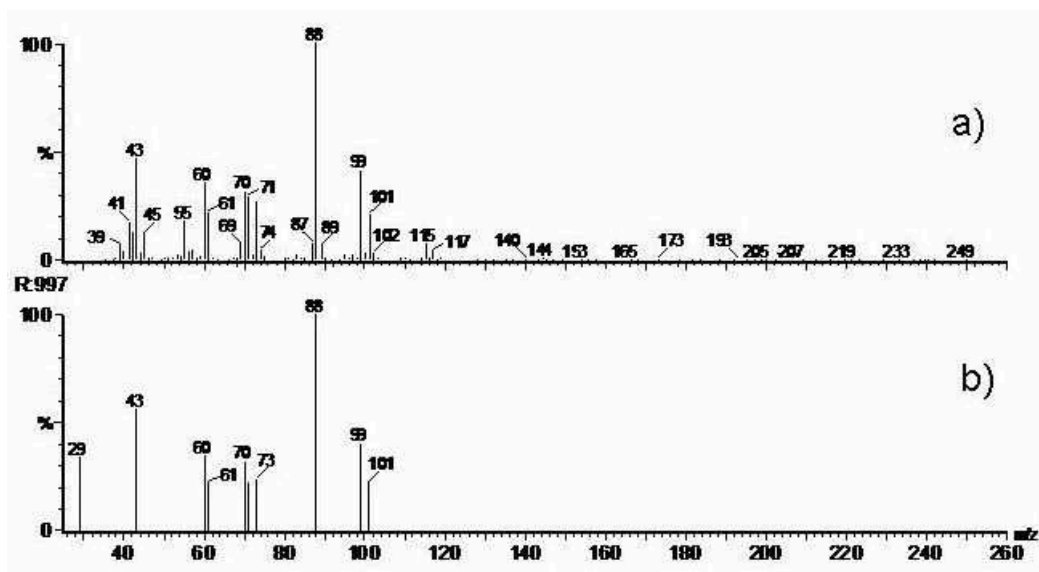


Figura 112. Espectro de masas del hexanoato de etilo. a) Experimental; b) Librería.

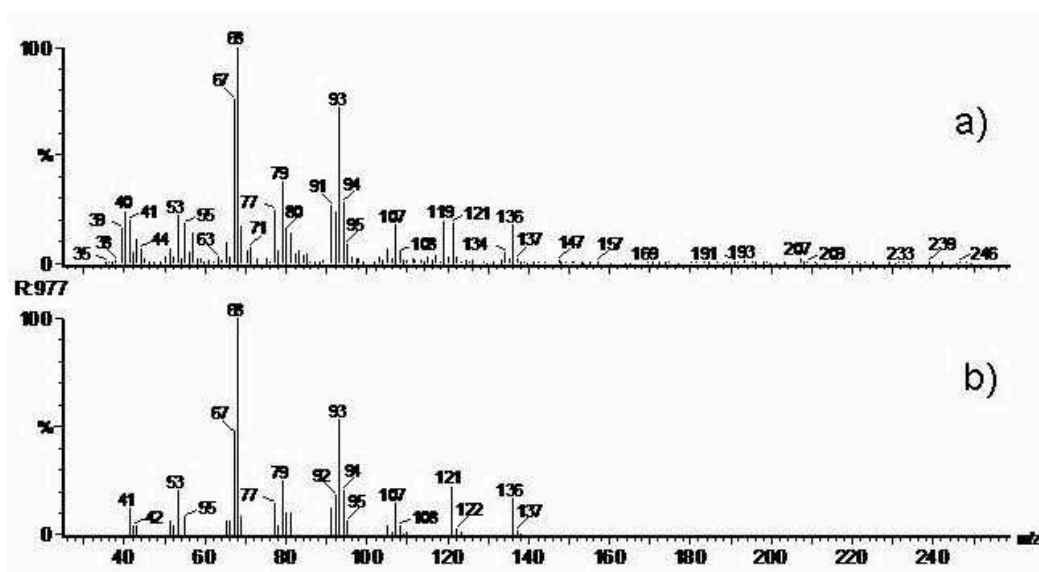


Figura 113. Espectro de masas del limoneno. a) Experimental; b) Librería.

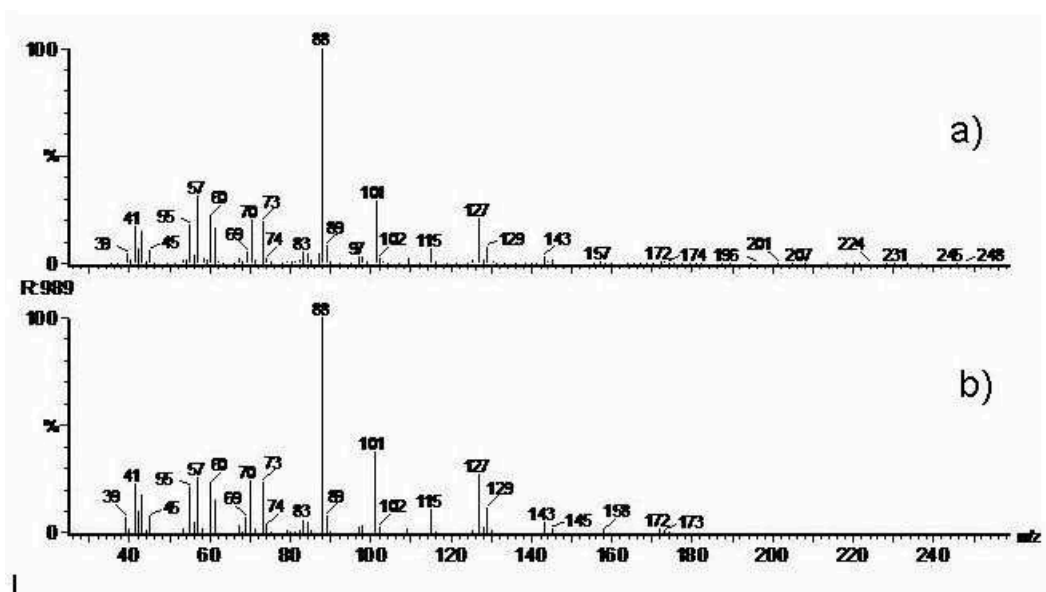


Figura 114. Espectro de masas del octanoato de etilo. a) Experimental; b) Librería.

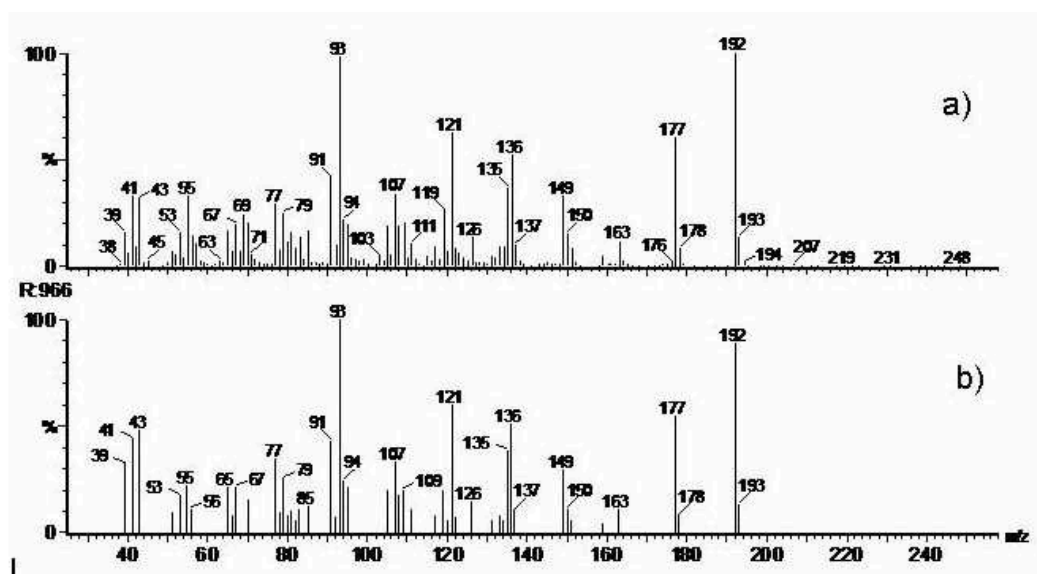


Figura 115. Espectro de masas del vitispirano. a) Experimental; b) Librería.

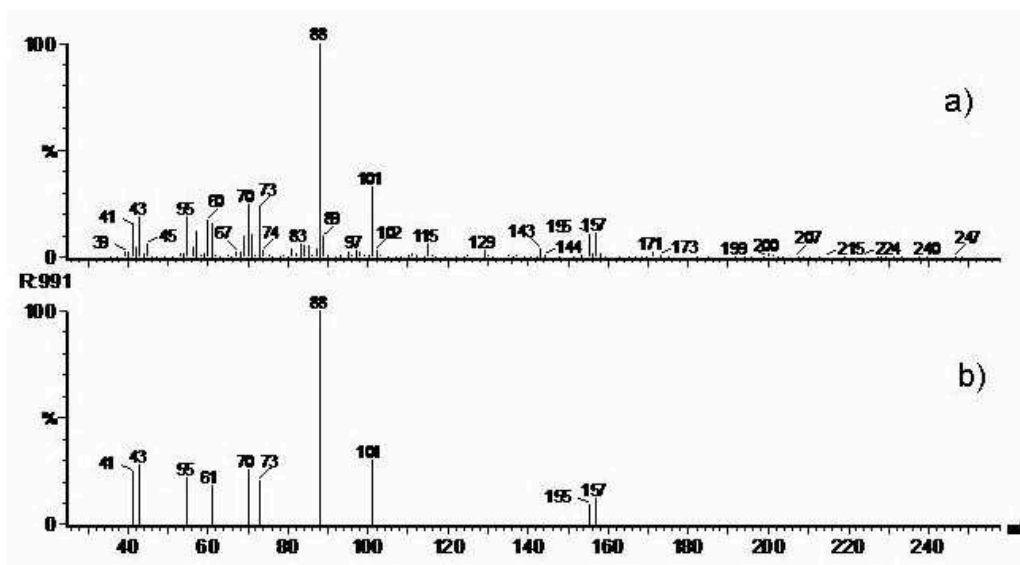
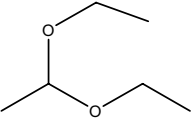
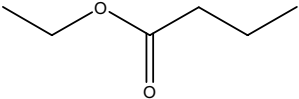
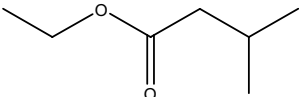
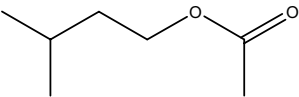
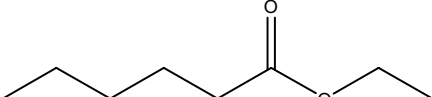
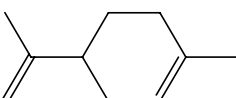
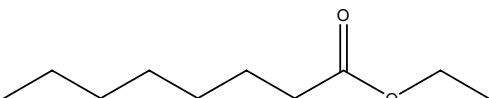
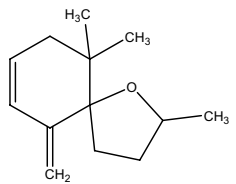
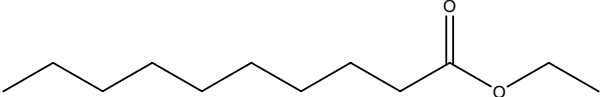


Figura 116. Espectro de masas del decanoato de etilo. a) Experimental; b) Librería.

En la tabla 23 se muestran los nombres, tiempo de retención, número CAS y la fórmula de los compuestos identificados en muestras de tequila blanco, oro, reposado, añejo y mezcal.

Tabla 23. Compuestos identificados en muestras de tequila y mezcal.

Compuesto	Estructura	Tiempo de retención (min)	Número CAS
1,1-dietoxietano		4,53	105-57-7
Butirato de etilo		7,48	105-54-4
Isovalerato de etilo		11,11	108-64-5
Acetato de 3-metilbutilo		12,45	123-92-2
Hexanoato de etilo		15,65	123-66-0
Limoneno		17,98	138-86-3
Octanoato de etilo		22,08	106-32-1
Vitispirano		23,91	65416-59-3
Decanoato de etilo		25,89	110-38-3

Los compuestos son ésteres etílicos de los ácidos butírico, isovalérico, hexanoico, octanoico y decanoico. Estos ésteres, junto con el acetato de etilo constituyen una fracción importante de la parte volátil de los tequilas. El limoneno es un terpeno que se ha detectado en todas las muestras estudiadas. El vitispirano es un compuesto norisoprenoide que se encuentra en la uva y el vino. Su presencia aporta notas afrutadas y alcanforadas en el aroma.

También se detectaron otros compuestos aunque su presencia sólo se confirmó a algunas de las muestras analizadas. Estos compuestos son: 2-etil hexanal, 6-metiltridecano, hexadecanoato de etilo y dodecanoato de etilo.

El aroma característico de los destilados de *Agave tequilana* depende de los compuestos volátiles y semivolátiles presentes en la bebida. Los aceites de fusel: n-propanol, 2-metil-propanol, 3-metil-butanol y 2-metil-butanol le otorgan un carácter fusel (espirituoso, licor barato). Otros compuestos volátiles proporcionan un aroma afrutado como es el caso del decanoato de etilo. En algunos casos el toque afrutado va acompañado de diferentes matices dependiendo del compuesto. Así, el acetato de etilo confiere a la bebida un ligero olor a piña. El 1,1-dietoxietano a fruta verde, el isovalerato de etilo a limón, el butirato de etilo a frambuesa, el hexanoato de etilo a manzana verde, el octanoato de etilo a pera y el vitispirano le otorga un aroma alcanforado. Por último el limoneno le da una fragancia cítrica. [183-185]

IV.2.7 Diferenciación de tequilas y mezcal según su perfil volátil

Se ha realizado un estudio quimiométrico sobre la capacidad de las variables n-propanol, acetato de etilo, 2-metil-propanol, 3-metil-butanol y 2-metil-butanol para diferenciar distintos tipos de tequila y mezcal.

IV.2.7.1 Análisis en componentes principales

En primer lugar se aplicó PCA para visualizar posibles tendencias de los datos. Se construyó una matriz de datos para el tratamiento quimiométrico utilizando los compuestos volátiles analizados como variables y las muestras de tequila y mezcal como casos. Se calcularon dos componentes principales, que explicaban el 81% del total de la varianza de los datos: PC1 explica el 60% y PC2 21% de la varianza [113]. En el caso de PC1, las variables con mayor peso son 2-metil-propanol, 3-metil-butanol y 2-metil-butanol y para PC2 el n-propanol. Representando las muestras en el espacio bidimensional de los PCs calculados (figura 117), no se observan tendencias claras que permitan establecer alguna separación entre las distintas clases de bebidas. Sólo se aprecia un agrupamiento de las muestras de mezcal en la zona de valores positivos de PC1.

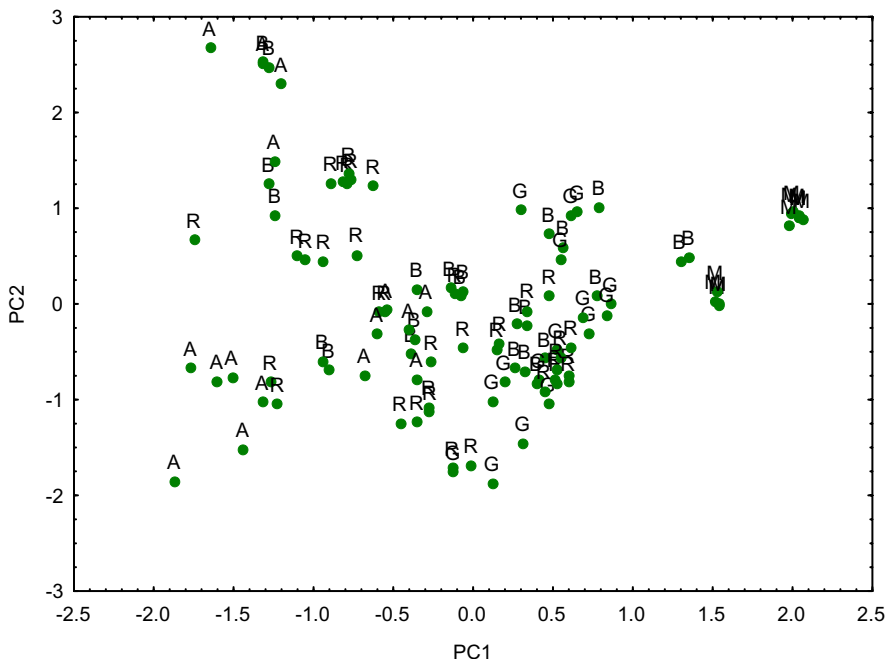


Figura 117. Muestras en el espacio de los dos primeros PCs. B, blanco; G, oro; R, reposado; A, añejo; M, mezcal.

IV.2.7.2 Análisis discriminante lineal

Posteriormente se aplicó LDA, ésta técnica de reconocimiento de patrones supervisado permite obtener reglas de clasificación adecuadas para diferenciar las muestras atendiendo a la clase a la que pertenecen. Cada una de estas clases se dividió aleatoriamente en dos grupos de entrenamiento y verificación respectivamente. Este método asume el conocimiento *a priori* del número de clases y la pertenencia de las muestras a cada clase en el entrenamiento de los datos. El porcentaje de muestras en cada uno de los grupos mencionados fue del 50%. Para seleccionar las variables incluidas en el análisis, se utilizó el análisis discriminante “stepwise forward” [138, 177]. En nuestro caso, los descriptores seleccionados fueron: n-propanol, 2-metil-propanol, 3-metil-

butanol y 2-metil-butanol. De esta manera se obtuvieron cuatro funciones discriminantes (DF) cuyas ecuaciones se detallan a continuación:

$$DF1 = -0,38 \text{ 2-metil-butanol} - 0,42 \text{ n-propanol} - 0,32 \text{ 2-metil-propanol} - 0,36 \text{ 3-metil-butanol}$$

$$DF2 = 0,44 \text{ 2-metil-butanol} - 0,92 \text{ n-propanol} + 0,18 \text{ 2-metil-propanol} - 0,07 \text{ 3-metil-butanol}$$

$$DF3 = -0,70 \text{ 2-metil-butanol} - 0,30 \text{ n-propanol} + 1,15 \text{ 2-metil-propanol} - 0,24 \text{ 3-metil-butanol}$$

$$DF4 = 1,15 \text{ 2-metil-butanol} + 0,09 \text{ n-propanol} - 0,12 \text{ 2-metil-propanol} - 1,27 \text{ 3-metil-butanol}$$

La figura 118 representa las muestras en el espacio definido por las funciones discriminantes: DF1, DF2 y DF3. Cada tipo de muestras tienden a agruparse, observando cierta separación de acuerdo a su clase. Sin embargo, entre los grupos formados por los distintos tipos de bebidas no se logra una separación clara. Tal como se observa en la figura 119 definida por DF1 y DF2.

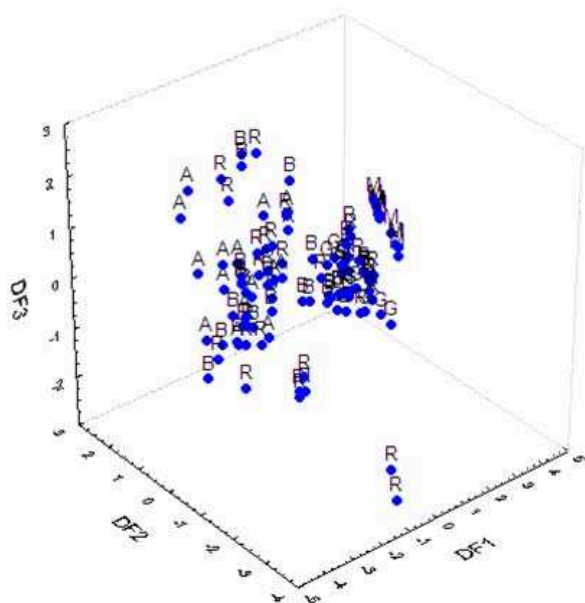


Figura 118. Distribución de las muestras en el espacio definido por DF1, DF2 y DF3. B, blanco; G, oro; R, reposado; A, añejo; M, mezcal.

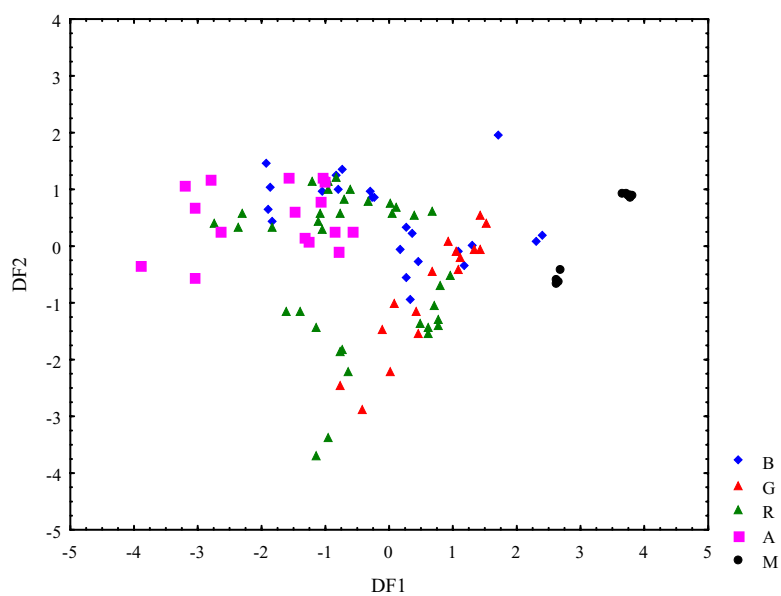


Figura 119. Distribución de las muestras en el espacio definido por DF1 y DF2. B, blanco; G, oro; R, reposado; A, añejo; M, mezcal.

Considerando las reglas de clasificación obtenidas, se calcularon los falsos positivos y negativos para calcular la especificidad y sensibilidad para cada tipo de bebida. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 24. Los porcentajes de especificidad obtenidos son próximos al 80% o superiores. En el caso del mezcal el porcentaje es casi del 98%. Los valores de sensibilidad no son muy altos excepto para mezcal que es del 100%.

Tabla 24. Especificidad y sensibilidad obtenidos con LDA.

	Blanco	Oro	Reposado	Añejo	Mezcal
Falsos Positivos	17	10	16	9	2
Especificidad (%)	79	89	76	90	98
Falsos Negativos	13	10	23	8	0
Sensibilidad (%)	46	38	36	50	100

También se han aplicado las técnicas de clasificación Análisis Cluster y SIMCA. Debido a que los resultados obtenidos no mejoraron los de LDA, no se han incluido en esta memoria.

IV.2.7.3 Algoritmos neuronales artificiales

Debido a que no se logró clasificar mediante el uso de métodos paramétricos las bebidas de tequila y mezcal, se decidió aplicar métodos no paramétricos, como lo son los ANN. Se realizó un entrenamiento

donde se tomaron aleatoriamente el 50% del total de las muestras. El otro 50% de muestras se dividió en dos grupos, el 25% para verificación y el otro 25% restante para realizar el test. PNN fue la red neuronal con la que se obtuvieron los mejores resultados. En la figura 120 se presenta la estructura de la red. La capa de entrada contiene 5 neuronas que corresponden al contenido de n-propanol, acetato de etilo, 2-metil-propanol, 3-metil-butanol y 2-metil-butanol. La capa de patrones esta compuesta de un número de neuronas que equivalen al número de muestras del grupo de entrenamiento. La capa de suma contiene 5 neuronas que corresponden a la probabilidad de que las muestras pertenezcan a una de las 5 clases consideradas. Finalmente, la capa de decisión de la red que consiste en una neurona que indica la probabilidad más alta de una muestra de pertenecer a una de las clases de tequila o mezcal.

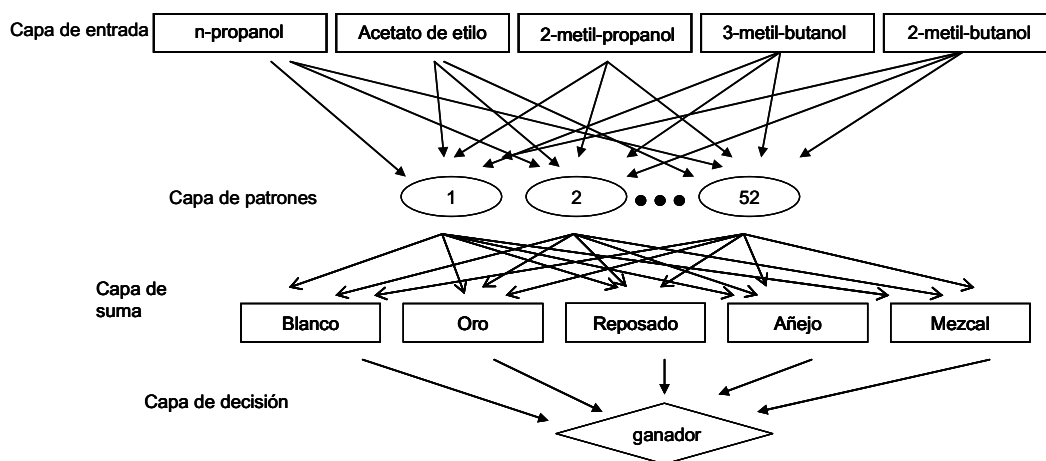


Figura 120. Arquitectura de la PNN utilizada.

A partir de los datos de clasificación obtenidos en el entrenamiento, se calcularon los falsos positivos y negativos, así como la especificidad y sensibilidad el método. Dichos datos se presentan en la tabla 25.

Tabla 25. Especificidad y sensibilidad obtenidos con PNN.

	Blanco	Oro	Reposado	Añejo	Mezcal
Falsos Positivos	2	2	2	0	0
Especificidad (%)	90	91	88	100	100
Falsos Negativos	2	2	2	0	0
Sensibilidad (%)	67	50	78	100	100

Como se puede observar el método presenta una especificidad y sensibilidad del 100% para el mezcal y el tequila añejo. En los otros tipos de tequila la sensibilidad es menor al 80%, mientras que la especificidad se encuentra alrededor del 90%. Los resultados de clasificación mejoran claramente los obtenidos mediante LDA.

IV.3 Determinación de furfural y 5-hidroximetilfurfural mediante HPLC

El furfural es un compuesto que se forma por deshidratación de las pentosas en medio ácido y con calor. Puede estar presente en bebidas destiladas. En una concentración que varía de acuerdo con el tipo de bebida, el tipo de destilación y las reacciones que ocurren en el proceso de envejecimiento. El 5-hidroximetilfurfural también puede formarse en estos procesos, pudiendo detectarse en los destilados a niveles de baja concentración.

El furfural es uno de los parámetros recogidos en la norma mexicana NMX-004-NORMEX-2005 [25] citada en la NOM para el análisis de tequila. La NOM propone la cromatografía líquida como técnica de análisis para el furfural. En esta memoria se ha aplicado el método propuesto por Alcázar et al. [186] en el que se lleva a cabo la determinación de furfural (F) y 5-hidroximetilfurfural (HMF) mediante HPLC. La tabla 26 incluye las condiciones cromatográficas utilizadas.

Tabla 26. Condiciones cromatográficas para la determinación de furfural y 5-hidroximetilfurfural.

Método	Condiciones
Columna	C-18 (250x0,46cm)
Volumen de inyección	20 μ L
Flujo	1,2 ml/min
Temperatura columna	30 °C
Detector UV	280nm
Fase móvil	Acetonitrilo-tampón A (18-82) (v:v)
Tampón A: ácido acético 0,035M y ácido fosfórico 0,004M	

En la figura 121 se presenta un cromatograma de patrones obtenido con las condiciones citadas.

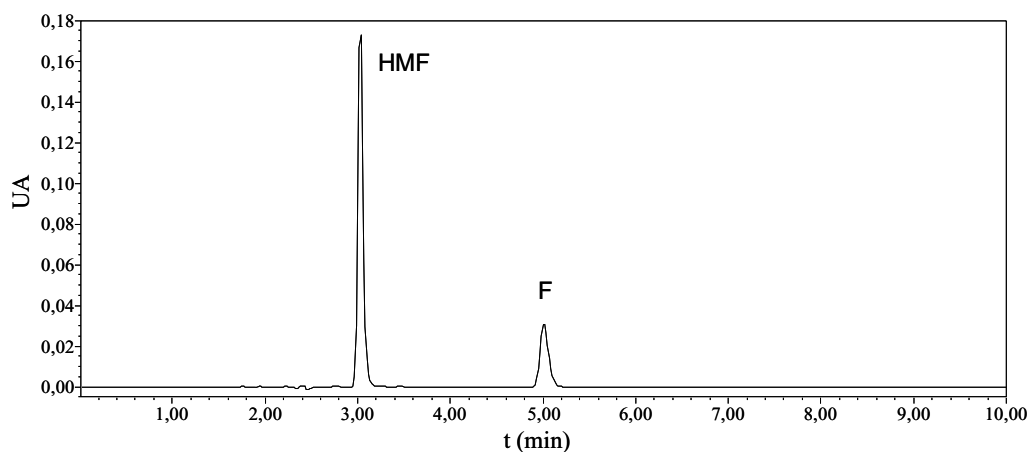


Figura 121. Cromatograma de disolución estándar de HMF (5 mg/l) y F (1 mg/l).

Los picos de HMF y F, aparecen a 3 min y 4,9 min, respectivamente.

Se comprobó la linealidad [175] del método, siendo ésta del 99% en HMF y F, en ambos casos. Las rectas de calibrado para cada compuesto se presentan en las figuras 122 y 123.

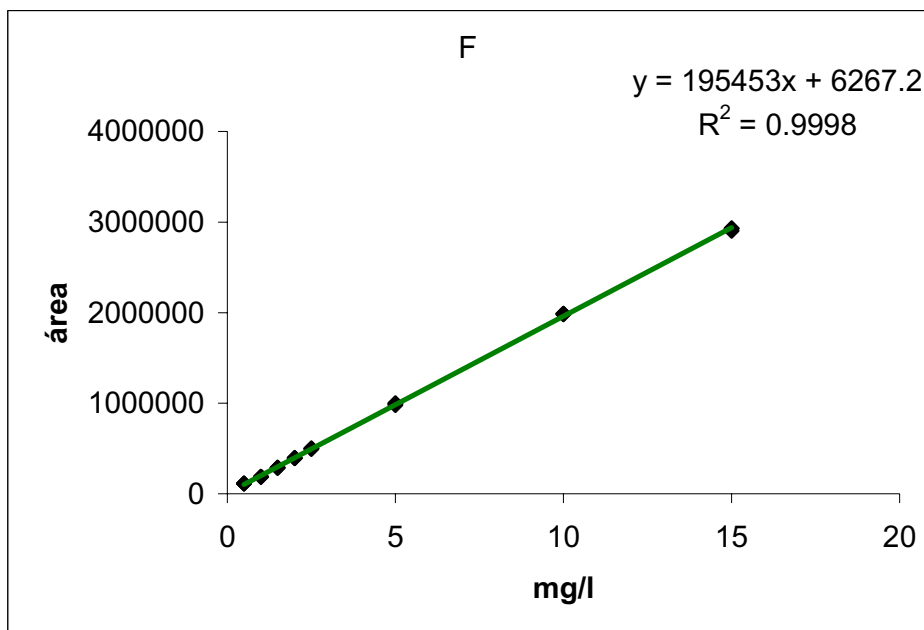


Figura 122. Recta de calibrado para furfural

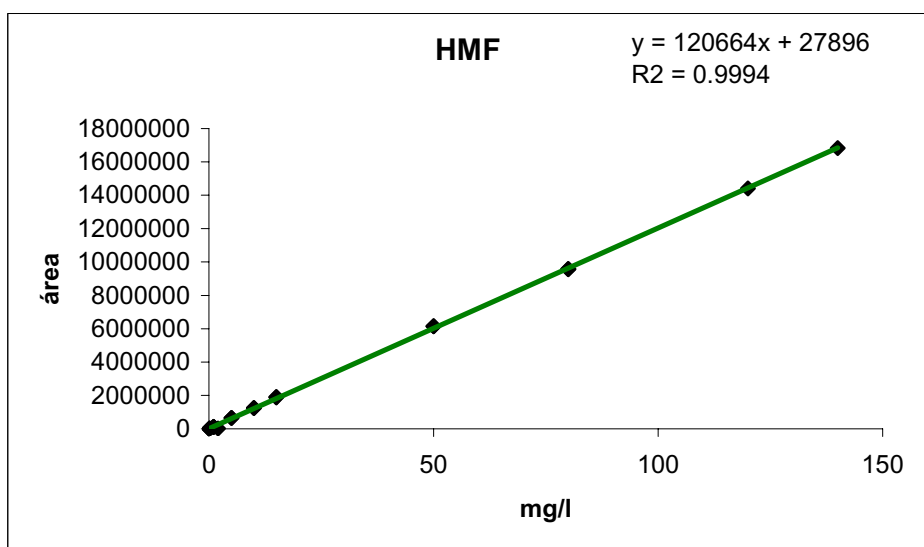


Figura 123. Recta de calibrado para 5-hidroximetilfurfural

En la tabla 27 se resumen los parámetros de calibración obtenidos.

Tabla 27. Parámetros de calibración de compuestos volátiles analizados.

Compuesto	Rango lineal (mg/l)	b	S _b	a	S _a	S _{x/y}	r
HMF	0,5 - 140	120664	597	27896	37443	152104	0,9997
F	0,5-15	195453	613	6267	4137	14568	0,9999

b: pendiente de la recta de calibrado; S_b: desviación estándar de la pendiente; a: ordenada en el origen; S_a: desviación estándar de la ordenada; S_{x/y}: error típico de la recta de calibrado; r: coeficiente de correlación.

IV.3.1 Contenido de 5-hidroximetilfurfural y furfural en muestras de tequila y mezcal

Se determinó el contenido de HMF y F en 90 muestras de tequila de las cuales 33 eran blanco, 12 oro, 33 reposado y 12 añejo, también se analizaron 9 mezcal. Cada muestra se analizó por triplicado. En el apéndice III se presenta el valor promedio de concentración obtenido con su respectiva desviación estándar. En las figuras 124-128 se muestran cromatogramas obtenidos para cada uno de los tipos de tequila y mezcal analizadas.

En todos los cromatogramas aparecen los picos de HMF y F separados de otros picos de compuestos presentes en las muestras analizadas. Mediante adición patrón se confirmó que los picos pertenecían a HMF y F. La pureza se confirmó superponiendo los espectros UV del pico de tres puntos del pico cromatográfico. En todos los casos se comprobó que los picos obtenidos para HMF y F correspondían a un único compuesto.

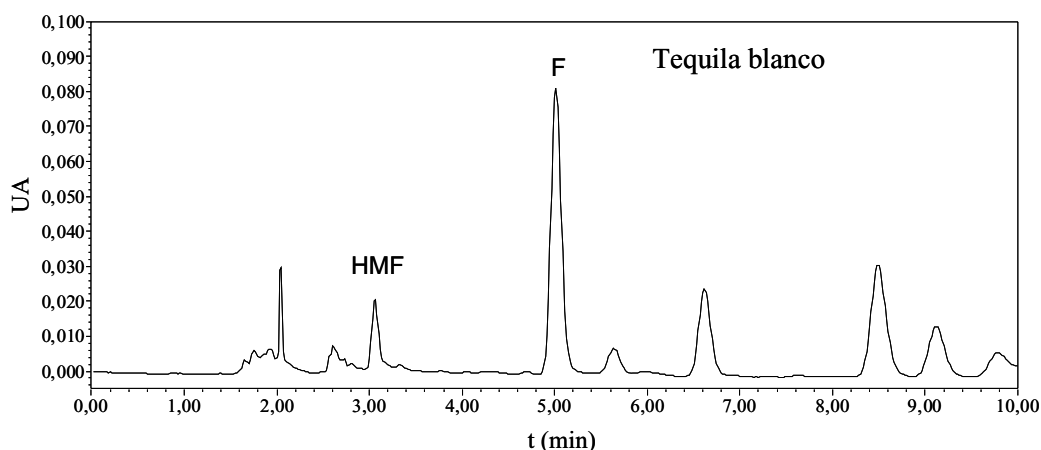


Figura 124. Cromatograma de una muestra de tequila blanco.

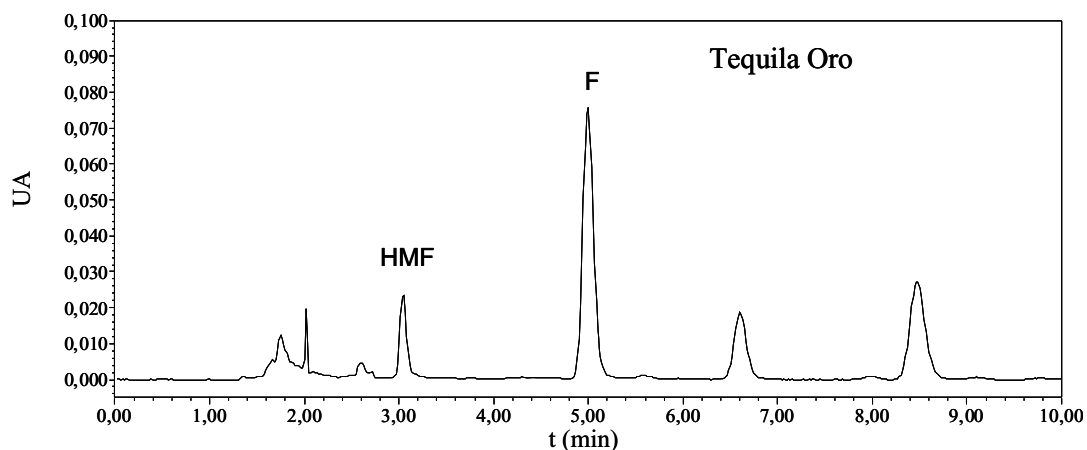


Figura 125. Cromatograma de una muestra de tequila oro.

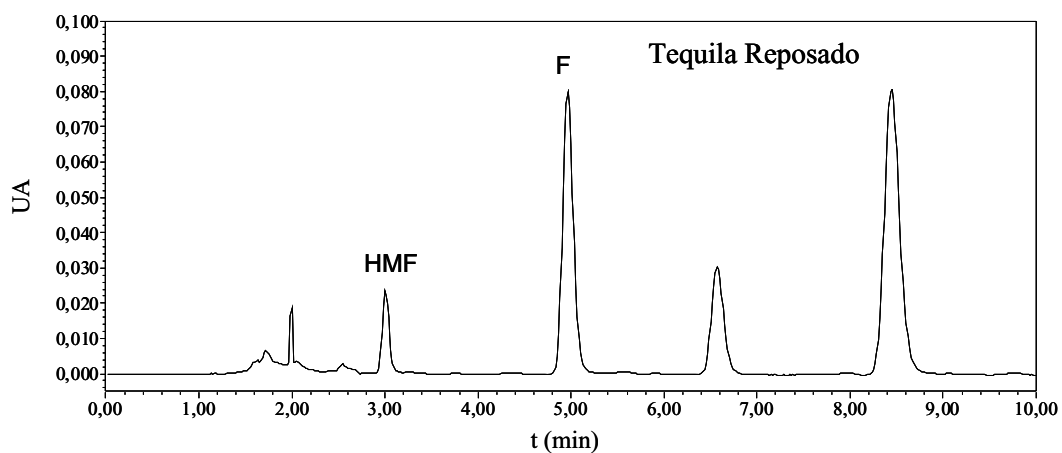


Figura 126. Cromatograma de una muestra de tequila reposado.

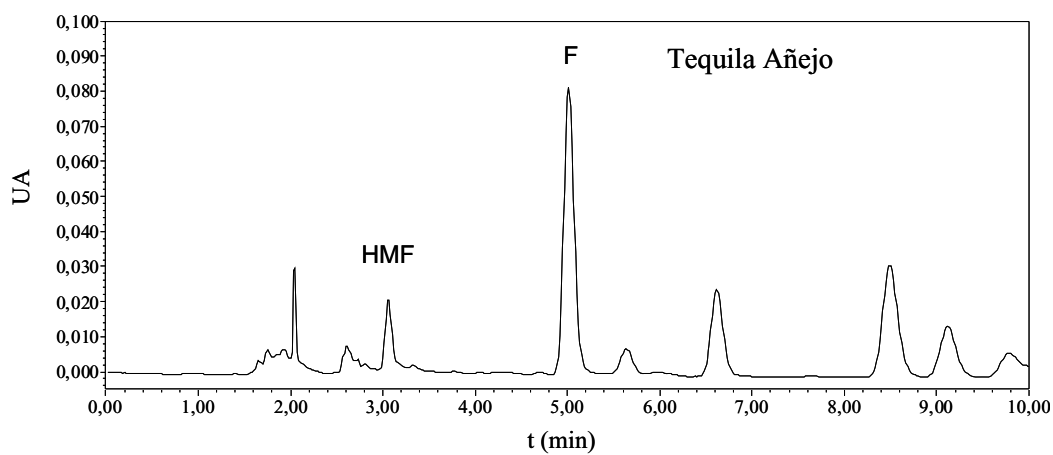


Figura 127. Cromatograma de una muestra de tequila añejo.

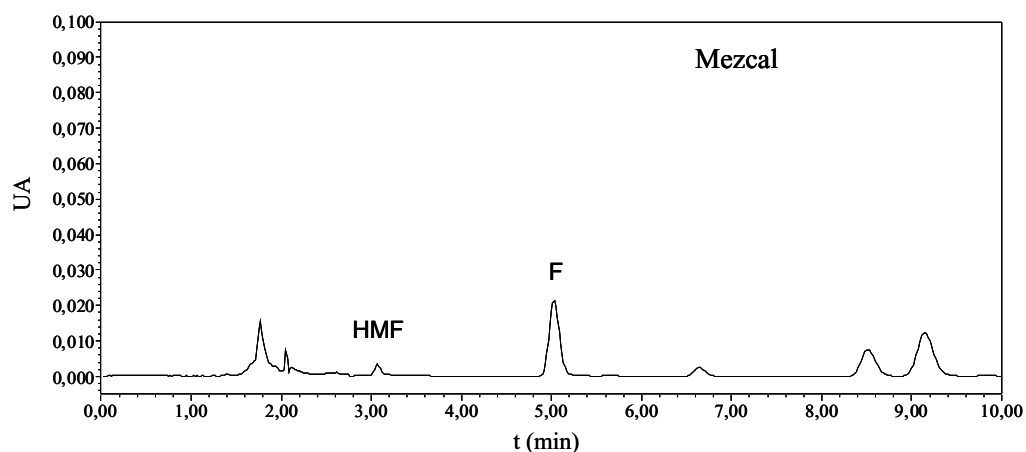


Figura 128. Cromatograma de una muestra de mezcal.

En los gráficos 129 y 130 de cajas y bigotes se presenta de manera esquemática los rangos de concentración obtenidos del análisis de 5-hidroximetilfurfural y furfural en las muestras analizadas.

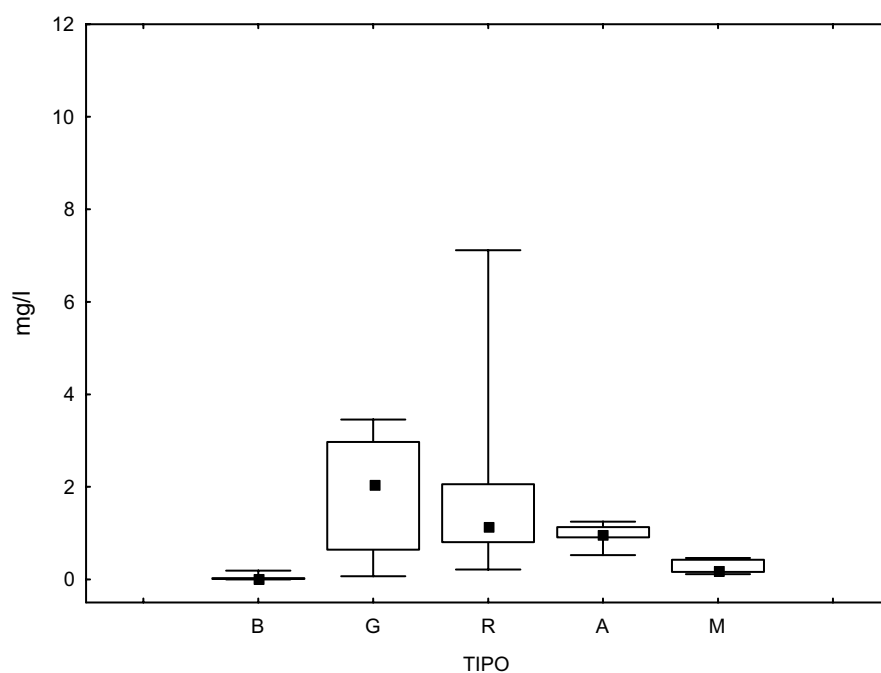


Figura 129. Contenido de 5-hidroximetilfurfural en tequila y mezcal. B, blanco; G, oro; R, reposado; A, añejo; M, mezcal.

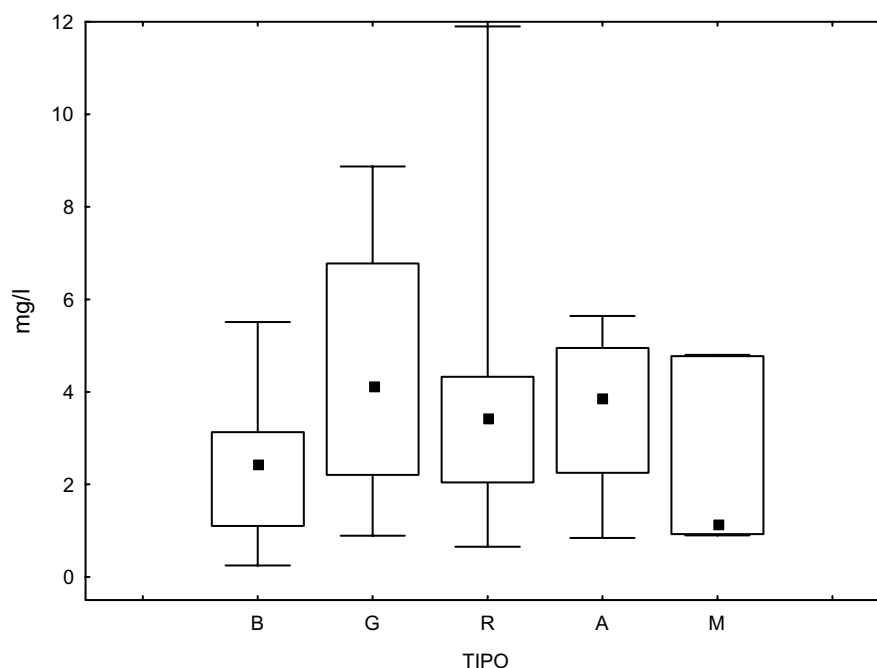


Figura 130. Contenido de furfural en tequila y mezcal. B, blanco; G, oro; R, reposado; A, añejo; M, mezcal.

En la tabla 28 se presentan los rangos de concentración para cada tipo de tequila y mezcal.

Tabla 28. Rangos de concentración (mg/l) de furfural y 5-hidroximetilfurfural en muestras de tequila y mezcal

Tipo	Furfural	5-hidroximetilfurfural
Blanco	5,50 - 0,31	0,12 - n.d.
Oro	8,84 - 0,89	3,16 - 0,10
Reposado	11,82 - 0,69	6,87 - 0,24
Añejo	5,61 - 0,93	1,22 - 0,67
Mezcal	4,79 - 0,91	0,42 - 0,15

n.d.: no detectado.

Las concentraciones encontradas de furfural y 5-hidroximetilfurfural no superan los 12 mg/l. En el caso del furfural se encontraron medianas de concentración de 0,02, 4,15, 3,44, 3,87 y 1,14 mg /l para tequila blanco, oro, reposado, añejo y mezcal respectivamente. El valor extremo superior fue de 11,82 mg/l en el tequila reposado. El caso del 5-hidroximetilfurfural las concentraciones fluctúan entre n.d. para el tequila blanco hasta los 6,9 mg/l en el tequila reposado. Se encontraron medianas de concentración para el tequila blanco, oro, reposado, añejo y mezcal de 2,47, 2,05, 1,15, 0,98 y 0,17 mg/l, respectivamente.

IV.4 Determinación de extracto seco y ceniza

El extracto seco y cenizas son parámetros recogidos en la norma mexicana MNX-017-NORMEX-2005 [24] citada en la NOM. Dan una medida de la cantidad de compuestos no volátiles e inorgánicos presentes en el tequila.

IV.4.1 Contenido de extracto seco y cenizas en muestras de tequila y mezcal

Siguiendo el método descrito por la normativa detallada en el apartado III.2.4 se procedió a calcular el contenido de extracto seco y ceniza en 90 muestras de tequila y 9 de mezcal. El análisis se llevo a cabo por triplicado Los valores obtenidos para cada muestra se presentan en el apéndice IV.

Las figuras 131 y 132 se presentan los rangos de concentración obtenidos en forma de gráficos de cajas y bigotes.

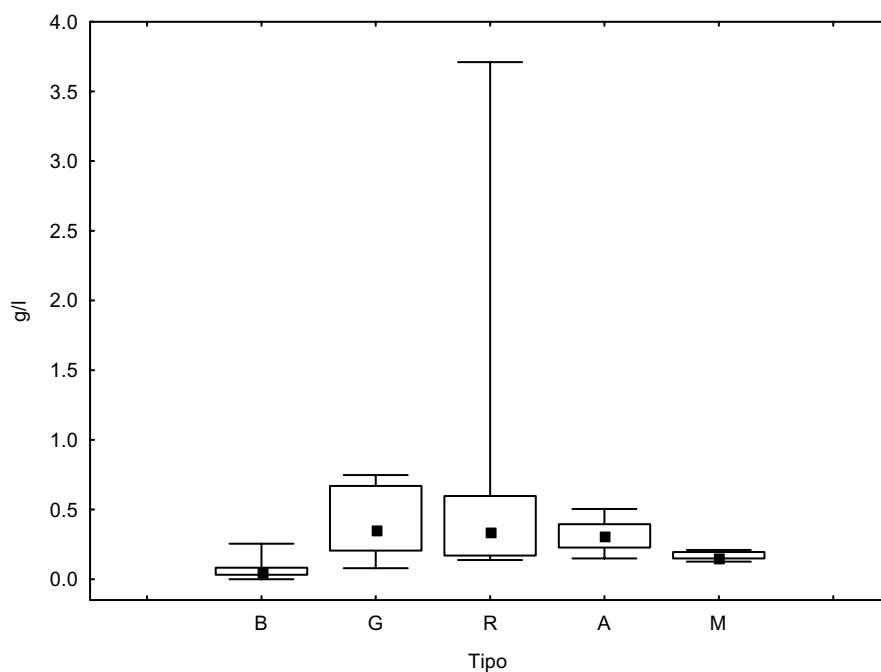


Figura 131. Contenido de extracto seco en bebida de tequila y mezcal. B, blanco; G, oro; R, reposado; A, añejo; M, mezcal.

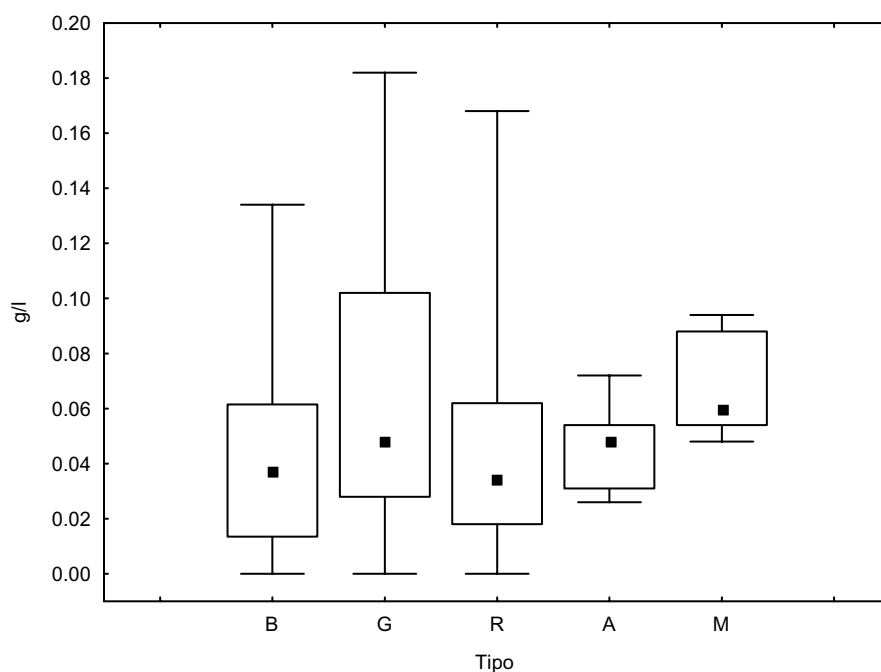


Figura 132. Contenido de ceniza en bebidas de tequila y mezcal. B, blanco; G, oro; R, reposado; A, añejo; M, mezcal.

En la siguiente tabla 29 se presentan el promedio de extracto seco y ceniza obtenido de las muestra de tequila y mezcal.

Tabla 29. Rangos de concentración (g/l) de extracto seco y ceniza

Tipo	Extracto seco	Ceniza
Blanco	0,191 – n.d.	0,11 – n.d.
Oro	0,747 – 0,082	0,182 – n.d.
Reposado	1,757 – 0,138	0,168 – 0,002
Añejo	0,504 – 0,149	0,072 – 0,026
Mezcal	0,209 – 0,126	0,094 – 0,052

n.d. no detectado.

El contenido de extracto seco de las muestras de tequila no supera los 1,8 g/l. Una muestra de tequila reposado (José Cuervo Reposado) dio un resultado muy elevado. Las medianas obtenidas fueron de alrededor de 0,3 g/l para tequila oro, reposado y añejo. En el caso del mezcal es de 0,159 g/l y para el tequila blanco es de 0,053 g/l. El contenido en ceniza es menor, no se alcanzan los 0,2 g/l en ninguna muestra. Las medianas de concentración obtenidas fueron 0,036, 0,046, 0,027, 0,046 y 0,062 g/l para tequila blanco, oro, reposado, añejo y mezcal, respectivamente.

IV.5 Determinación de azúcares reductores directos y totales

Uno de los factores más importantes para la elaboración de las bebidas alcohólicas, es el contenido de azúcares reductores directos y totales, siendo su cuantificación necesaria para controlar la producción y la calidad de dichos productos [23].

IV.5.1 Contenido de azúcares reductores en muestras de tequila y mezcal

Se llevó a cabo la determinación de azúcares reductores directos (ARD) y azúcares reductores totales (ART) en muestras de tequila blanco, oro, reposado y añejo y muestras de mezcal. De las muestras analizadas, sólo tres tequilas dieron valores medibles de ARD y ART. Las concentraciones de ARD encontradas fueron 0,144 mg/ml, 0,140 mg/ml y 0,036 mg/ml para las muestras José Cuervo reposado, Herencia de Plata reposado y Real Hacienda reposado respectivamente. En el caso del contenido en ART, las concentraciones encontradas fueron 0,270 mg/ml, 0,131 mg/ml y 0,032 mg/ml respectivamente en estas mismas muestras.

IV.6 Diferenciación de tequila y mezcal según su perfil orgánico

Una vez determinados los contenidos de furfural y 5-hidroximetilfurfural en las muestras, estos parámetros se utilizaron como descriptores químicos junto con los compuestos volátiles para diferenciar distintos tipos de tequila. Se construyó una matriz de datos con 7 columnas (compuestos volátiles, F y HMF) y 78 filas (muestras de tequila y mezcal). Sobre esta matriz de datos se aplicaron PRM para el análisis de datos. Así, se pretende comprobar si la inclusión de éstos dos nuevos descriptores mejora la diferenciación de bebidas obtenidas en el apartado IV.2.7.

IV.6.1 Análisis en componentes principales

Se siguió el mismo procedimiento que en los tratamientos anteriores, así que en primer lugar se aplicó PCA como método de visualización de posibles tendencias de los datos. Se calcularon dos componentes principales, que explicaban el 62% del total de la varianza de los datos: PC1 explica el 44% y PC2 el 18% de la varianza [113]. En el caso de PC1, las variables con mayor peso son 2-metil-propanol, 3-metil-butanol y 2-metil-butanol y para PC2 el hidroximetilfurfural. Representando las muestras en el espacio bidimensional de los PCs calculados (figura 133) no se observan tendencias claras que permitan establecer alguna separación.

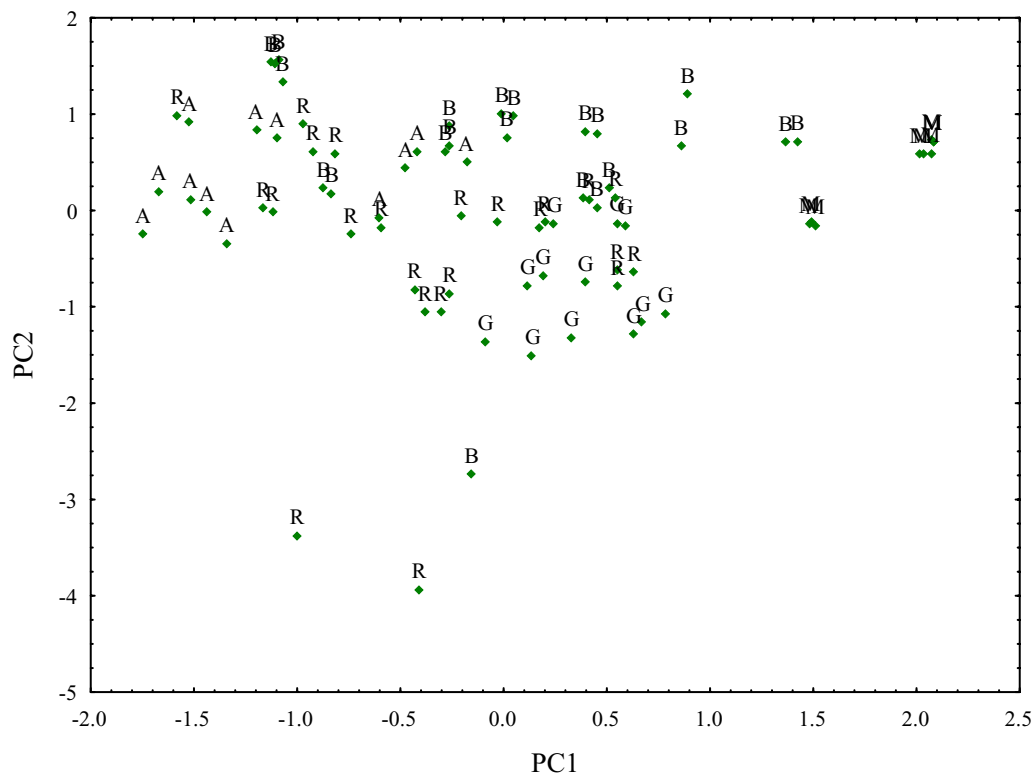


Figura 133. Muestras en el espacio de los dos primeros PCs. B, blanco; G, oro; R, reposado; A, añejo; M, mezcal.

IV.6.2 Análisis discriminante lineal

Posteriormente se aplicó un LDA, que es una técnica de reconocimiento de patrones supervisado con la que se obtienen reglas de clasificación adecuadas que permiten diferenciar las muestras. Se utilizaron 78 muestras pertenecientes a 5 clases: 22 a tequila blanco, 23 tequila reposado, 12 tequila añejo, 12 tequila oro y 9 mezcal. Cada una de estas clases se dividió aleatoriamente en dos grupos de entrenamiento y verificación. El porcentaje de muestras presentes en cada uno de estos grupos con respecto al total fue del 50%. Para seleccionar las variables incluidas en el análisis, se utilizó el análisis discriminante “stepwise forward” [138, 177]. En nuestro caso, los

descriptores seleccionados fueron: n-propanol, 2-metil-propanol, 3-metil-butanol, 2-metil-butanol y 5-hidroximetilfurfural obteniendo cuatro funciones discriminantes (DF):

$$DF1 = -0,45 \text{ 2-metil-butanol} -0,31 \text{ HMF} -0,42 \text{ n-propanol} -0,20 \text{ 2-metil-propanol} -0,36 \text{ 3-metil-butanol}$$
$$DF2 = -0,48 \text{ 2-metil-butanol} +0,76 \text{ HMF} +0,56 \text{ n-propanol} -0,06 \text{ 2-metil-propanol} +0,03 \text{ 3-metil-butanol}$$
$$DF3 = 0,98 \text{ 2-metil-butanol} -0,05 \text{ HMF} +0,30 \text{ n-propanol} -1,16 \text{ 2-metil-propanol} -0,26 \text{ 3-metil-butanol}$$
$$DF4 = -0,57 \text{ 2-metil-butanol} -0,49 \text{ HMF} +0,64 \text{ n-propanol} -0,16 \text{ 2-metil-propanol} +0,55 \text{ 3-metil-butanol}$$

La figura 134 representa las muestras en el espacio definido por DF1 y DF2. Al ver el gráfico se observa que los grupos formados por los diferentes tipos de tequila y mezcal están mezclados y no se observa separación entre tipos de bebidas.

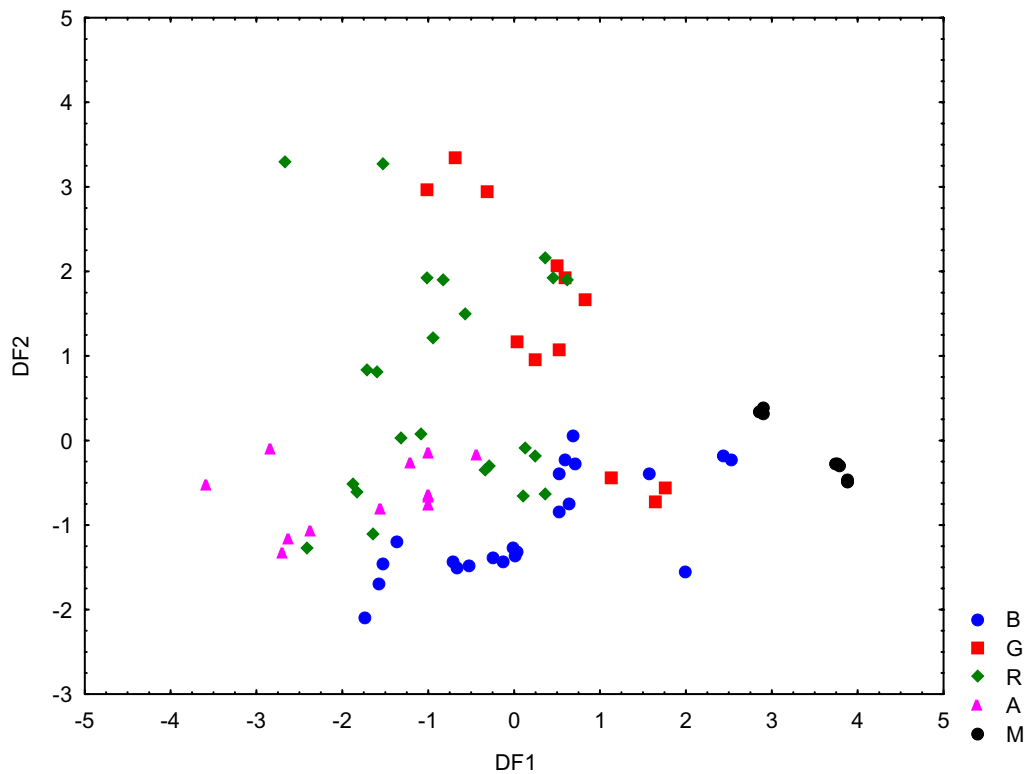


Figura 134. Distribución de las muestras en el plano definido por DF1 y DF2. B, blanco; G, oro; R, reposado; A, añejo; M, mezcal.

Posteriormente, considerando las reglas de clasificación obtenidas, se calcularon los falsos positivos y negativos, y a partir de estos valores se calculó la especificidad y sensibilidad del método de clasificación para cada tipo de bebida. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 30.

Tabla 30. Especificidad y sensibilidad obtenidos con LDA.

	Blanco	Oro	Reposado	Añejo	Mezcal
Falsos Positivos	11	3	2	5	2
Especificidad (%)	80	91	96	92	97
Falsos Negativos	2	4	12	3	0
Sensibilidad (%)	82	67	48	75	100

En el caso de la especificidad del método, se observa que todos los valores son mayores o iguales al 80%, sin embargo la sensibilidad del método ofrece valores muy bajos, excluyendo al mezcal, para el que se obtienen valores del 100%.

IV.6.3 Modelado suave de análisis independiente por analogía de clases

Se calcularon los componentes principales para cada clase: tequila blanco, oro, reposado y añejo y también para el mezcal. Al realizar el “T predictor” [109, 132] para cada clase no se observó una separación clara. También se obtuvieron gráficos de Coomans ver si se observaban separaciones entre clases. Se asignaron las clases como sigue tequila blanco: 1, oro: 2, reposado: 3, añejo: 4 y el 5 para el mezcal. Las clases para las que se obtuvo separación completa fueron: oro y añejo. En la figura 135 se presenta el gráfico de Coomans para dichas clases.

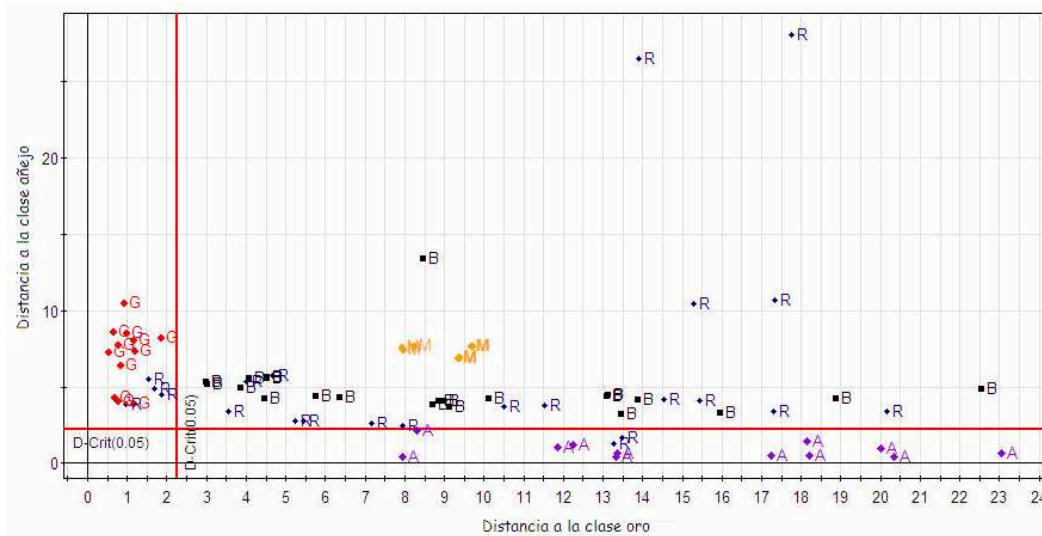


Figura 135. Gráfico de Coomans. Distancia a las clases oro y añejo. B, blanco; G, oro; R, reposado; A, añejo; M, mezcal.

Como puede verse todas las muestras de tequila oro y las de añejo aparecen bien clasificadas, dentro de su zona respectiva. El resto de muestras de tequila, blanco y reposado y mezcal se clasifican bien, apareciendo fuera de la distancia crítica. Solo algunas muestras de tequila reposado aparecen como falsos positivos de oro y añejo.

IV.6.4 Algoritmos neuronales artificiales

Los algoritmos neuronales artificiales son técnicas potentes de clasificación. Al no tener una eficiencia clasificatoria de 100% al aplicar LDA, SIMCA y CA se consideró como opción el uso de ANN. Se realizó un entrenamiento donde se tomaron aleatoriamente el 50% del total de las muestras. El otro 50% se dividió en dos grupos: el 25% para verificación y el otro 25% restante para realizar el test. Al realizar el

entrenamiento la red con la que se obtuvieron los mejores resultados fue una MLP. En la figura 136 se presenta la arquitectura de dicha red. Se divide en una capa de entrada, otra oculta y una de salida. La capa de entrada contiene 7 neuronas que corresponden al contenido de las variables n-propanol, acetato de etilo, 2-metil-propanol, 3-metil-butanol, 2-metil-butanol, 5-hidroximetilfurfural y furfural. Una capa oculta que contiene 27 neuronas. Y finalmente una capa de salida que esta compuesto por 5 neuronas que corresponden a los cinco tipos de bebidas.

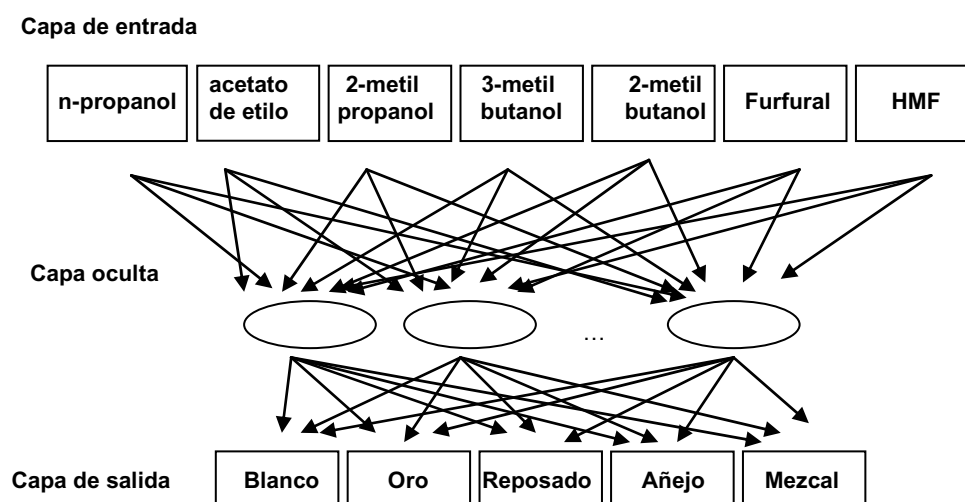


Figura 136. Arquitectura de la red perceptrón multicapa.

Se calcularon los valores de falsos positivos y negativos para cada tipo de bebida y con ellos se calculó la especificidad y sensibilidad de la red. Los valores obtenidos se presentan en la tabla 31.

Tabla 31. Especificidad y sensibilidad obtenidos con MLP.

	Blanco	Oro	Reposado	Añejo	Mezcal
Falsos Positivos	0	0	0	4	0
Especificidad (%)	100	100	100	78	100
Falsos Negativos	0	0	4	0	0
Sensibilidad (%)	100	100	33	100	100

Como se observa en la tabla el método de clasificación tiene 100% de sensibilidad para el mezcal y todos los tipos de tequila excepto el tequila reposado (33%). Esto hace que el porcentaje de sensibilidad sea muy bajo para dicho tipo. En el caso de la especificidad del método se observa 100% para los tequilas blanco, reposado y oro y también para mezcal. Sin embargo para el tequila añejo se obtuvo 78% debido a los cuatro falsos positivos de las muestras del tequila reposado. La sensibilidad para la clase reposado es baja.

Puede decirse que las redes perceptrón multicapa permiten una excelente clasificación y diferenciación de tipos de tequila y mezcal, excepto para el caso de tequilas reposados. Una posible explicación a este hecho es el bajo número de muestras que se tienen en este grupo.

Por otra parte, la inclusión de furfural y 5-hidroximetilfurfural como descriptores químicos para el tratamiento quimiométrico mejora apreciablemente los resultados obtenidos. Los parámetros extracto seco y ceniza no han sido incluidos como descriptores químicos para el

tratamiento quimiométrico debido a que son parámetros de carácter general. En cuanto a los azúcares reductores directos y totales, tampoco se han considerado ya que solo se encontraron valores para 3 de las muestras analizadas.

V. RESUMEN Y CONCLUSIONES

1. Se ha estudiado el perfil metálico en destilados de denominación de origen mexicano como son el tequila y mezcal. Se determinaron los contenidos de sodio, potasio, calcio, azufre, magnesio, manganeso, cobre, bario, hierro, zinc, aluminio y estroncio en dichas bebidas.
2. Se ha realizado un estudio comparativo sobre distintos procedimientos de mineralización de muestra por vía húmeda utilizando métodos de digestión en vaso abierto y microondas. De acuerdo con los resultados obtenidos en dicho estudio y atendiendo a criterios de adecuación práctica, se ha concluido que el método de mineralización más adecuado es el llevado a cabo mediante microondas utilizando la mezcla ácida $\text{HNO}_3/\text{V}_2\text{O}_5$.
3. Se ha puesto a punto un método para la determinación de sodio, potasio, calcio, azufre, magnesio, manganeso, cobre, bario, hierro, zinc, aluminio y estroncio en muestras de destilados de origen mexicano mediante ICP-OES. El método de análisis se validó, estableciendo los siguientes parámetros: exactitud, precisión, linealidad y sensibilidad.
4. De todos los elementos analizados en las muestras de tequila y mezcal, el sodio fue el elemento mayoritario en todas las muestras. También se encontraron concentraciones por encima de 1 mg/l para potasio en todas las muestras analizadas excepto las de tequila blanco. Calcio y azufre presentaron concentraciones superiores a 1 mg/l en todas las muestras analizadas. En el caso del magnesio se encontraron concentraciones de este orden de magnitud en tequila blanco y reposado. El resto de los elementos analizados presentaron concentraciones por debajo de 1 mg/l.

5. Los datos de concentración obtenidos para cada muestra de tequila blanco, oro, reposado y añejo así como de mezcal se utilizaron como descriptores químicos para clasificar los distintos tipos de tequila y mezcal. El análisis en componentes principales se utilizó como técnica de visualización de las tendencias de los datos y para encontrar las variables con mayor poder discriminante. Posteriormente se aplicaron métodos de reconocimiento de patrones como análisis discriminante lineal y redes neuronales artificiales.

6. Utilizando una red neuronal probabilística se consiguió clasificar correctamente las muestras de distintos tequilas y mezcal. La sensibilidad y especificidad obtenida en la mayoría de los casos fue del 100%. Las variables de mayor poder discriminante son: sodio, potasio, calcio, azufre, magnesio, hierro, estroncio, cobre y zinc.

7. Se ha estudiado el perfil volátil de muestras de tequila blanco, oro, reposado y añejo así como de muestras de mezcal. Se determinaron los siguientes compuestos: n-propanol, acetato de etilo, 2-metil-propanol, 3-metil-butanol y 2-metil-butanol.

8. Se ha puesto a punto un método de análisis de estos compuestos mediante HS-SPME-GC-MS. Se ha validado el método de análisis determinando: exactitud, linealidad, sensibilidad y la precisión para cada uno de los compuestos volátiles determinados.

9. Utilizando el método propuesto se analizaron n-propanol, acetato de etilo, 2-metil-propanol, 3-metil-butanol y 2-metil-butanol en muestras de tequila y mezcal. Encontrándose rangos de concentración mayores en tequila que en mezcal, siendo el 3-metil-butanol el compuesto de mayor concentración en todos los casos.

10. Asimismo, se ha llevado a cabo la identificación de otros compuestos volátiles y semivolátiles presentes en las muestras mediante HS-SPME-GC-MS. Se identificaron los siguientes compuestos: 1,1-dietoxietano, butirato de etilo, isovalerato de etilo, acetato de 3-metil-butilo, hexanoato de etilo, limoneno, octanoato de etilo, vitispirano y decanoato de etilo.
11. Los datos de concentración de los compuestos volátiles fueron utilizados como parámetros químicos en el tratamiento quimiométrico. Se aplicó un análisis en componentes principales como técnica de visualización. Posteriormente se aplicaron técnicas de clasificación, como análisis discriminante lineal, modelado suave de análisis independiente por analogía de clases y análisis cluster, pero tampoco se observó una clasificación de las muestras. Finalmente se aplicaron redes neuronales artificiales, obteniendo los mejores resultados con una red neuronal probabilística.
12. Se ha puesto a punto un método para el análisis de furfural y 5-hidroximetilfurfural en muestras de tequila y mezcal mediante HPLC en fase reversa.
13. Se ha analizado el contenido de furfural y 5-hidroximetilfurfural en muestras de tequila y mezcal, encontrándose concentraciones entre 0,3 y 11,8 mg/l de furfural, y las concentraciones de 5-hidroximetilfurfural variaron desde no detectado a 7,12 mg/l.
14. Se ha determinado extracto seco y ceniza en muestras de tequila y mezcal siguiendo el método propuesto por la norma oficial mexicana.

15. Asimismo, se ha aplicado el método propuesto por la norma oficial mexicana para la determinación de azúcares reductores directos y totales.

16. Las concentraciones obtenidas de los compuestos orgánicos analizados, n-propanol, acetato de etilo, 2-metil-propanol, 3-metil-butanol, 2-metil-butanol, furfural y 5-hidroximetilfurfural fueron utilizados como descriptores químicos para llevar a cabo una clasificación de muestras de tequila y mezcal. Se aplicó análisis en componentes principales como técnica de visualización de datos. Posteriormente se aplicaron métodos de reconocimiento de patrones como modelado suave de análisis independiente por analogía de clases, análisis cluster y redes neuronales artificiales.

17. Los mejores resultados se obtuvieron con una red perceptrón multicapa que ofrece valores de especificidad y sensibilidad del 100% en casi todos los casos.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- 1 Illsley G Catarina. Biodiversidad, campesinos y la tradición mezcalera mexicana. Conabio, Rainforest Alliance, Sanzekan tinemi, GEA, AC, **2006**. En prensa.
- 2 Consejo Regulador del Tequila A. C. www.crt.org.mx
- 3 Norma Oficial Mexicana. Secretaría de comercio y fomento industrial. Norma oficial mexicana NOM-006-SCFI-2005, Bebidas alcohólicas-Tequila-Especificaciones. *Diario Oficial de la Federación*, **2006**.
- 4 Acuerdo entre la Comunidad Europea y los Estados Unidos Mexicanos sobre el reconocimiento mutuo y la protección de las denominaciones del sector de las bebidas espirituosas. Official Journal of the European Communities, **1997**, L152, 16-26.
- 5 A. Peña, L. Díaz, A. Medina, C. Labastida, S. Capella, L. E. Vera. Characterization of Agave species by gas chromatography and solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of chromatography A*, **2004**, 1027, 131-136.
- 6 K. Gil, C. Díaz, A. Nava, J. Simpson. AFLP analysis of Agave tequilana varieties. *Plant Science*, **2006**, 170, 904-909.
- 7 J. R. Parsons, M. H. Parsons. Maguey Utilization in Highland Central Mexico. **1990**. University of Michigan Museum of Anthropology, Ann Arbor, pp 388.
- 8 Wikipedia www.wikipedia.org
- 9 El portal de México www.elportaldemexico.com
- 10 A. Gobeille, J. Yavitt, P. Stalcup, A. Valenzuela. Effects of soil management practices on soil fertility measurements on *Agave tequilana* plantations in Western Central Mexico. *Soil & Tillage Research*, **2006**, 87, 80-88.
- 11 P. S. Nobel, E. Pimienta. Monthly stem elongation for *Stenocereus Queretaroensis*: relationships to environmental conditions, net CO₂ uptake

and seasonal variations in sugar content. *Environmental and Experimental Botany*, **1995**, 35, 17-24.

12 P. S. Nobel, M. Castañeda, G. North, E. Pimienta, A. Ruiz. Temperature influences on leaf CO₂ exchange, cell viability and cultivation range for *Agave tequilana*. *Journal of Arid Environments*, **1998**, 39, 1-9.

13 J. M. Santamaría, J. L. Herrera, M. L. Robert. Stomatal physiology of a micropropagated CAM plant; *Agave tequilana* (Weber). *Plant Growth Regulation*, **1995**, 16, 211-214.

14 M. G. López, N. A. Mancilla, G. Mendoza. Molecular Structures of Fructans from *Agave tequilana* Weber var. azul. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2003**, 57, 7835-7840.

15 N. A. Mancilla, M. G. López. Generation of Maillard Compounds from Inulin during the Thermal Processing of *Agave tequilana* Weber Var. azul. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2002**, 50, 806-812.

16 L. Pinal, M. Cedeño, H. Gutiérrez, J. Álvarez. Fermentation parameters influencing higher alcohol production in the tequila process. *Biotechnology Letters*, **1997**, 19, 45-47.

17 R. Prado, V. Gonzáles, C. Pelayo, N. Casillas, M. Estarrón, H. Gómez. The role of distillation on the quality of tequila. *International Journal of Food Science and Technology*, **2005**, 40, 701-708.

18 J. Arrizon, C. Fiore, G. Acosta, P. Romano, A. Gschaedler. Fermentation behavior and volatile compound production by agave and grape must yeasts in high sugar *Agave tequilana* and grape must fermentations. *Antonie van Leeuwenhoek*, **2006**, 89, 181-189.

19 C. Fiore, J. Arrizon, A. Gschaedler, J. Flores, P. Romano. Comparison between yeasts from grape and agave musts for traits of technological interest. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, **2005**, 21, 1141-1147.

20 Norma Oficial Mexicana. Secretaría de comercio y fomento industrial. Norma oficial mexicana NOM-070-SCFI-1994, Bebidas

alcohólicas-Mezcal-Especificaciones. Diario Oficial de la Federación, **1994**.

21 A. León, L. González, A. P. Barba, P. Escalante, M. G. López. Characterization of Volatile Compounds of Mezcal, an Ethnic Alcoholic Beverage Obtained from *Agave salmiana*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2006**, 54, 1337-1341.

22 Norma Oficial Mexicana. Secretaría de comercio y fomento industrial. Norma Oficial Mexicana NOM- -SCFI-1994, Bebidas alcohólicas-Tequila-Especificaciones. Diario Oficial de la Federación, **1994**.

23 Norma mexicana NMX-V-006-NORMEX-2005, Secretaría de Economía. Bebidas Alcohólicas-Determinación de azúcares reductores directos y totales-Métodos de Ensayo.

24 Norma mexicana NMX-V-017-NORMEX-2005, Secretaría de Economía. Bebidas Alcohólicas-Determinación de extracto seco y cenizas-Métodos de Ensayo.

25 Norma mexicana NMX-V-004-NORMEX-2005, Secretaría de Economía. Bebidas Alcohólicas-Determinación de Furfural-Métodos de Ensayo.

26 Norma mexicana NMX-V-013-NORMEX-2005, Secretaría de Economía. Bebidas Alcohólicas-Detrminación de contenido alcohólico (por ciento de alcohol en volumen a 293 K) (20°C) (% Alc. Vol.)-Métodos de Ensayo.

27 Norma mexicana NMX-V-005-NORMEX-2005, Secretaría de Economía-Bebidas Alcohólicas-Determinación de aldehídos, ésteres, metanol y alcoholes superiores-Método de Ensayo.

28 Norma Oficial Mexicana NOM-142-SSA1-1995. Bienes y servicios. Bebidas alcohólicas. Especificaciones sanitarias. Etiquetado sanitario y comercial.

- 29 S. M. Benn, T. L. Peppard. Characterization of tequila flavor by instrumental and sensory analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1996**, 44, 557-566.
- 30 D. Muñoz, K. Wrobel, K. Wrobel. Determination of aldehydes in tequila by high-performance liquid chromatography with 2,4-dinitrophenylhydrazine derivatization. *European Food Research and Technology*, **2005**, 221, 798-802.
- 31 D. W. Lachenmeier, E. Richling, M. G. López, W. Frank, P. Schreier. Multivariate Analysis of FTIR and Ion Chromatographic Data for the Quality Control of Tequila. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2005**, 53, 2151-2157.
- 32 D. W. Lachenmeier, E. M. Sohnus, R. Attig, M. G. López. Quantification of Selected Volatile Constituents and Anions in Mexican Agave Spirits (Tequila, Mezcal, Sotol, Bacanora). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2006**, 54, 3911-3915.
- 33 C. Bauer, N. Christoph, B O. Aguilar, M. G. López, E. Richling, A. Rossmann, P. Schreier. Authentication of tequila by gas chromatography and stable isotope ratio analyses. *European Food Research and Technology*, **2003**, 217, 438-443.
- 34 A. Peña, S. Capella, R. Juárez, C. Labastida. Determination of terpenes in tequila by solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **2006**, 1134, 291-297.
- 35 B. Vallejo, A. F. Gonzalez, M. C. Estrada. Tequila Volatile Characterization and Ethyl Ester Determination by Solid Phase Microextraction Gas Chromatography/Mass Spectrometry Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2004**, 52, 5567-5571.
- 36 J. Pino, M. P. Martí, M. Mestres, J. Perez, O. Busto, J. Guasch. Headspace solid-phase microextraction of higher fatty acid ethyl esters in white rum aroma. *Journal of Chromatography A*, **2002**, 954, 51-57.

- 37 G. Fitzgerald, K. J. James, K. MacNamara, M. A. Stack. Characterization of whiskeys using solid-phase microextraction with gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **2000**, 896, 351-359.
- 38 P. Sowinski, W. Waldemar, M. Partyka. Development and evaluation of headspace gas chromatography method for the analysis of carbonyl compounds in spirits and vodkas. *Analytica Chimica Acta*, **2005**, 539, 17-22.
- 39 E. A. Nonato, F. Carazza, F. C. Silva, C. R. Carvalho, Z. L. Cardeal. A Headspace Solid-Phase Microextraction Method for the Determination of Some Secondary Compounds of Brazilian Sugar Cane Spirits by Gas Chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2001**, 49, 3533-3539.
- 40 V. A. Watts, C. E. Butzke. Analysis of microvolatiles in brandy: relationship between methylketone concentration and Cognac age. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **2003**, 83, 1143-1149.
- 41 D. A. Guillen, M. Palma, R. Natera, R. Romero, C. G. Barroso. Determination of the Age of Sherry Wines by Regression Techniques Using Routine Parameters and Phenolic and Volatile Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2005**, 53, 2412-2417.
- 42 R. Rodríguez, D. Blanco, J. J. Mangas. Influence of Distillation System, Oak Wood Type, and Aging Time on Composition of Cider Brandy in Phenolic and Furanic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2003**, 51, 7969-7973.
- 43 F. W. Batista, S. Rodrigues, R. Ferreira, A. R. Soares. Simultaneous determination of aging markers in sugar cane spirits. *Food Chemistry*, **2006**, 98, 569-574.
- 44 D. Blanco, D. Muro, J. Mangas. Determination of monosaccharides in cider by reversed-phase liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, **2001**, 436, 173-180.

- 45 D. Blanco, D. Muro, M. D. Gutiérrez. A comparison of pulsed amperometric detection and spectrophotometric detection of carbohydrates in cider brandy by liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, **2004**, 517, 65-70.
- 46 R. Nascimento, J. Marques, B. Lima, D. Keukeleire, D. Franco. Qualitative and quantitative high-performance liquid chromatographic analysis of aldehydes in Brazilian sugar cane spirits and other distilled alcoholic beverages. *Journal of Chromatography A*, **1997**, 782, 13-23.
- 47 D. Lachenmeier, U. Nerlich, T. Kuballa. Automated determination of ethyl carbamate in stone-fruit spirits using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **2006**, 1108, 116-120.
- 48 S. A. V. Tfouni, R. M. D. Machado, M. C. R. Camargo, S. H. P. Victorino, E. Vicente, M. C. F. Toledo. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in cachaça by HPLC with fluorescent detection. *Food Chemistry*, **2007**, 101, 334-338.
- 49 M. T. Vidal, M. C. Pascual, A. Salvador, C. Llabata. Determination of essential metals in complete diet feed by flow injection and flame atomic absorption spectrometry. *Microchemical Journal*, **2002**, 72, 221-228.
- 50 R. Sharma, L. Chandreshwor, A. Lawrence, A. Taneja, A. Kumar. Evaluation of Trace Metal Contents in Food Products Within the Network of Shops and Local Markets of Agra, India. *Environmental Contamination and Toxicology*, **2005**, 74, 195-200.
- 51 J. M. Jurado, A. Alcázar, F. Pablos, M. J. Martín, A. G. González. Determination of Zn, B, Fe, Mg, Ca, Na and Si in anisette simples by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *Talanta*, **2004**, 63, 297-302.
- 52 T. Capote, L. M. Marcó, J. Alvarado, E. D. Greaves. Determination of copper, iron and zinc in spirituous beverages by total reflection X-ray

fluorescente spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B*, **1999**, 54, 1463-1468.

53 R. M. Cunha e Silva, E. Almeida, E. P. E. Valencia, V. F. Nascimento Filho. Determination of Fe, Cu and Zn in sugar-cane spirits commercialized in Southeastern Brazil by TXRF. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, **2004**, 260, 3-7.

54 C. M. Mena, C. Cabrera, M. L. Lorenzo, M. C. López. Determination of Lead Contamination in Spanish Wines and Other Alcoholic Beverages by Flow Injection Atomic Absorption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1997**, 45, 1812-1815.

55 C. M. Mena, C. Cabrera, M. L. Lorenzo, M. C. Lopez. Cadmium levels in wine, beer and other alcoholic beverages: possible sources of contamination. *The Science of the Total Environment*, **1996**, 181, 201-208.

56 F. F. López, M. L. Lorenzo, M. C. López. Aluminium Content in Foods and Beverages Consumed in the Spanish Diet. *Food Chemistry and Toxicology*, **2000**, 65, 206-210.

57 I. Karadjova, S. Arpadjan, J. Cvetković, T. Stafilov. Sensitive Method for Trace Determination of Mercury in lines Using Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry. *Microchimica Acta*, **2004**, 147, 39-43.

58 J. M. Jurado, M. J. Martin, F. Pablos, A. Moreda, P. Bermejo. Direct determination of copper, lead and cadmium in aniseed spirits by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Food Chemistry*, **2007**, 101, 1296-1304.

59 A. M. Cameán, I. Moreno, M. López, M. Repetto, A. G. González. Differentiation of Spanish brandies according to their metal content. *Talanta*, **2001**, 54, 53-59.

60 P. J. S. Barbeira, N. R. Stradiotto. Anodic stripping voltammetric determination of Zn, Pb and Cu traces in whisky samples. *Fresenius Journal Analytical Chemistry*, **1998**, 361, 507-509.

- 61 R. Kokkinofta, P. V. Petrakis, T. Mavromoustakos, C. R. Theocharis. Authenticity of the Traditional Cypriot Spirit "Zivania" on the Basis of Metal Content Using a Combination of Coupled Plasma Spectroscopy and Statistica Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2003**, 51, 6233-6239.
- 62 F. F. López, C. Cabrera, M. L. Lorenzo, M. C. López. Aluminium levels in wine, beer and other alcoholic beverages consumed in Spain. *The Science of the Total Environment*, **1998**, 220, 1-9.
- 63 R. F. Nascimento, C. W. B. Becerra, S. M. B. Furuya, M. S. Schultz, L. R. Polastro, B. S. Lima, D. W. Franco. Mineral Profile of Brazilian Cachaças and Other Internacional Spirits. *Journal of Food Composition and Analysis*, **1999**, 12, 17-25.
- 64 A. M. Jodral, M. Navarro, H. López, M. C. López. Magnesium and calcium contents in foods from SE Spain: influencing factors and estimation of daily dietary intakes. *The Science of the Total environment*, **2003**, 312, 47-58.
- 65 I. Rodushkin, F. Ödman, P. K. Apelblad. Multielement Determination and Lead Isotope Ration Measurement in Alcoholic Beverages by High-Resolution Inductively Coupled Pasma Mass Spectrometry. *Journal of Food Composition and Analysis*, **1999**, 12, 243-257.
- 66 M. Olalla, M. C. González, C. Cabrera, M. C. López. Optimized Determination of Iron in Grape Juice, Wines, and Other Alcoholic Beverages by Atomic Absorption Spectrometry. *Residues and trace elements*, **2000**, 83, 189-195.
- 67 H. Kataoka, H. L. Lord, J. Pawliszyn. Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *Journal of Chromatography A*, **2000**, 880, 35-62.
- 68 W. Wardencki, P. Sowinski, J. Curylo. Evaluation of headspace solid-phase microextraction for the analysis of volatile carbonyl

compounds in spirits and alcoholic beverages. *Journal of Chromatography A*, **2003**, 984, 89-96.

69 V. N. Arbuzov, S. A. Savchuk. Identification of Vodkas by Ion Chromatography and Gas Chromatography. *Journal of Analytical Chemistry*, **2002**, 57, 428-433.

70 D. Gonzalez, V. Gonzalez, F. Pablos, A. Gonzalez. Authentication and differentiation of irish whiskeys by higher-alcohol content analysis. *Analytical Chimica Acta*, **1999**, 381, 257-264.

71 J. C. R. Demyttenaere, J. I. Sanchez, R. Verhé, P. Sandra, N. Kimpe. Analysis of volatiles of malt whisky by solid-phase microextraction and stir bar soptive extraction. *Journal of Chromatography A*, **2003**, 985, 221-232.

72 J. Ledauphin, B. Basset, S. Cohen, T. Payot, D. Barillier. Identification of trace volatile compounds in freshly distilled Calvados and Cognac: Carbonyl and sulphur compounds. *Journal of Food Composition and Analysis*, **2006**, 19, 28-40.

73 I. Caldeira, R. Pereira, M. C. Clímaco, A. P. Belchior, R. B. Sousa. Improved method for extraction of aroma compounds in aged brandies and aqueous alcoholic wood in aged brandies and aqueous alcoholic wood extracts using ultrasound. *Analytica Chimica Acta*, **2004**, 513, 125-134.

74 A. G. Panosyan, G. V. Mamikonyan, M. Torosyan, E. S. Gabrielyan, S. A. Mkhitarian, M. R. Tirakyan, A. Ovanesyan. Determination of the Composition of Volatiles in Cognac (Brandy) by Headspace Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Journal of Analytical Chemistry*, **2001**, 56, 945-952.

75 S. Vichi, M. Riu, M. Mora, S. Buxaderas, E López. Characterization of Volatiles in Different Dry Gins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2005**, 53, 10154-10160.

- 76 A. Oliveira, N. Pereira, A. Marsaioli, F. Augusto. Studies of the aroma of cupuassu liquor by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, **2004**, 1025, 115-124.
- 77 E. H. Soufleros, A. S. Mygdalia, P. Natskoulis. Characterization and safety evaluation of the tradicional Greek fruit distillate "Mouro" by flavor compounds and mineral analysis. *Food Chemistry*, **2004**, 86, 625-636.
- 78 A. Apostolopoulou, A. Flouros, P. Demertzis, K. Akrida. Differences in concentration of principal volatile constituents in tradicional Greek distillates. *Food Control*, **2005**, 16, 157-164.
- 79 A. Versari, N. Natali, M. T. Russo, A. Antonelli. Analysis of Some Italian Lemon Liqueurs (Limoncello). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2003**, 51, 4978-4983.
- 80 A. León, L. González, A. P. Barba, P. Escalante, M. G. López. Characterization of Volatile Compounds of Mezcal, an Ethnic Alcoholic Beverage Obtained from *Agave salmiana*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2006**, 54, 1337-1341.
- 81 B. O. Aguilar, M. G. López, E. Richling, F. Heckel, P. Schreier. Tequila Authenticity Assessment by Headspace SPME-HRGC-IRMS Analysis of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ and $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Ratios of Ethanol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2002**, 50, 7520-7523.
- 82 D. M. Goldberg, B. Hoffman, J. Yang, G. J. Soleas. Phenolic Constituents, Furans, and Total Antioxidant Status of Distilled Spirits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1999**, 47, 3978-3985.
- 83 J. M. Jurado, A. Alcazar, F. Pablos, M. J. Martín. LC Determination of Anethole in Aniseed Drinks. *Chromatographia*, **2006**, 64, 223-225.
- 84 D. R. Cardoso, S. M. Betti, R. V. Reche, B. S. Lima, D. W. Franco. HPLC-DAD analysis of ketones as their 2,4-dinitrophenylhydrazones in Brazilian sugar-cane spirits and rum. *Journal of Food Composition and Analysis*, **2003**, 16, 563-573.

- 85 R. Ferreira, D. Rodrigues, D. Keukeleire, B. Santos, D. Wagner. Quantitative HPLC Analysis of Acids in Brazilian Cachaças and Various Spirits Using Fluorescent Detection of Their 9-Anthrylmethyl Esters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2000**, 48, 6070-6073.
- 86 J. Quesada, M. Villalón, H. López, M. C. Lopez. Comparison of spectrophotometric and chromatographic methods of determination of furanic aldehydes in wine distillates. *Food Chemistry*, **1995**, 52, 203-208.
- 87 C. Martínez, M. C. Rodríguez, D. A. Guillen, C. García. Sugar contents of Brandy de Jerez during its Aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2005**, 53, 1058-1064.
- 88 J. K. S. Moller, R. R. Catharino, M. Eberlin. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of whisky: immediate Prof. Of origin and authenticity. *Analyst*, **2005**, 130, 890-897.
- 89 M. J. C. Pontes, S. R. B. Santos, M. C. U. Araujo, L. F. Almeida, R. A. C. Lima, E. N. Gaiao, U. T. C. P. Souto. Classification of distilled alcoholic beverages and verification of adulteration by near infrared spectrometry. *Food Reserach Internacional*, **2006**, 39, 182-189.
- 90 M. Palma, C. G. Barroso, Application of FT-IR spectroscopy to the characterisation and classification of wines, brandies and other distilled drinks. *Talanta*, **2002**, 58, 265-271.
- 91 O. Barbosa, G. Ramos, J. L. Maldonado, J. L. Pichardo, M. A. Meneses, J. E. A. Landgrave, J. Cervantes. UV-vis absorption spectroscopy and multivariate análisis as a method to discriminate tequila. *Spectrochimica Acta Part A*, **2007**, 66, 129-134.
- 92 C. Frausto, C. Medina, R. Sato, L. R. Sahún. Qualitative study of ethanol content in tequilas by Raman spectroscopy and principal component analysis. *Spectrochimica Acta Part A*, **2005**, 61, 2657-2662.
- 93 W. Kwan, B. R. Kowalski, R. K. Skogerboe. Pattern Recognition Analysis of Elemental Data. Wines of *Vitis vinifera* cv. Pinot Noir from

France and the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1979**, 27, 1321-1326.

94 B. E. H. Saxberg, D. L. Duewer, J. L. Broker. Pattern Recognition and Blind Assay Techniques applied to Forensic Separation of Whiskies. *Analytica Chimica Acta*, **1978**, 103, 201-212.

95 A. P. Fernández, M. C. Santos, S. G. Lemos, M. C. Ferreira, A. R. A. Nogueira, J. A. Lóbrega. Pattern recognition applied to mineral characterization of Brazilian coffes and sugar-cane spitirs. *Spectrochimica Acta Part B*, **2005**, 60, 717-724.

96 E. A. Hernández, R. M. Ávila, T. Capote, F. Rivas, A. G. Pérez. Classification of Venezuelan spirituous beverages by means of discriminant analysis and artificial networks based on their Zn, Cu and Fe concentrations. *Talanta*, **2003**, 60, 1259-1267.

97 J. M. Jurado, A. Alcazar, F. Pablos, M. J. Martin, A. G. Gonzalez. Classification of anissed drinks by jeans of cluster, linear discriminant analysis and soft independent modelling of class analogy based on their Zn, B, Fe, Mg, Ca, Na and Si content. *Talanta*, **2005**, 66, 1350-1354.

98 D. R. Cardoso, L. G. Andrade, A. F. Leite, R. V. Reche, W. D. Isique, M. M. C. Fereira, B. S. Lima, D. W. Franco. Comparison between Cachaça and Rum Using Pattern Recognition Methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2004**, 52, 3429-3433.

99 D. González, G. López, V. González, A. G. González. Supervised Pattern Recognition Procedures for Discrimination of Whiskeys from Gas Chromatography/Mass Spectrometry Congener Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2006**, 54, 1982-1989.

100 D. Blanco, D. Muro, J. J. Mangas. Evolution of Sugars in Cider Brandy Aged in Oak Barrels: A Contribution to Its Characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2003**, 51, 923-926.

-
- 101 R. Rodríguez, J. J. Mangas. Typification of Cider Brandy on the Basis of Cider Used in Its Manufactured. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2005**, 53, 3071-3075.
- 102 Y. Joon, K. Rae, J. Han. Gas Chromatographic Organic Acid Profiling Analysis of Brandies and Whiskeys for Pattern Recognition Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1999**, 47, 2322-2326.
- 103 B. R. Kowalski, C. F. Bender. Powerful approach to interpreting chemical data. *Journal of the American Chemical Society*, **1972**, 94, 5632-5639.
- 104 S. W. Page. Pattern Recognition Methods for the Determination of Food Composition. *Food Technology*, **1986**, 38, 104-109.
- 105 C. M. Cuadros. Métodos de Análisis Multivariante, Servicio de Publicaciones, Universidad de Barcelona, Barcelona, **1991**.
- 106 C. Albano, W. J. Dunn III, E. Edlund, E. Johanson, B. Norden, M. Sjöström, S. Wold. Four levels of pattern recognition. *Analytica Chimica Acta*, **1978**, 103, 429-443.
- 107 K. Varmuza. Pattern Recognition in Chemistry, Springer-Verlag, Heidelberg, **1980**.
- 108 M. Meloun, J. Militky, M. Forina. Chemometrics for analytical chemistry, Vol. I: PC-aided statistical data analysis, Ellis Horwood Limited, Chichester, **1992**.
- 109 R. A. Fisher. The use of multiple measurements in taxonomic problems. *Annual Eugenics*, **1936**, 7, 179-188.
- 110 D. Coomans, I. Broeckaert, M. Jonckheer, D. L. Massart, P. Blockx. The application of linear discriminate analysis in the diagnosis of thyroid diseases. *Analytica Chimica Acta*, **1978**, 103, 409-415.
- 111 S. Wilks. Multidimensional Scatter in Olkin (Ed.), Contributions to Probability and Statistics, Stanford Press, **1960**.

- 112 G. P. McCabe. Computations for variable selection in discriminant analysis. *Technometrics*, **1975**, 17, 103-109.
- 113 C. Chatfield, A. J. Collins. Introduction to Multivariate Analysis, Chapman and Hall, Londres, **1980**.
- 114 P. E. Thomas, Auf der Heyde. Analyzing chemical data in more than two dimensions: A tutorial on factor and cluster analysis. *Journal of Chemical Education*, **1990**, 67, 461-469.
- 115 H. F. Kaiser. The application of electronic computers in factor analysis, *Educational and Psychological Measurement*, **1960**, 20, 141-151.
- 116 J. R. Piggott (Ed.), Statistical Procedures in Food Research, Elsevier Applied Science, Londres, **1986**.
- 117 E. R. Malinowski. Determination of the number of factors and the experimental error in data matrix. *Analytical Chemistry*, **1977**, 49, 612-617.
- 118 E. R. Malinowski. Statistical F-test for factor analysis and target testing. *Journal of Chemometrics*, **1988**, 3, 49-60.
- 119 S. Wold. Cross-validatory estimation of the number of components in factor and principal components models. *Technometrics*, **1978**, 20, 397-404.
- 120 K. R. Gabriel. The biplot graphic display of matrices with application to principal component analysis. *Biometrika*, **1971**, 58, 453-467.
- 121 H. C. Romesburg. Cluster Analysis for Researchers, Lifetime Learning Publications, Belmont, California, **1984**.
- 122 D. L. Massart, L. Kaufmann. The interpretation of analytical chemical data by the use of Cluster Analysis, J. Wiley, Londres, **1983**.
- 123 K. Varmuza. Pattern recognition in analytical chemistry. *Analytica Chimica Acta*, **1980**, 122, 227-240.
- 124 M. Defernez, E. K. Kemsley. The use and misuse of chemometrics for treating classifications problems. *Trends in Analytical Chemistry*, **1997**, 16, 216-221.
- 125 L. Kryger. Interpretation of analytical chemical information by pattern recognition methods: a survey. *Talanta*, **1981**, 28, 871-887.

- 126 A. J. Stuper, P. C. Jurs. Structure-activity studies of barbiturates using pattern recognition techniques. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **1978**, 67, 745-751.
- 127 D. González-Arjona, G. López-Pérez, A. G. Gonzalez. Performing procrustes discriminant analysis with Holmes. *Talanta*, **1999**, 49, 189-197.
- 128 D. González-Arjona, G. López-Pérez, A. G. Gonzalez. Holmes, a program for performing Procrustes Transformations. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, **2001**, 57, 133-137.
- 129 Z. Yang, W. Lu, R. G. Harrison, T. Eftestol, P. A. Oteen. A probabilistic neural network as the predictive classifier of out-of-hospital defibrillation outcomes. *Resuscitation*, **2005**, 64, 31-36.
- 130 D. González-Arjona, A. G. Gonzalez. Adaptation of linear discriminant analysis to second level-pattern recognition classification. *Analytica Chimica Acta*, **1998**, 368, 89-95.
- 131 R. A. Fisher. The use of multiple measurements in taxonomic problems. *Annals of Eugenics*, **1936**, 7, 179-188.
- 132 S. Wold, M. Sjöström. SIMCA: A method for analyzing chemical data in terms of similarity and analogy. ACS symposium series. Data processing Congreso; B.R. Kowalski (Ed), Chapter 12, **1997**, 243-282.
- 133 M. P. Derde, D. L. Massart. Comparison of the performance of the class modelling techniques UNEQ, SIMCA and PRIMA. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, **1998**, 4, 65-93.
- 134 E. Fix, J. L. Hodges. Discriminatory Analysis: non parametric discrimination, consistency properties, Vol. 4, USAF School of Aviation Medicine, Randolph Field, Texas, **1951**.
- 135 L. F. Escudero. Reconocimiento de Patrones, Paraninfo S.A., Madrid, **1977**.
- 136 R. A. Fisher. The statistical utilization of multiple measurements. *Annals of Eugenics*, **1938**, 8, 376-378.

- 137 J. J. Powers, E. S. Keith. Stepwise discriminant analysis of gas chromatographic data as an aid in classifying the flavor quality of foods. *Journal of food Science*, **1968**, 33, 207-213.
- 138 D. Coomans, D. L. Massart, L. Kaufman. Optimization by statistical linear discriminant analysis in analytical chemistry. *Analytica Chimica Acta*, **1979**, 112, 97-122.
- 139 O. Strouf, S. Wold. Pattern-recognition search for the basic regularities in the stability of complex hydrides. Part 1. A simplified model. *Acta Chemica Scandinavica*, **1977**, A31, 391-410.
- 140 S. Wold, O. Strouf. Pattern recognition search for basic regularities in the stability of complex hydrides. Part 2. Unsubstituted complexes ABH₄. *Acta Chemica Scandinavica*, **1979**, A33, 463-467.
- 141 S. Wold, O. Strouf. Pattern recognition search for basic regularities in the stability of complex hydrides. Part 3. Monosubstituted complexes ABH₃D, *Acta Chemica Scandinavica*, **1979**, A33, 521-529.
- 142 S. Wold, M. Sjöström. SIMCA: A method for analyzing chemical data in terms of similarity and analogy, ACS Symposium Series. Data Processing Congress; B.R. Kowalsi (Ed.), Chapter 12. **1997**, 243-282.
- 143 D. L. Duewer, B. R. Kowalski, T. F. Schatzki. Source identification of oil spills by pattern recognition analysis of natural elemental composition. *Analytical Chemistry*, **1975**, 47, 1573-1583.
- 144 M. Sjöström, U. Edlund. Analysis of carbon-13 NMR data by means of pattern recognition methodology. *Journal of Magnetic Resonance*, **1977**, 25, 285-297.
- 145 S. Wold, K. Anderson. Major components influencing retention indices in gas chromatography. *Journal of Chromatography*, **1973**, 80, 43-59.
- 146 S. Wold, M. Sjöström. Linear Free Energy Relationships as Tools for Investigating Chemical Similarity-Theory and Practice, in Correlation

Analysis in Chemistry, N.B. Chapman y J. Shorter (Ed.), Plenum Press, Nueva York, **1978**.

147 X. Liu, .P. Van Espen, F. Adams, S.H. Yan, M. Vanbelle. Classification of chinese tea samples according to origin and quality by principal component techniques. *Analytica Chimica Acta*, **1987**, 200, 421-430.

148 E. Fix, J. Jodges. USAF School of Aviation Medicine Report n°4, Randolph Field, Texas, **1951**.

149 G. Ramis, M. C. García. Quimiometría, Ed, Síntesis, Madrid, **2001**.

150 R. D. Duda, P. E. Hart. Pattern Classification and Science Analysis, Wiley, Weinheim, **1973**.

151 C. M. Bishop. Neural Networks for Pattern Recognition, Oxford University Press, Oxford, **1995**.

152 J. Zupan, J. Gasteiger. Neural Networks for Chemists, Willey, Weinheim, **1993**.

153 T. Kohonen. Self-organized of topologically correct feature maps. *Biological Cybernetics*, **1982**, 43, 59-69.

154 D. Rumelhart, G. Hinton, R. Williams. Learning representation by backpropagating errors. *Nature*, **1986**, 323, 533-536.

155 P. Werbos. Beyond Regression: New tools for prediction and analysis in the behavioral sciences, Ph. Tesis, Harvard University, **1974**.

156 D. Parker. Learning logic, Invention Report, 581-664, File1, Office of Technology Licensing, Stanford University, **1982**.

157 J. Zupan, J. Gasteiger. Neural Networks: A New Method for solving Chemical Problems or just a Passing Phase?. *Analytica Chimica Acta*, **1991**, 248, 1-30.

158 D. Gonzalez-Arjona, G. López-Perez, A. G. Gonzalez. Non-linear QSRA modeling by using multilyer perceptrons feedforward neural networks trained by back-propagation. *Talanta*, **2002**, 56, 79-90.

- 159 L. Douala, D. Villemin, D. Cherquaoui. Exploring QSRA of Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors by Neural Networks: TIBO Derivatives. *International Journal Molecular Sciences*, **2004**, 5, 48-55.
- 160 D. F. Specht. Probabilistic Neural Networks. *Neural Networks*, **1990**, 3, 109-118.
- 161 R. L. Streit, T. E. Luginbuhl. Maximum likelihood training of probabilistic neural networks. *IEEE Trans Neural Networks*, **1994**, 5, 764-783.
- 162 E. Parzen. On estimation of a probability density function and mode. *Annals of Mathematical Statistics*, **1962**, 33, 1065-1076.
- 163 T. Cacoullos. Estimation of a multivariate density, *Annals of the Institute of Statistical Mathematics*, **1966**, 18, 179-189.
- 164 W. S. Sarle. Neural Networks and Statistical Models, Proceedings of the Nineteenth Annual SAS Users Group International Conference, Abril, **1994**.
- 165 M. K. Hammond, C. J. Rieder, S. L. Rose-Pehrsson, F. W. Williams. Training set optimization methods for a probabilistic neural network. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, **2004**, 71, 73-78.
- 166 Y. Chtioui, D. Bertrand, D. Barba. Reduction of the size of the learning data in a probabilistic neural network by hierarchical clustering. Application to the discrimination of seeds by artificial vision. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, **1996**, 35, 175-186.
- 167 R. Lara, S. Cerutti, J. A. Salonia, R. A. Olsina, L. D. Martinez. Trace element determination of Argentine wines using ETAAS and USN-ICP-OES. *Food and Chemical Toxicology*, **2005**, 43, 293-297.
- 168 G. P. G. Freschi, C. S. Dakuzaku, M. Morales, J. A. Lóbrega, J. A. Gomes. Simultaneous determination of cadmium and lead in wine by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica acta part B*, **2001**, 56, 1987-1993.

- 169 S. Galani, N. Kallithrakas, A. A. Katsanos. Trace element analysis of Cretan wines and wine products. *The science of the total environment*, **2002**, 285, 155-163.
- 170 Z. Murányi, Z. Kovács. Statistical evaluation of aroma and metal content in Tokay wines. *Microchemical Journal*, **2000**, 67, 91-96.
- 171 I. Matsushige, E. Oliveira. Determination of trace elements in Brazilian beers by ICP-AES. *Food Chemistry*, **1993**, 47, 205-207.
- 172 M. Thompson. Regresión Methods in the Comparison of Accuracy. *Analyst*, **1982**, 107, 1169-1180.
- 173 S. Burke. Missing Values, Outliers, Robust Statistics & Non-parametric Methods. *LC GC Europe Online Supplement*, **1999**, 19-24.
- 174 I. Taverniers, M. De Loose, E. Van Bockstaele. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *Trends in Analytical Chemistry*, **2004**, 23, 535-552.
- 175 L. Cuadros, A. M. García, J. M. Bosque. Statistical estimation of linear calibration range. *Analytical letters*, **1996**, 29, 1231-1239.
- 176 J. N. Miller. J. C. Miller. *Statistics and Chemometrics for analytical Chemistry* 4^a ed. Prentice Hall, London. **2000**.
- 177 W. P. Gardiner, *Statistical Analysis Methods for Chemists*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, **1997**.
- 178 M. Forina, C. Armanino, R. Leardi, G. Drava. A class-modelling technique based on potential functions. *Journal of Chemometrics*, **1991**, 5, 235-453.
- 179 D. Patterson, *Artificial Neural Networks*, Prentice Hall, Singaore, **1996**.
- 180 G. Ouyang, Y. Chen, L. Setkova, J. Pawliszyn. Calibration of solid-phase microextraction for quantitative analysis by gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, **2005**, 1097, 9-16.
- 181 J. M. Jurado, O. Ballesteros, A. Alcázar, F. Pablos, M. J. Martín, J. L. Vílchez, A. Navalón. Characterization of aniseed-flavoured spirit drinks

by headspace solid-phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry and chemometrics. *Talanta*, **2007**, 72, 506-511.

182 J. Pawliszyn. SPME-Solid Phase Microextraction-theory and practice, Willey-VCH, New York, **1997**.

183 O. Gürbüz, J. M. Rouseff, R. L. Rouseff. Comparison of Aroma Volatiles in Comercial Merlot and Cabernet Sauvignon Wines Using Gas Chromatography-Olfactometry and Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2006**, 54, 3990-3996.

184 M. Cháves, L. Zea, L. Moyano, M. Medina. Changes in Color and Odorant Compounds during Oxidative Aging of Pedro Ximenez Sweet Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2007**, 55, 3592-3598.

185 R. López, N. Ortín, J. P. Pérez, J. Cacho, V. Ferreira. Impact Odorants of Different Young White Wines from the Canary Islands. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2003**, 51, 3419-3425.

186 A. Alcazar, J. M. Jurado, F. Pablos, A. G. Gonzalez, M. J. Martin. HPLC determination of 2-furaldehyde and 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde in alcoholic beverages. *Microchemical Journal*, **2006**, 82, 22-28.

APÉNDICE I.
CONCENTRACIONES DE METALES EN TEQUILA Y MEZCAL

Concentración (mg/l) de metales en tequila y mezcal.

Muestra	Na	K	Ca	S	Mg	Mn	Fe	Zn	Sr	Ba	Cu	Al
B1	2,982 ± 0,009	0,051 ± 0,003	0,620 ± 0,004	0,28 ± 0,02	0,1800 ± 0,0006	0,0180 ± 0,0001	0,0820 ± 0,0005	0,0440 ± 0,0003	0,01800 ± 0,00006	0,02100 ± 0,00003	1,13 ± 0,01	0,073 ± 0,001
B2	2,90 ± 0,01	0,043 ± 0,002	0,7570 ± 0,0009	0,44 ± 0,03	0,1810 ± 0,0008	0,0180 ± 0,0003	0,082 ± 0,001	0,0640 ± 0,0006	0,01800 ± 0,00001	0,02000 ± 0,00004	1,143 ± 0,008	0,0690 ± 0,0006
B3	2,73 ± 0,04	0,038 ± 0,001	0,677 ± 0,001	0,392 ± 0,007	0,185 ± 0,003	0,0180 ± 0,0004	0,0830 ± 0,0009	0,0620 ± 0,0003	0,01800 ± 0,00001	0,02100 ± 0,00006	1,160 ± 0,004	0,0700 ± 0,0004
B4	1,911 ± 0,006	0,0200 ± 0,0005	1,174 ± 0,004	0,814 ± 0,002	0,230 ± 0,003	0,0210 ± 0,0002	0,032 ± 0,001	0,0870 ± 0,0007	0,02200 ± 0,00002	0,02200 ± 0,00003	1,79 ± 0,02	0,052 ± 0,002
B5	1,961 ± 0,003	0,029 ± 0,009	1,038 ± 0,003	0,345 ± 0,007	0,202 ± 0,002	0,0200 ± 0,0001	0,0320 ± 0,0002	0,079 ± 0,002	0,02100 ± 0,00001	0,02200 ± 0,00003	1,748 ± 0,002	0,0440 ± 0,0002
B6	1,9150 ± 0,0003	0,023 ± 0,004	1,031 ± 0,003	0,27 ± 0,02	0,2030 ± 0,0005	0,0210 ± 0,0003	0,0380 ± 0,0002	0,07800±0 ,00007	0,02101 ± 0,00001	0,02200 ± 0,00003	1,74 ± 0,02	n.d.
B7	2,00 ± 0,01	0,1140 ± 0,0004	0,770 ± 0,003	0,148 ± 0,007	0,1320 ± 0,0007	0,0300 ± 0,0002	0,0860 ± 0,0007	0,046 ± 0,001	0,01700 ± 0,00006	0,02100 ± 0,00008	0,0310 ± 0,0007	0,0440 ± 0,0004
B8	2,01 ± 0,02	0,1130 ± 0,0009	0,774 ± 0,003	0,126 ± 0,007	0,1340 ± 0,0007	0,0310 ± 0,0001	0,1270 ± 0,0004	0,0460 ± 0,0008	0,01700 ± 0,00004	0,02100 ± 0,00008	0,0320 ± 0,0002	0,045 ± 0,001
B9	2,021 ± 0,006	0,116 ± 0,001	0,965 ± 0,004	0,16 ± 0,01	0,136 ± 0,002	0,0310 ± 0,0005	0,094 ± 0,001	0,0830 ± 0,0008	0,01700 ± 0,00001	0,02100 ± 0,00008	0,032 ± 0,001	0,0430 ± 0,0006
B10	2,02 ± 0,02	1,60 ± 0,06	0,7090 ± 0,0002	0,171 ± 0,01	0,09900 ± 0,0001	0,0140 ± 0,0003	0,148 ± 0,002	0,035 ± 0,001	0,00600 ± 0,00005	0,00700 ± 0,00009	0,0260 ± 0,0005	0,066

Muestra	Na	K	Ca	S	Mg	Mn	Fe	Zn	Sr	Ba	Cu	Al
B11	2,01 ± 0,01	1,58 ± 0,06	0,736 ± 0,002	0,170 ± 0,003	0,100 ± 0,002	0,01400 ± 0,00005	0,0720 ± 0,0005	0,0400 ± 0,0005	0,00600 ± 0,00006	0,0070 ± 0,0002	0,0260 ± 0,0003	0,0630 ± 0,0002
B12	1,253 ± 0,001	0,0180 ± 0,0008	0,374 ± 0,001	0,16 ± 0,01	0,0840 ± 0,0002	0,0180 ± 0,0003	0,0270 ± 0,0005	0,0280 ± 0,0006	0,0160 ± 0,0001	n.d.	0,0640 ± 0,0009	n.d.
B13	1,308 ± 0,003	0,0180 ± 0,0007	0,404 ± 0,002	0,195 ± 0,006	0,0870 ± 0,0003	0,01800 ± 0,00009	0,032 ± 0,001	0,046 ± 0,001	0,01600 ± 0,00001	n.d.	0,0640 ± 0,0001	0,044 ± 0,003
B14	1,27 ± 0,01	0,020 ± 0,003	0,352 ± 0,002	0,198 ± 0,005	0,0850 ± 0,00005	0,01800 ± 0,00009	0,0220 ± 0,0004	0,0340 ± 0,0004	0,01600 ± 0,00001	n.d.	0,0650 ± 0,0005	n.d.
B15	29,0 ± 0,2	0,038 ± 0,002	1,057 ± 0,002	3,9 ± 0,3	0,254 ± 0,001	0,0190 ± 0,0002	0,0150 ± 0,0009	0,0200 ± 0,0006	0,02600 ± 0,00004	0,02200 ± 0,00004	0,0780 ± 0,0006	0,058 ± 0,002
B16	29,0 ± 0,5	0,027 ± 0,002	0,909 ± 0,002	3,8 ± 0,2	0,216 ± 0,002	0,0180 ± 0,0001	0,0140 ± 0,0004	0,02500 ± 0,0009	0,0240 ± 0,0002	0,021	0,0780 ± 0,0002	n.d.
B17	28,8 ± 0,2	0,0240 ± 0,0005	0,9540 ± 0,0007	4,0 ± 0,1	0,220 ± 0,001	0,01900 ± 0,00009	0,018 ± 0,002	0,020 ± 0,0001	0,0240 ± 0,0001	0,02100 ± 0,00001	0,0780 ± 0,0001	n.d.
B18	0,6300 ± 0,0003	0,0160 ± 0,0008	0,300 ± 0,001	0,108 ± 0,004	0,106 ± 0,0004	n.d.	0,0210 ± 0,0007	0,0340 ± 0,0008	0,01500 ± 0,00001	0,02000 ± 0,00001	0,40900 ± 0,00005	0,064 ± 0,002
B19	0,71 ± 0,01	0,0200 ± 0,0002	0,2770 ± 0,0008	0,16 ± 0,01	0,1080 ± 0,0005	n.d.	0,030	0,02700 ± 0,00004	0,015	0,02100 ± 0,00006	0,424 ± 0,002	0,1490 ± 0,0004
B20	0,68 ± 0,01	0,018 ± 0,003	0,292 ± 0,002	0,13 ± 0,02	0,1050 ± 0,0002	n.d.	0,025	0,02500 ± 0,00007	0,01500 ± 0,00002	0,02000 ± 0,00008	0,420 ± 0,001	0,0660 ± 0,0004
B21	2,23 ± 0,02	0,040 ± 0,002	0,979 ± 0,007	0,39 ± 0,02	0,252 ± 0,002	0,0250 ± 0,0003	0,029 ± 0,003	0,335 ± 0,002	0,02700 ± 0,00005	0,02200 ± 0,00003	0,2120 ± 0,0003	0,043 ± 0,001
B22	2,24 ± 0,01	0,0401 ± 0,0002	0,989 ± 0,001	0,402 ± 0,009	0,254 ± 0,002	0,0250 ± 0,0004	0,0900 ± 0,0002	0,3350 ± 0,0009	0,02700 ± 0,00002	0,0220 ± 0,0002	0,213 ± 0,002	0,0440 ± 0,0004
B23	2,233 ± 0,001	0,043 ± 0,002	0,968 ± 0,002	0,41 ± 0,03	0,2550 ± 0,0009	0,0250 ± 0,0004	0,0330 ± 0,0009	0,333 ± 0,006	0,02700 ± 0,00003	0,02200 ± 0,00004	0,2120 ± 0,0002	0,038 ± 0,008

Muestra	Na	K	Ca	S	Mg	Mn	Fe	Zn	Sr	Ba	Cu	Al
B24	2,283 ± 0,005	0,57 ± 0,04	0,9380 ± 0,0005	0,401 ± 0,008	0,221 ± 0,002	0,0080 ± 0,0003	0,014	0,322 ± 0,002	0,0150 ± 0,0001	0,00800 ± 0,00007	0,207 ± 0,002	n.d.
B25	2,404 ± 0,002	0,607 ± 0,009	0,96 ± 0,01	0,42 ± 0,02	0,216 ± 0,001	0,0080 ± 0,0005	0,019 ± 0,001	0,31 ± 0,002	0,01500 ± 0,00009	0,0080 ± 0,0001	0,208 ± 0,001	0,052 ± 0,001
B26	2,483 ± 0,006	0,022 ± 0,003	0,815 ± 0,003	0,18 ± 0,01	0,1250 ± 0,00004	0,019	0,0240 ± 0,0004	0,0890 ± 0,0002	0,0330 ± 0,0001	0,02200 ± 0,00007	0,1040 ± 0,0003	n.d.
B27	2,5 ± 0,5	0,02 ± 0,02	0,828 ± 0,003	0,195 ± 0,009	0,1280 ± 0,0005	0,0180 ± 0,0002	0,0460 ± 0,0007	0,0900 ± 0,0002	0,033	0,02200 ± 0,00004	0,1040 ± 0,0002	n.d.
B28	2,512 ± 0,008	0,020 ± 0,001	0,8600 ± 0,0005	0,20 ± 0,03	0,1250 ± 0,0006	0,01800 ± 0,00009	0,026	0,105 ± 0,001	0,0330 ± 0,0002	0,0220 ± 0,0001	0,1070 ± 0,0008	n.d.
B29	1,313 ± 0,004	0,23 ± 0,03	0,742 ± 0,005	0,32 ± 0,01	0,074	0,015	0,0780 ± 0,0007	0,106 ± 0,002	0,021	0,024	0,096 ± 0,002	0,049
B30	1,079 ± 0,006	0,167 ± 0,006	0,948 ± 0,002	0,27 ± 0,01	0,087 ± 0,001	0,0160 ± 0,0007	0,128 ± 0,001	0,052 ± 0,00071	0,022	0,024	0,095 ± 0,001	0,051 ± 0,001
B31	1,137 ± 0,003	0,21 ± 0,02	0,700 ± 0,001	0,316 ± 0,008	0,080	0,016	0,093	0,0980 ± 0,0007	0,021	0,024	0,0970 ± 0,0007	0,043 ± 0,002
B32	1,278 ± 0,003	0,010 ± 0,003	0,524 ± 0,002	0,225 ± 0,008	0,0640 ± 0,0003	0,020	0,026 ± 0,001	0,049 ± 0,002	0,01700 ± 0,00003	0,02500 ± 0,00004	0,0210 ± 0,0005	0,031 ± 0,001
B33	1,284 ± 0,009	0,26 ± 0,01	0,536 ± 0,002	0,259 ± 0,016	0,0740 ± 0,00002	0,020	0,0320 ± 0,0003	0,049 ± 0,001	0,02300 ± 0,00003	0,02300 ± 0,00004	0,021 ± 0,006	0,0330 ± 0,0003
B34	1,309 ± 0,001	0,21 ± 0,01	0,518 ± 0,001	0,51 ± 0,03	0,0600 ± 0,0004	0,01200 ± 0,00006	0,025 ± 0,002	0,0520 ± 0,0006	0,01400 ± 0,00003	0,0160 ± 0,0001	0,019 ± 0,07	n.d.
B35	1,274 ± 0,005	0,29 ± 0,03	0,525 ± 0,007	0,26 ± 0,02	0,0280 ± 0,0008	0,0020 ± 0,0001	0,014	0,0510 ± 0,0002	0,00600 ± 0,00005	0,01100 ± 0,00006	0,0160 ± 0,0004	n.d.
B36	4,55 ± 0,04	0,054 ± 0,002	3,94 ± 0,05	0,667 ± 0,002	1,093 ± 0,004	0,0350 ± 0,0001	0,0370 ± 0,0005	0,062 ± 0,002	0,03500 ± 0,00003	0,0210 ± 0,0001	0,098 ± 0,001	0,0440 ± 0,0006

Muestra	Na	K	Ca	S	Mg	Mn	Fe	Zn	Sr	Ba	Cu	Al
B37	4,51 ± 0,02	0,055 ± 0,004	3,97 ± 0,01	0,63 ± 0,02	1,087 ± 0,008	0,0350 ± 0,0002	0,0370 ± 0,0005	0,0570 ± 0,0004	0,03500 ± 0,00004	0,02100 ± 0,00006	0,0960 ± 0,0004	0,045 ± 0,001
B38	4,50 ± 0,03	0,0560 ± 0,0009	3,96 ± 0,01	0,69 ± 0,06	1,098 ± 0,002	0,0340 ± 0,0001	0,0350 ± 0,0007	0,0550 ± 0,0003	0,03500 ± 0,00006	0,02100 ± 0,00006	0,095 ± 0,001	0,0510 ± 0,0004
B39	1,523 ± 0,007	0,55 ± 0,01	0,7520 ± 0,0004	0,73 ± 0,04	0,4530 ± 0,0007	0,0180 ± 0,0002	0,056 ± 0,001	0,0560 ± 0,0006	0,01800 ± 0,00001	0,02100 ± 0,00004	0,3610 ± 0,0008	0,0440 ± 0,0008
B40	1,486 ± 0,006	0,55 ± 0,01	0,760 ± 0,003	0,77 ± 0,04	0,454 ± 0,001	0,018	0,0590 ± 0,0005	0,0600 ± 0,0009	0,01800 ± 0,00001	0,0210 ± 0,0001	0,359 ± 0,001	0,0310 ± 0,0002
B41	1,55 ± 0,01	0,55 ± 0,01	0,771 ± 0,006	0,79 ± 0,04	0,451 ± 0,003	0,0190 ± 0,0002	0,059 ± 0,002	0,0660 ± 0,0006	0,01800 ± 0,00006	0,02100 ± 0,00003	0,359 ± 0,001	0,0470 ± 0,0002
B42	8,98 ± 0,05	0,0200 ± 0,0009	0,408 ± 0,001	1,12 ± 0,04	0,0660 ± 0,0002	0,0190 ± 0,0004	0,0320 ± 0,0004	0,2040 ± 0,0004	0,01600 ± 0,00001	0,02100 ± 0,00001	0,2720 ± 0,0009	n.d.
B43	9,247 ± 0,003	0,027 ± 0,002	0,393 ± 0,004	1,02 ± 0,08	0,0660 ± 0,0003	0,0190 ± 0,0002	0,040 ± 0,001	0,205 ± 0,003	0,01600 ± 0,00002	0,02100 ± 0,00004	0,2700 ± 0,0003	0,0500 ± 0,0004
B44	8,869 ± 0,008	0,021 ± 0,002	0,391 ± 0,001	1,07 ± 0,07	0,0650 ± 0,0002	0,0190 ± 0,0004	0,0300 ± 0,0007	0,203 ± 0,002	0,01600 ± 0,00001	0,02100 ± 0,00006	0,269 ± 0,001	0,044 ± 0,001
G1	2,74 ± 0,05	0,030 ± 0,001	0,642 ± 0,002	2,3 ± 0,3	0,0900 ± 0,0007	n.d.	0,029	0,036 ± 0,001	0,01600 ± 0,00003	0,02000 ± 0,00007	1,133 ± 0,003	0,0450 ± 0,0002
G2	2,760 ± 0,005	0,034 ± 0,003	0,644 ± 0,002	2,9 ± 0,3	0,0910 ± 0,0003	n.d.	0,0290 ± 0,0002	0,032 ± 0,001	0,01600 ± 0,00006	0,02000 ± 0,00001	1,141 ± 0,002	0,044 ± 0,001
G3	2,730 ± 0,003	0,031 ± 0,001	0,656 ± 0,003	2,7 ± 0,2	0,0920 ± 0,0005	n.d.	0,0330 ± 0,0002	0,0350 ± 0,0003	0,01600 ± 0,00003	0,02000 ± 0,00004	1,15 ± 0,01	0,0500 ± 0,0006
G4	2,85 ± 0,04	0,46 ± 0,03	0,588 ± 0,002	2,7 ± 0,1	0,0510 ± 0,0002	n.d.	0,016 ± 0,001	0,035 ± 0,002	0,00500 ± 0,00001	0,0060 ± 0,0001	1,341 ± 0,005	0,0530 ± 0,0005
G5	3,05 ± 0,05	0,47 ± 0,01	0,604 ± 0,002	2,7 ± 0,2	0,0540 ± 0,0003	n.d.	0,0200 ± 0,0002	0,039 ± 0,002	0,00500 ± 0,00002	0,00600 ± 0,00007	1,3570 ± 0,0007	0,059

Muestra	Na	K	Ca	S	Mg	Mn	Fe	Zn	Sr	Ba	Cu	Al
G6	4,24 ± 0,01	0,56 ± 0,04	1,085 ± 0,002	3,308 ± 0,004	0,1620 ± 0,0003	0,0210 ± 0,0003	0,047	0,128 ± 0,001	0,0380 ± 0,0001	0,0190 ± 0,0001	0,1020 ± 0,0004	0,057 ± 0,002
G7	4,29 ± 0,04	0,536 ± 0,007	1,225 ± 0,002	3,31 ± 0,05	0,1630 ± 0,0002	0,0210 ± 0,0004	0,059 ± 0,001	0,1760 ± 0,0007	0,03800 ± 0,00001	0,01900 ± 0,00005	0,1050 ± 0,0002	0,0580 ± 0,0009
G8	4,36 ± 0,01	0,54 ± 0,04	1,218 ± 0,008	3,5 ± 0,2	0,1690 ± 0,0005	0,0210 ± 0,0001	0,0810 ± 0,0005	0,0150 ± 0,0001	0,0380 ± 0,0001	0,01900 ± 0,00007	0,1010 ± 0,0002	0,0970 ± 0,0009
G9	4,25 ± 0,03	0,54 ± 0,02	0,843 ± 0,004	3,168 ± 0,002	0,1150 ± 0,0005	0,0030 ± 0,0001	0,0130 ± 0,0004	0,1060 ± 0,0009	0,0210 ± 0,0003	0,0060 ± 0,0001	0,098 ± 0,002	0,064 ± 0,003
G10	4,62 ± 0,01	0,53 ± 0,03	0,879 ± 0,002	3,2 ± 0,3	0,1200 ± 0,0004	0,0030 ± 0,0003	0,017 ± 0,002	0,102 ± 0,001	0,02200 ± 0,00001	0,00700 ± 0,00009	0,0990 ± 0,0003	0,100 ± 0,002
G11	3,361 ± 0,004	0,25 ± 0,02	0,668 ± 0,001	4,5 ± 0,2	0,1330 ± 0,0001	0,0200 ± 0,0001	0,0550 ± 0,0003	0,0330 ± 0,0001	0,02300 ± 0,00008	0,02000 ± 0,00005	0,0610 ± 0,0001	0,050 ± 0,001
G12	3,360 ± 0,008	0,25 ± 0,02	0,621 ± 0,001	4,8 ± 0,3	0,1320 ± 0,0005	0,02000 ± 0,00004	0,0510 ± 0,0008	0,0080 ± 0,0002	0,02400 ± 0,00005	0,0210 ± 0,0001	0,0610 ± 0,0004	0,048 ± 0,002
G13	3,42 ± 0,01	0,25 ± 0,02	0,637 ± 0,003	4,9 ± 0,2	0,1320 ± 0,0008	0,021	0,0560 ± 0,0002	0,025 ± 0,001	0,02200 ± 0,00001	0,02100 ± 0,00004	0,06200 ± 0,00005	0,051 ± 0,001
G14	3,31 ± 0,09	0,27 ± 0,05	0,274 ± 0,001	4,9 ± 0,3	0,0770 ± 0,0003	0,002	0,021 ± 0,001	0,0200 ± 0,0007	0,00400 ± 0,00003	0,008	0,0570 ± 0,0002	n.d.
G15	3,31 ± 0,02	0,27 ± 0,04	0,282 ± 0,002	4,6 ± 0,3	0,0810 ± 0,0009	0,0020 ± 0,0002	0,0220 ± 0,0004	0,0160 ± 0,0006	0,00400 ± 0,00001	0,00800 ± 0,00001	0,056 ± 0,001	n.d.
G16	13,60 ± 0,03	1,48 ± 0,05	0,636 ± 0,002	1,63 ± 0,02	0,1610 ± 0,0003	0,0270 ± 0,0002	0,0690 ± 0,0008	0,222 ± 0,001	0,023	0,02100 ± 0,00003	1,224 ± 0,006	0,0450 ± 0,0009
G17	13,67 ± 0,03	1,45 ± 0,04	0,848 ± 0,006	1,7 ± 0,2	0,1680 ± 0,0002	0,02700 ± 0,00004	0,053 ± 0,002	0,2550 ± 0,0009	0,02300 ± 0,00003	0,02100 ± 0,00007	1,23 ± 0,01	0,0440 ± 0,0007
G18	13,66 ± 0,05	1,44 ± 0,07	0,7190 ± 0,00004	1,68 ± 0,04	0,165 ± 0,001	0,0270 ± 0,0005	0,056 ± 0,001	0,238 ± 0,002	0,02300 ± 0,00001	0,02100 ± 0,00001	1,216 ± 0,003	0,041 ± 0,006

Muestra	Na	K	Ca	S	Mg	Mn	Fe	Zn	Sr	Ba	Cu	Al
G19	14,2 ± 0,3	1,38 ± 0,06	0,586 ± 0,004	1,587 ± 0,004	0,1220 ± 0,0001	0,0090 ± 0,0003	0,069 ± 0,001	0,228 ± 0,003	0,00500 ± 0,00001	0,0080 ± 0,0001	1,20 ± 0,01	0,071
G20	14,63 ± 0,09	1,50 ±0,03	0,593 ± 0,002	1,741 ± 0,006	0,125 ± 0,002	0,0100 ± 0,0003	0,037 ± 0,002	0,226 ± 0,002	0,00500 ± 0,00005	0,0080 ± 0,0001	1,20 ± 0,02	0,048 ± 0,001
R1	2,02 ± 0,03	1,28±0,08	0,885 ± 0,002	0,10 ± 0,02	0,149 ± 0,001	0,0230 ± 0,0004	0,0380 ± 0,0002	0,02900 ± 0,00007	0,02300 ± 0,00003	0,02000 ± 0,00004	0,0160 ± 0,0004	0,034
R2	2,02 ± 0,04	1,47±0,01	0,787 ± 0,001	0,11 ± 0,02	0,1520 ± 0,0002	0,0230 ± 0,0007	0,0280 ± 0,0002	0,02 ± 0,02	0,02301 ± 0,00006	0,0200 ± 0,0001	0,0160 ± 0,0002	0,0500 ± 0,0002
R3	2,0710 ± 0,0002	1,9 ± 0,1	0,7590 ± 0,00007	0,12 ± 0,02	0,148 ± 0,002	0,0220 ± 0,0001	0,031 ± 0,001	0,034 ± 0,001	0,02300 ± 0,00003	0,02600 ± 0,00008	0,0160 ± 0,0002	0,0920 ± 0,0002
R4	1,9700 ± 0,01	5,70±0,03	1,4900 ± 0,0003	2,16 ± 0,08	0,1890 ± 0,0006	0,0390 ± 0,0003	0,0580 ± 0,0005	0,0570 ± 0,0006	0,026	0,02400 ± 0,00005	0,943 ± 0,001	n.d.
R5	1,92 ± 0,03	5,74 ± 0,03	1,588 ± 0,008	2,20 ± 0,01	0,1930 ± 0,0004	0,03900 ± 0,00004	0,058 ± 0,001	0,0590 ± 0,0002	0,02600 ± 0,00006	0,0250 ± 0,0001	0,942 ± 0,004	n.d.
R6	1,919 ± 0,006	5,70 ± 0,08	1,825 ± 0,009	2,26 ± 0,07	0,199 ± 0,002	0,0400 ± 0,0001	0,069 ± 0,001	0,0890 ± 0,0004	0,02600 ± 0,00002	0,02500 ± 0,00008	0,9360 ± 0,0003	n.d.
R7	1,60 ± 0,01	3,95 ± 0,03	0,921 ± 0,002	0,291 ± 0,003	0,1810 ± 0,0002	0,0460 ± 0,0002	0,1350 ± 0,0003	0,0410 ± 0,0008	0,02400 ± 0,00002	0,021 ± 0,001	0,0350 ± 0,0005	0,0490 ± 0,0007
R8	1,64 ± 0,01	3,91 ± 0,05	0,9260 ± 0,0002	0,30 ± 0,02	0,186 ± 0,001	0,046	0,133 ± 0,002	0,0360 ± 0,0004	0,02400 ± 0,00002	0,02100 ± 0,00001	0,03500 ± 0,00005	0,0470 ± 0,0002
R9	1,61 ± 0,01	3,80 ± 0,06	0,830 ± 0,005	0,30 ± 0,04	0,1790 ± 0,0008	0,0460 ± 0,0001	0,132 ± 0,002	0,0420 ± 0,0008	0,02400 ± 0,00003	0,021 ± 0,00003	0,0360 ± 0,0002	0,0480 ± 0,0007
R10	2,11 ± 0,01	2,42 ± 0,04	0,5745 ± 0,0005	0,92 ± 0,04	0,1080 ± 0,0004	0,0300 ± 0,0003	0,0540 ± 0,0005	0,0300 ± 0,0003	0,02200 ± 0,00002	0,01900 ± 0,00007	0,0340 ± 0,0008	n.d.
R11	2,11 ± 0,02	2,25 ± 0,05	0,5870 ± 0,0002	0,96 ± 0,06	0,1080 ± 0,0001	0,0310 ± 0,0003	0,0540 ± 0,0002	0,0320 ± 0,0002	0,02200 ± 0,00003	0,01900 ± 0,00007	0,033	n.d.

Muestra	Na	K	Ca	S	Mg	Mn	Fe	Zn	Sr	Ba	Cu	Al
R12	2,08 ± 0,02	2,28 ± 0,02	0,594 ± 0,004	0,90 ± 0,04	0,1080 ± 0,0002	0,03100 ± 0,00004	0,053 ± 0,001	0,0280 ± 0,0004	0,02200 ± 0,00001	0,01900 ± 0,00001	0,03400 ± 0,00005	n.d.
R13	1,240 ± 0,004	1,93 ± 0,02	0,677 ± 0,004	0,272 ± 0,006	0,1310 ± 0,0004	0,03100 ± 0,00004	0,039 ± 0,002	0,0320 ± 0,0007	0,02300 ± 0,00003	0,02000 ± 0,00004	0,0330 ± 0,0001	0,034 ± 0,001
R14	1,37 ± 0,02	1,9 ± 0,1	1,039 ± 0,006	0,257 ± 0,002	0,140 ± 0,002	0,0320 ± 0,0005	0,0330 ± 0,0008	0,1200 ± 0,0005	0,02400 ± 0,00003	0,020	0,0330 ± 0,0005	n.d.
R15	1,454 ± 0,005	1,99 ± 0,01	2,07 ± 0,02	0,29 ± 0,01	0,1560 ± 0,0001	0,03200 ± 0,00008	0,038 ± 0,001	0,346 ± 0,005	0,025	0,02000 ± 0,00005	0,0340 ± 0,0002	0,051 ± 0,002
R16	3,01 ± 0,02	7,01 ± 0,07	1,147 ± 0,003	0,70 ± 0,04	0,3120 ± 0,0004	0,04600 ± 0,00004	0,1020 ± 0,0008	0,176 ± 0,002	0,02900 ± 0,00003	0,02200 ± 0,00004	0,4480 ± 0,0007	0,062 ± 0,003
R17	2,91 ± 0,01	6,80 ± 0,04	1,094 ± 0,002	0,72 ± 0,03	0,304 ± 0,002	0,0450 ± 0,0005	0,1050 ± 0,0002	0,174 ± 0,002	0,02900 ± 0,00004	0,02100 ± 0,00004	0,439 ± 0,008	0,0570 ± 0,0007
R18	3,07 ± 0,04	7,3 ± 0,1	1,359 ± 0,003	0,795 ± 0,005	0,356 ± 0,003	0,0490 ± 0,0001	0,114 ± 0,001	0,208 ± 0,003	0,03000 ± 0,00007	0,02200 ± 0,00007	0,4370 ± 0,0007	0,062 ± 0,001
R19	3,28 ± 0,04	6,0 ± 0,1	1,065 ± 0,002	1,92 ± 0,03	0,337 ± 0,001	0,0410 ± 0,0005	0,0570 ± 0,0003	0,2140 ± 0,0006	0,03000 ± 0,00003	0,02000 ± 0,00003	0,408 ± 0,004	0,0500 ± 0,0005
R20	3,45 ± 0,05	6,51 ± 0,06	1,37 ± 0,01	2,52 ± 0,05	0,431 ± 0,005	0,04700 ± 0,00008	0,0700 ± 0,0002	0,2310 ± 0,0009	0,0330 ± 0,0001	0,02100 ± 0,00003	0,3810 ± 0,0004	0,0480 ± 0,0005
R21	3,470 ± 0,005	6,4 ± 0,2	1,267 ± 0,002	2,36 ± 0,07	0,404 ± 0,005	0,0450 ± 0,0001	0,0660 ± 0,0005	0,2190 ± 0,0001	0,03200 ± 0,00003	0,021	0,386 ± 0,002	0,0460 ± 0,0002
R22	4,25 ± 0,02	0,68 ± 0,02	0,5880 ± 0,0005	5,68 ± 0,09	0,2690 ± 0,0001	0,0230 ± 0,0003	0,031	0,0270 ± 0,0001	0,02300 ± 0,00001	0,01800 ± 0,00004	0,1800 ± 0,0002	n.d.
R23	4,195 ± 0,002	0,62 ± 0,03	0,604 ± 0,001	6,14 ± 0,01	0,263 ± 0,004	0,0230 ± 0,0003	0,0310 ± 0,0005	0,033 ± 0,001	0,02300 ± 0,00004	0,01800 ± 0,00001	0,182 ± 0,002	0,040 ± 0,002
R24	4,17 ± 0,06	0,63 ± 0,03	0,824 ± 0,004	5,9 ± 0,2	0,262 ± 0,002	0,0230 ± 0,00004	0,0440 ± 0,0005	0,0270 ± 0,0007	0,02700 ± 0,00002	0,01800 ± 0,00003	0,184 ± 0,001	0,055 ± 0,001

Muestra	Na	K	Ca	S	Mg	Mn	Fe	Zn	Sr	Ba	Cu	Al
R25	18,0 ± 0,3	8,5 ± 0,1	2,408 ± 0,009	2,99 ± 0,05	1,388 ± 0,007	0,0430 ± 0,0005	0,057 ± 0,002	0,1720 ± 0,0006	0,04000 ± 0,00007	0,0220 ± 0,0002	0,313 ± 0,002	0,077
R26	18,71 ± 0,03	9,4 ± 0,2	2,307 ± 0,003	3,1 ± 0,1	1,44 ± 0,01	0,0440 ± 0,0002	0,0480 ± 0,0006	0,190 ± 0,002	0,04000 ± 0,00002	0,02300 ± 0,00003	0,3350 ± 0,0005	0,079
R27	18,8 ± 0,3	9,1 ± 0,2	4,012 ± 0,003	3,25 ± 0,050	1,472 ± 0,003	0,0450 ± 0,0002	0,0550 ± 0,0002	0,575 ± 0,003	0,04100 ± 0,00002	0,02300 ± 0,00003	0,3410 ± 0,0006	0,089 ± 0,004
R28	18,9 ± 0,2	9,9 ± 0,2	2,31 ± 0,02	3,29 ± 0,03	1,475 ± 0,002	0,0270 ± 0,0001	0,0320 ± 0,0009	0,200 ± 0,002	0,02300 ± 0,00007	0,01000 ± 0,00006	0,342 ± 0,003	0,0870 ± 0,0007
R29	18,7 ± 0,2	9,7 ± 0,2	2,34 ± 0,01	3,230 ± 0,006	1,52 ± 0,01	0,02900 ± 0,00009	0,039 ± 0,001	0,2080 ± 0,0006	0,02400 ± 0,00001	0,01000 ± 0,00001	0,342 ± 0,001	0,090
R30	19,1 ± 0,3	9,6 ± 0,3	2,4720 ± 0,0009	3,2 ± 0,2	1,55 ± 0,02	0,0290 ± 0,0002	0,0380 ± 0,0007	0,202 ± 0,002	0,0240 ± 0,0002	0,01000 ± 0,00004	0,3470 ± 0,0001	0,0870 ± 0,0002
R31	7,50 ± 0,07	1,5 ± 0,1	5,31 ± 0,03	2,4 ± 0,1	0,6020 ± 0,0009	0,0240 ± 0,0001	0,055 ± 0,001	0,073 ± 0,003	0,03900 ± 0,00008	0,02200 ± 0,00008	0,2020 ± 0,0008	0,0580 ± 0,0009
R32	7,4 ± 0,2	1,503 ± 0,005	5,309 ± 0,003	2,27 ± 0,07	0,599 ± 0,005	0,02400 ± 0,00008	0,053 ± 0,001	0,0710 ± 0,0001	0,0390 ± 0,0002	0,02100 ± 0,00005	0,2010 ± 0,0007	0,0530 ± 0,0009
R33	7,13 ± 0,04	1,38 ± 0,03	5,36 ± 0,03	2,52 ± 0,05	0,614	0,02500 ± 0,00004	0,052 ± 0,002	0,070 ± 0,002	0,03900 ± 0,00002	0,02100 ± 0,00003	0,199 ± 0,003	0,054 ± 0,002
R34	5,97 ± 0,02	3,2 ± 0,1	6,770 ± 0,004	2,46 ± 0,07	0,362 ± 0,002	0,0180 ± 0,0004	0,0450 ± 0,0002	0,0640 ± 0,0004	0,02700 ± 0,00002	0,01300 ± 0,00003	0,415 ± 0,0003	0,056 ± 0,001
R35	5,9030 ± 0,0004	3,07 ± 0,05	6,59 ± 0,06	2,3 ± 0,1	0,356 ± 0,003	0,0180 ± 0,0001	0,043 ± 0,001	0,0600 ± 0,0004	0,02600 ± 0,00005	0,01300 ± 0,00001	0,409 ± 0,00379	0,0590 ± 0,0007
R36	6,17 ± 0,06	3,19 ± 0,07	6,91 ± 0,01	2,534 ± 0,002	0,369 ± 0,004	0,0180 ± 0,0002	0,0440 ± 0,0003	0,067 ± 0,002	0,0270 ± 0,0002	0,0130 ± 0,0002	0,4170 ± 0,0007	0,21 ± 0,02
R37	11,7 ± 0,1	6,68 ± 0,02	5,34 ± 0,04	1,29 ± 0,09	2,00 ± 0,03	0,0410 ± 0,0005	0,1210 ± 0,0005	0,0970 ± 0,0001	0,02900 ± 0,00006	0,0170 ± 0,0002	1,024 ± 0,004	0,080 ± 0,001

Muestra	Na	K	Ca	S	Mg	Mn	Fe	Zn	Sr	Ba	Cu	Al
R38	5,03 ± 0,01	1,448 ± 0,003	0,883 ± 0,006	1,59 ± 0,01	0,1260 ± 0,0002	0,01700 ± 0,00004	0,0400 ± 0,0009	0,0330 ± 0,0006	0,01300 ± 0,00001	0,0130 ± 0,0001	0,1320 ± 0,0003	0,026
R39	4,376 ± 0,009	3,2 ± 0,2	1,6420 ± 0,0005	2,504 ± 0,009	0,282 ± 0,002	0,0370 ± 0,0002	0,1740 ± 0,0008	0,165 ± 0,003	0,01700 ± 0,00001	0,014	0,614 ± 0,002	0,0920 ± 0,0005
R40	14,1 ± 0,1	22,7 ± 0,9	4,2580 ± 0,0207	4,93 ± 0,01	2,26 ± 0,01	0,0490 ± 0,0004	0,1720 ± 0,0006	0,274 ± 0,001	0,0360 ± 0,0001	0,01600 ± 0,00008	1,73 ± 0,01	0,149 ± 0,002
A1	3,63 ± 0,03	11,23 ± 0,02	2,129 ± 0,003	0,79 ± 0,02	0,4540 ± 0,0006	0,080 ± 0,002	0,293 ± 0,001	0,0870 ± 0,0001	0,02100 ± 0,00005	0,02100 ± 0,00004	0,1240 ± 0,0002	0,461 ± 0,003
A2	3,086 ± 0,008	10,8 ± 0,2	1,854 ± 0,005	0,74 ± 0,03	0,444 ± 0,006	0,0800 ± 0,0007	0,2920 ± 0,0003	0,0510 ± 0,0009	0,02100 ± 0,00007	0,0200 ± 0,0002	0,1240 ± 0,0005	0,447 ± 0,006
A3	3,07 ± 0,01	10,7 ± 0,2	1,868 ± 0,007	0,77 ± 0,03	0,439 ± 0,002	0,0800 ± 0,0002	0,3020 ± 0,0002	0,051 ± 0,002	0,0210 ± 0,0001	0,0210 ± 0,0002	0,1250 ± 0,0005	0,4760 ± 0,0005
A4	3,99 ± 0,01	8,57 ± 0,07	1,587 ± 0,005	2,11 ± 0,04	0,538 ± 0,004	0,04800 ± 0,00004	0,236 ± 0,002	0,413 ± 0,008	0,02500 ± 0,00006	0,02100 ± 0,00006	0,760 ± 0,004	0,0940 ± 0,0002
A5	4,06 ± 0,08	8,9 ± 0,2	1,613 ± 0,005	2,03 ± 0,09	0,532 ± 0,006	0,0480 ± 0,0006	0,2330 ± 0,0005	0,421 ± 0,003	0,02500 ± 0,00008	0,01400 ± 0,00006	0,7630 ± 0,0004	0,094
A6	4,04 ± 0,02	8,4 ± 0,3	1,59 ± 0,01	2,08 ± 0,07	0,530 ± 0,003	0,0470 ± 0,0004	0,220 ± 0,004	0,418 ± 0,007	0,02500 ± 0,00007	0,01500 ± 0,00005	0,759 ± 0,004	0,1120 ± 0,0007
A7	3,76 ± 0,01	9,0 ± 0,2	1,87 ± 0,01	1,79 ± 0,03	0,591 ± 0,001	0,0820 ± 0,0006	0,073 ± 0,003	0,1130 ± 0,0005	0,02100 ± 0,00003	0,01800 ± 0,00008	0,236 ± 0,003	0,0540 ± 0,0007
A8	2,93 ± 0,03	7,3330 ± 0,0009	1,563 ± 0,002	1,58 ± 0,03	0,492 ± 0,004	0,0700 ± 0,0004	0,058 ± 0,001	0,09000 ± 0,00003	0,01900 ± 0,00002	0,01700 ± 0,00003	0,18600 ± 0,00005	n.d.
A9	3,7 ± 0,1	9,1 ± 0,2	1,896 ± 0,007	1,98 ± 0,09	0,588 ± 0,001	0,0830 ± 0,0005	0,076 ± 0,002	0,100 ± 0,002	0,022	0,01800 ± 0,00009	0,2390 ± 0,0002	0,0620 ± 0,0007
A10	7,98 ± 0,05	2,3 ± 0,1	0,618 ± 0,006	1,83 ± 0,07	0,4310 ± 0,0009	0,01600 ± 0,00004	0,050 ± 0,001	0,02600 ± 0,00007	0,01500 ± 0,00005	0,01600 ± 0,00008	0,216 ± 0,001	0,0700 ± 0,0002

Muestra	Na	K	Ca	S	Mg	Mn	Fe	Zn	Sr	Ba	Cu	Al
A11	8,00 ± 0,05	2,24 ± 0,01	0,622 ± 0,002	1,87 ± 0,05	0,423 ± 0,002	0,0160 ± 0,0002	0,064 ± 0,001	0,0270 ± 0,0007	0,01500 ± 0,00003	0,01600 ± 0,00009	0,2160 ± 0,0007	0,077
A12	8,06 ± 0,05	2,32 ± 0,01	0,633 ± 0,001	1,87 ± 0,02	0,420 ± 0,004	0,0160 ± 0,0003	0,031 ± 0,001	0,0340 ± 0,0003	0,01600 ± 0,00001	0,01600 ± 0,00001	0,2150 ± 0,0007	0,079 ± 0,001
A13	7,96 ± 0,07	2,19 ± 0,02	0,5760 ± 0,0001	1,85 ± 0,05	0,431 ± 0,002	0,0160 ± 0,0003	0,0490 ± 0,0003	0,0220 ± 0,0005	0,01500 ± 0,00005	0,01600 ± 0,00004	0,2180 ± 0,0001	0,071 ± 0,002
A14	8,0 ± 0,1	2,29 ± 0,02	0,546 ± 0,002	1,89 ± 0,04	0,413 ± 0,003	0,01600 ± 0,00004	0,044	0,0290 ± 0,0005	0,01500 ± 0,00007	0,01600 ± 0,00004	0,214 ± 0,002	0,071 ± 0,001
A15	8,0 ± 0,2	2,24 ± 0,05	0,559 ± 0,002	1,86 ± 0,09	0,413 ± 0,001	0,01600 ± 0,00008	0,0460 ± 0,0008	0,02800 ± 0,00007	0,01500 ± 0,00005	0,01600 ± 0,00005	0,2130 ± 0,0005	0,071 ± 0,001
A16	9,3 ± 0,1	8,17 ± 0,05	1,126 ± 0,002	10,0 ± 0,2	0,2380 ± 0,0003	0,0410 ± 0,0005	0,066 ± 0,002	0,04000 ± 0,00007	0,01500 ± 0,00004	0,0170 ± 0,0001	0,2690 ± 0,0001	0,058 ± 0,001
A17	4,56 ± 0,02	7,26 ± 0,05	1,214 ± 0,006	0,598 ± 0,008	0,248 ± 0,001	0,05200 ± 0,00004	0,154 ± 0,003	0,04300 ± 0,00003	0,01600 ± 0,00001	0,01500 ± 0,00004	21,7 ± 0,3	0,074 ± 0,001
M1	4,90 ± 0,07	0,97 ± 0,04	3,154 ± 0,005	5,82 ± 0,03	0,2970 ± 0,0006	0,01800 ± 0,00004	0,068 ± 0,001	0,212 ± 0,002	0,0280 ± 0,0001	0,01500 ± 0,00008	0,747 ± 0,003	0,0310 ± 0,0007
M2	4,91 ± 0,01	1,01 ± 0,03	3,05 ± 0,01	5,87 ± 0,08	0,287 ± 0,003	0,0170 ± 0,0002	0,073 ± 0,002	0,204 ± 0,002	0,02700 ± 0,00002	0,01500 ± 0,00005	0,746 ± 0,003	n.d.
M3	4,86 ± 0,02	0,93 ± 0,03	3,05 ± 0,01	5,9 ± 0,1	0,288 ± 0,003	0,0170 ± 0,0004	0,0720 ± 0,0003	0,203 ± 0,003	0,02800 ± 0,00007	0,0150 ± 0,0002	0,741 ± 0,004	n.d.
M4	9,44 ± 0,06	0,57 ± 0,03	1,969 ± 0,005	4,33 ± 0,07	0,797 ± 0,005	0,0100 ± 0,0004	0,040 ± 0,001	0,0490 ± 0,0003	0,0230 ± 0,0001	0,0120 ± 0,0001	0,6540 ± 0,0002	0,030
M5	9,2 ± 0,1	0,51 ± 0,03	1,937 ± 0,003	4,6 ± 0,1	0,775 ± 0,007	n.d.	0,0240 ± 0,0006	0,04700 ± 0,00007	0,02300 ± 0,00002	0,01200 ± 0,00001	0,6490 ± 0,0002	n.d.
M6	9,433 ± 0,001	0,53 ± 0,02	1,903 ± 0,004	4,651 ± 0,006	0,786 ± 0,004	0,01000 ± 0,00008	0,0240 ± 0,0003	0,0590 ± 0,0008	0,02300 ± 0,00008	0,0120 ± 0,0001	0,653 ± 0,004	n.d.

Muestra	Na	K	Ca	S	Mg	Mn	Fe	Zn	Sr	Ba	Cu	Al
M7	8,0 ± 0,1	2,05 ± 0,07	0,67 ± 0,01	7,9 ± 0,3	0,0910 ± 0,0001	0,0100 ± 0,0002	0,033 ± 0,001	0,0410 ± 0,0007	0,01400 ± 0,00002	0,01100 ± 0,00005	0,401 ± 0,004	n.d.
M8	8,278 ± 0,003	2,07 ± 0,04	0,7090 ± 0,0009	7,55 ± 0,08	0,0890 ± 0,0003	0,0100 ± 0,0004	0,0310 ± 0,0003	0,0450 ± 0,0003	0,01400 ± 0,00003	0,01100 ± 0,00006	0,4130 ± 0,0003	n.d.
M9	8,02 ± 0,05	2,02 ± 0,02	0,0010 ± 0,0004	7,4 ± 0,2	0,0880 ± 0,0005	0,01000 ± 0,00004	0,0330 ± 0,0002	0,035 ± 0,001	0,015	0,011	0,4120 ± 0,0001	n.d.

n.d. no detectado; concentración ± desviación estándar; n=3.

**APÉNDICE II.
CONCENTRACIONES DE COMPUESTOS VOLÁTILES
EN TEQUILA Y MEZCAL**

Concentraciones (mg/l) de compuestos volátiles en tequila y mezcal

Muestra	n-propanol	acetato de etilo	2-metil-propanol	3-metil-butanol	2-metil-butanol
B1	29±1	33 ± 3	38 ± 2	127 ± 6	12 ± 1
B2	28±1	37 ± 2	40 ± 1	128 ± 8	13,7 ± 0,8
B3	28 ± 2	13 ± 3	61 ± 3	167 ± 2	29,0 ± 0,1
B4	27 ± 1	17 ± 2	65 ± 2	167 ± 3	29,2 ± 0,1
B5	29 ± 1	114 ± 7	75 ± 2	225 ± 3	32,1 ± 0,4
B6	26,3 ± 0,5	109 ± 8	77 ± 3	229 ± 4	31,6 ± 0,6
B7	34 ± 4	49 ± 1	75 ± 6	268 ± 4	39,9 ± 0,9
B8	28 ± 3	47 ± 2	66 ± 4	291 ± 5	44 ± 3
B9	26 ± 1	11,4 ± 0,8	42 ± 5	107 ± 10	13 ± 2
B10	n.d.	12,5 ± 0,7	53 ± 7	121 ± 9	15 ± 1
B11	25 ± 1	5,3 ± 0,4	56 ± 3	200 ± 19	28 ± 3
B12	26,7 ± 0,9	5,9 ± 0,7	61 ± 5	229 ± 21	32 ± 1
B13	45 ± 1	18,9 ± 0,1	94 ± 4	184 ± 1	37 ± 3
B14	44,4 ± 0,5	18,8 ± 0,8	88 ± 3	185 ± 3	42 ± 2
B15	42 ± 3	9,8 ± 0,2	57 ± 3	104 ± 4	20 ± 1
B16	45,9 ± 0,9	9,7 ± 0,7	53 ± 1	99 ± 5	17,7 ± 0,4
B17	31,5 ± 0,2	7,2 ± 0,5	52 ± 1	129 ± 2	22 ± 1
B18	31,3 ± 0,4	7,8 ± 0,9	53 ± 3	132 ± 5	23,9 ± 0,9
B19	27 ± 2	4,8 ± 0,4	102 ± 5	163 ± 2	27,9 ± 0,7
B20	24 ± 1	6,96 ± 0,09	102 ± 3	165 ± 8	26,9 ± 0,9
B21	16 ± 1	8,6 ± 0,3	22 ± 1	80 ± 3	6,57 ± 0,05
B22	17,9 ± 0,9	9,7 ± 0,6	23,8 ± 0,6	84 ± 4	6,5 ± 1
B23	36,5 ± 0,5	4,97 ± 0,09	66 ± 8	115 ± 4	20,4 ± 0,4
B24	37 ± 1	4,4 ± 0,1	51 ± 5	109 ± 6	19,9 ± 0,9
G1	20,5 ± 0,5	39,6 ± 0,9	41,2 ± 0,2	99 ± 3	12,9 ± 0,8
G2	19,9 ± 0,7	37 ± 2	40 ± 1	104 ± 5	15 ± 1
G3	27 ± 1	46,7 ± 0,3	42,4 ± 0,7	134 ± 7	16,1 ± 0,7
G4	28,5 ± 0,2	26 ± 1	37 ± 2	126 ± 1	15,3 ± 0,3
G5	47 ± 1	15 ± 1	57 ± 5	94,6 ± 0,7	14 ± 2
G6	38,1 ± 0,9	11 ± 3	50 ± 2	94,7 ± 0,2	17,3 ± 0,9
G7	54 ± 2	19 ± 1	65,9 ± 0,8	108 ± 5	16 ± 1
G8	47,2 ± 0,5	17 ± 2	67 ± 1	108 ± 3	15,6 ± 0,5
G9	62 ± 8	11,6 ± 0,9	59 ± 1	96,8 ± 0,4	11,8 ± 0,8
G10	50 ± 3	10 ± 1	58 ± 3	97 ± 9	10,7 ± 0,5
G11	70 ± 1	17 ± 3	75 ± 6	112 ± 7	15,8 ± 0,3
G12	72 ± 6	13,1 ± 0,5	66,3 ± 0,7	99,8 ± 0,9	11,5 ± 0,2
G13	25,8 ± 0,7	9,8 ± 0,7	44 ± 1	97,2 ± 0,6	10,7 ± 0,2
G14	26,8 ± 0,9	6,9 ± 0,2	44,3 ± 0,5	96,4 ± 0,5	12,1 ± 0,6
G15	32 ± 2	7,9 ± 0,1	47,1 ± 0,8	103 ± 3	11,7 ± 0,1
G16	30 ± 1	11,8 ± 0,6	48,3 ± 0,2	102,5 ± 0,9	12,6 ± 0,6
R1	37,3 ± 0,8	50 ± 4	72 ± 4	205 ± 10	33,9 ± 0,6
R2	38,4 ± 0,5	45 ± 1	66 ± 3	196 ± 5	34,7 ± 0,8

Muestra n-propanol acetato de etilo 2-metil-propanol 3-metil-butanol 2-metil-butanol

R3	85 ± 4	38 ± 1	38 ± 2	163 ± 3	19,2 ± 0,9
R4	80 ± 7	37 ± 1	41 ± 5	159 ± 6	17,9 ± 0,2
R5	56 ± 1	65 ± 3	64 ± 2	234 ± 12	28 ± 2
R6	54 ± 4	63 ± 2	63 ± 2	228 ± 13	26 ± 1
R7	25,7 ± 0,9	49 ± 9	63 ± 6	243 ± 13	34 ± 1
R8	22 ± 3	35 ± 0,3	55 ± 2	268 ± 17	32 ± 1
R9	43 ± 5	43 ± 3	66 ± 6	253 ± 3	39 ± 1
R10	49 ± 2	67 ± 8	90 ± 5	265 ± 8	43,9 ± 0,3
R11	47 ± 2	31,6 ± 0,8	126 ± 3	173 ± 5	36,2 ± 0,3
R12	49,6 ± 0,8	24 ± 1	123 ± 1	180 ± 7	35,8 ± 0,8
R13	62 ± 1	32 ± 2	77 ± 9	121 ± 9	18 ± 3
R14	60,9 ± 0,9	25 ± 5	87 ± 4	134 ± 3	21,9 ± 0,5
R15	48 ± 2	14,7 ± 0,1	53 ± 2	100 ± 6	10,4 ± 0,3
R16	49 ± 4	15 ± 1	51 ± 1	96 ± 2	10,8 ± 0,6
R17	46 ± 2	14,6 ± 0,2	52 ± 1	88 ± 6	10,1 ± 0,2
R18	48 ± 2	15 ± 1	60 ± 3	92 ± 2	11,3 ± 0,8
R19	38,6 ± 0,9	15,4 ± 0,4	61,4 ± 0,8	88 ± 1	11 ± 1
R20	35 ± 1	14,9 ± 0,6	60 ± 1	85 ± 1	10,7 ± 0,4
R21	43 ± 6	16 ± 2	58 ± 1	85 ± 3	11,5 ± 0,5
R22	47 ± 1	15,6 ± 0,5	54 ± 2	81 ± 7	9,6 ± 0,1
R23	36 ± 2	18,1 ± 0,1	32 ± 3	71 ± 2	36 ± 1
R24	32 ± 2	17,4 ± 0,6	28 ± 1	68 ± 2	34 ± 2
R25	30,4 ± 0,6	4,2 ± 0,1	76,4 ± 0,3	143 ± 10	28 ± 2
R26	29,5 ± 0,2	3,7 ± 0,1	74 ± 1	120 ± 8	23 ± 2
R27	27,6 ± 0,3	4,9 ± 0,1	76 ± 3	125 ± 16	22 ± 1
R28	28 ± 1	5,07 ± 0,09	102 ± 5	151 ± 10	24,4 ± 0,9
R29	64 ± 2	6,4 ± 0,5	71 ± 7	133 ± 5	14,8 ± 0,2
R30	61 ± 2	7,08 ± 0,8	88 ± 4	134 ± 1	13,6 ± 0,1
R31	36 ± 1	20,64 ± 0,08	80 ± 4	216 ± 7	26 ± 1
R32	34 ± 2	20,8 ± 0,4	85 ± 1	206 ± 6	28 ± 1
R33	31 ± 1	72 ± 1	80 ± 5	201 ± 2	26 ± 2
R34	29,1 ± 0,5	69 ± 3	74 ± 1	198 ± 8	29 ± 2
R35	26 ± 1	46,3 ± 0,6	63 ± 1	268 ± 6	35 ± 3
R36	25 ± 1	45,5 ± 0,1	62 ± 1	267 ± 11	31 ± 1
A1	28 ± 2	118 ± 15	83 ± 2	264 ± 21	35 ± 2
A2	25 ± 4	110 ± 11	81 ± 2	233 ± 11	31 ± 1
A3	35 ± 7	79 ± 2	76,3 ± 0,4	247 ± 7	33 ± 3
A4	26 ± 1	99 ± 2	75 ± 1	236 ± 3	31 ± 3
A5	71 ± 3	18 ± 1	120 ± 12	211 ± 15	52 ± 4
A6	67 ± 3	21 ± 1	104 ± 6	189 ± 9	45 ± 1
A7	44 ± 2	23 ± 3	102 ± 11	156 ± 11	29 ± 1
A8	43 ± 4	19,3 ± 0,2	93 ± 3	134 ± 8	24 ± 3
A9	49 ± 1	21,3 ± 0,4	116 ± 7	244 ± 12	44 ± 5

Muestra	n-propanol	acetato de etilo	2-metil-propanol	3-metil-butanol	2-metil-butanol
A10	45 ± 3	27 ± 4	131 ± 10	244 ± 7	44,6 ± 0,8
A11	41 ± 2	20 ± 6	130 ± 7	226 ± 12	41 ± 1
A12	51 ± 6	17 ± 2	112 ± 8	218 ± 10	39 ± 2
A13	36 ± 1	14 ± 3	76 ± 3	201 ± 7	26,5 ± 0,5
A14	34 ± 2	18 ± 4	72 ± 1	191 ± 5	25 ± 1
A15	43 ± 8	19 ± 2	70 ± 3	200 ± 7	33 ± 3
A16	33 ± 1	16 ± 4	75 ± 1	201 ± 6	33 ± 1
M1	25,3 ± 0,4	7,65 ± 0,03	25 ± 2	44,3 ± 0,8	0,54 ± 0,04
M2	21,7 ± 0,1	10,34 ± 0,08	29 ± 1	42 ± 1	0,38 ± 0,04
M3	24 ± 1	10,08 ± 0,02	28 ± 2	42 ± 2	0,52 ± 0,2
M4	24,6 ± 0,3	9,31 ± 0,9	26,5 ± 0,9	40 ± 4	0,10 ± 0,09
M5	n.d.	3,1 ± 0,1	11,4 ± 0,4	21 ± 2	n.d.
M6	n.d.	5,6 ± 0,2	12,6 ± 0,2	21 ± 1	n.d.
M7	n.d.	4,99 ± 0,06	12,5 ± 0,1	21 ± 9	n.d.
M8	n.d.	5,19 ± 0,03	12,6 ± 0,7	20 ± 3	n.d.
M9	n.d.	6,86 ± 0,06	15,29 ± 0,03	24 ± 8	n.d.
M10	n.d.	7,19 ± 0,01	13,42 ± 0,03	24 ± 3	n.d.
M11	n.d.	3,96 ± 0,04	12 ± 2	24 ± 4	n.d.
M12	n.d.	2,71 ± 0,04	18 ± 1	25,4 ± 0,9	n.d.

n.d. no detectado; concentración ± desviación estándar; n=3.

APÉNDICE III.
CONCENTRACIONES DE FURFURAL Y 5-HIDROXIMETILFURFURAL
EN TEQUILA Y MEZCAL

Concentraciones (mg/l) de furfural y 5-hidroximetilfurfural en tequila y mezcal

Muestra	Furfural	5-hidroximetilfurfural
B1	1,104 ± 0,003	0,010 ± 0,001
B2	1,10 ± 0,02	0,010 ± 0,004
B3	1,1 ± 0,01	0,012 ± 0,004
B4	2,48 ± 0,01	0,028 ± 0,006
B5	2,47 ± 0,03	0,030 ± 0,005
B6	2,45 ± 0,03	0,039 ± 0,005
B7	2,207 ± 0,004	0,020 ± 0,005
B8	2,201 ± 0,003	0,011 ± 0,005
B9	2,199 ± 0,008	0,020 ± 0,003
B10	0,92 ± 0,09	0,014 ± 0,009
B11	1,2 ± 0,2	0,013 ± 0,003
B12	1,25 ± 0,08	0,010 ± 0,002
B13	3,43 ± 0,01	n.d.
B14	3,45 ± 0,01	n.d.
B15	3,43 ± 0,03	n.d.
B16	5,50 ± 0,01	0,027 ± 0,004
B17	5,50 ± 0,02	0,019 ± 0,002
B18	5,51 ± 0,02	0,024 ± 0,002
B19	3,14 ± 0,01	0,0170 ± 0,006
B20	3,139 ± 0,004	0,024 ± 0,006
B21	3,131 ± 0,007	0,029 ± 0,008
B22	0,33 ± 0,05	0,032 ± 0,004
B23	0,33 ± 0,03	0,031 ± 0,004
B24	0,25 ± 0,02	0,025 ± 0,002
B25	3,111 ± 0,007	0,011 ± 0,001
B26	3,10 ± 0,02	0,012 ± 0,003
B27	3,099 ± 0,009	n.d.
B28	0,655 ± 0,005	0,15 ± 0,02
B29	0,66 ± 0,01	0,19 ± 0,02
B30	0,664 ± 0,003	0,17 ± 0,01
B31	2,47 ± 0,01	n.d.
B32	2,46 ± 0,01	0,181 ± 0,002
B33	2,477 ± 0,009	0,191 ± 0,002
G1	8,79 ± 0,04	0,079 ± 0,004
G2	8,9 ± 0,1	0,07 ± 0,02
G3	8,85 ± 0,02	0,15 ± 0,02
G4	4,74 ± 0,01	1,18 ± 0,02
G5	4,76 ± 0,01	1,13 ± 0,01

Muestra	Furfural	5-hidroximetilfurfural
G6	4,747 ± 0,009	1,165 ± 0,009
G7	0,891 ± 0,004	2,96 ± 0,03
G8	0,899 ± 0,005	2,91 ± 0,03
G9	0,89 ± 0,01	2,96 ± 0,02
G10	3,55 ± 0,02	3,0 ± 0,2
G11	3,51 ± 0,02	3,03 ± 0,01
G12	3,55 ± 0,05	3,46 ± 0,01
R1	11,76 ± 0,07	6,8 ± 0,2
R2	11,8 ± 0,1	6,72 ± 0,09
R3	11,9 ± 0,01	7,1 ± 0,2
R4	6,85 ± 0,04	0,62 ± 0,02
R5	6,84 ± 0,04	0,967 ± 0,009
R6	6,77 ± 0,03	0,79 ± 0,02
R7	2,96 ± 0,02	0,21 ± 0,02
R8	2,93 ± 0,03	0,24 ± 0,02
R9	2,93 ± 0,03	0,26 ± 0,01
R10	2,02 ± 0,01	3,59 ± 0,04
R11	2,05 ± 0,01	3,62 ± 0,02
R12	2,04 ± 0,02	3,64 ± 0,02
R13	2,81 ± 0,01	0,256 ± 0,009
R14	2,82 ± 0,02	0,24 ± 0,05
R15	2,82 ± 0,02	0,33 ± 0,05
R16	3,63 ± 0,01	0,88 ± 0,06
R17	3,65 ± 0,01	0,93 ± 0,05
R18	3,62 ± 0,03	0,80 ± 0,06
R19	4,39 ± 0,03	1,4 ± 0,1
R20	4,36 ± 0,04	1,38 ± 0,09
R21	4,33 ± 0,03	1,15 ± 0,09
R22	0,74 ± 0,05	2,1 ± 0,2
R23	0,65 ± 0,05	2,38 ± 0,09
R24	0,66 ± 0,04	2,1 ± 0,02
R25	1,26 ± 0,01	1,11 ± 0,03
R26	1,27 ± 0,01	1,05 ± 0,03
R27	1,26 ± 0,03	1,10 ± 0,02
R28	3,45 ± 0,01	1,31 ± 0,05
R29	3,45 ± 0,04	1,28 ± 0,04
R30	3,449 ± 0,009	1,26 ± 0,05
R31	3,445 ± 0,007	1,18 ± 0,03
R32	3,444 ± 0,009	1,22 ± 0,01
R33	3,457 ± 0,009	1,12 ± 0,03

Muestra	Furfural	5-hidroximetilfurfural
A1	4,32 ± 0,01	1,25 ± 0,01
A2	4,315 ± 0,009	1,16 ± 0,05
A3	4,305 ± 0,008	1,24 ± 0,05
A4	3,43 ± 0,01	0,89 ± 0,09
A5	3,42 ± 0,02	1,10 ± 0,08
A6	3,43 ± 0,01	0,9 ± 0,1
A7	5,64 ± 0,03	0,5 ± 0,1
A8	5,59 ± 0,01	0,56 ± 0,09
A9	5,6 ± 0,1	0,92 ± 0,09
A10	1,1 ± 0,1	0,94 ± 0,05
A11	0,9 ± 0,1	1,03 ± 0,03
A12	0,85 ± 0,09	1,01 ± 0,03
M1	4,79 ± 0,01	0,20 ± 0,05
M2	4,80 ± 0,02	0,12 ± 0,04
M3	4,78 ± 0,02	0,12 ± 0,06
M4	0,90 ± 0,01	0,16 ± 0,05
M5	0,93 ± 0,03	0,16 ± 0,01
M6	0,899 ± 0,009	0,175 ± 0,007
M7	1,14 ± 0,05	0,459 ± 0,009
M8	1,14 ± 0,05	0,46 ± 0,01
M9	1,06 ± 0,04	0,43 ± 0,02

n.d. no detectado; concentración ± desviación estándar; n=3.

**APÉNDICE IV.
CONCENTRACIONES DE EXTRACTO SECO Y CENIZA
EN TEQUILA Y MEZCAL**

Concentraciones (g/l) de extracto seco y ceniza en tequila y mezcal

Muestra	Extracto seco	Ceniza
B1	0,055 ± 0,002	0,03 ± 0,01
B2	0,054 ± 0,003	0,013 ± 0,009
B3	0,058 ± 0,003	0,008 ± 0,004
B4	0,035 ± 0,001	0,037 ± 0,009
B5	0,034 ± 0,005	0,014 ± 0,004
B6	0,030 ± 0,006	0,014 ± 0,005
B7	0,032 ± 0,009	0,015 ± 0,006
B8	0,030 ± 0,003	0,007 ± 0,004
B9	0,021 ± 0,004	0,008 ± 0,005
B10	0,134 ± 0,008	0,122 ± 0,009
B11	0,121 ± 0,002	0,09 ± 0,02
B12	0,191 ± 0,003	0,19 ± 0,01
B13	0,011 ± 0,006	n.d.
B14	n.d.	n.d.
B15	0,010 ± 0,004	0,002 ± 0,001
B16	0,049 ± 0,004	0,05 ± 0,02
B17	0,047 ± 0,006	0,052 ± 0,009
B18	0,041 ± 0,003	0,010 ± 0,009
B19	0,038 ± 0,006	0,033 ± 0,009
B20	0,033 ± 0,007	0,029 ± 0,008
B21	0,027 ± 0,007	0,016 ± 0,008
B22	0,06 ± 0,02	0,046 ± 0,004
B23	0,07 ± 0,01	0,013 ± 0,007
B24	0,10 ± 0,02	0,080 ± 0,008
B25	0,055 ± 0,007	0,04 ± 0,01
B26	0,045 ± 0,008	0,05 ± 0,02
B27	0,058 ± 0,006	0,039 ± 0,009
B28	0,25 ± 0,02	0,07 ± 0,01
B29	0,25 ± 0,03	0,08 ± 0,02
B30	0,23 ± 0,03	0,05 ± 0,01
B31	0,083 ± 0,001	0,063 ± 0,009
B32	0,083 ± 0,002	0,05 ± 0,01
B33	0,085 ± 0,001	0,040 ± 0,009
G1	0,079 ± 0,07	0,03 ± 0,01
G2	0,20 ± 0,06	0,044 ± 0,009
G3	0,082 ± 0,009	n.d.
G4	0,60 ± 0,06	0,026 ± 0,005
G5	0,52 ± 0,05	0,022 ± 0,003
G6	0,49 ± 0,04	0,032 ± 0,003

Muestra	Extracto seco	Ceniza
G7	0,217 ± 0,002	0,056 ± 0,003
G8	0,215 ± 0,004	0,052 ± 0,006
G9	0,22 ± 0,01	0,058 ± 0,005
G10	0,747 ± 0,004	0,156 ± 0,009
G11	0,744 ± 0,002	0,15 ± 0,02
G12	0,740 ± 0,004	0,18 ± 0,02
R1	0,374 ± 0,005	0,006 ± 0,001
R2	0,376 ± 0,007	0,002 ± 0,001
R3	0,367 ± 0,006	0,007 ± 0,002
R4	0,26 ± 0,05	0,018 ± 0,004
R5	0,30 ± 0,06	0,026 ± 0,004
R6	0,38 ± 0,06	0,022 ± 0,003
R7	0,359 ± 0,009	0,016 ± 0,006
R8	0,362 ± 0,006	0,028 ± 0,006
R9	0,345 ± 0,005	0,018 ± 0,003
R10	0,58 ± 0,01	0,036 ± 0,009
R11	0,17 ± 0,02	0,020 ± 0,007
R12	0,17 ± 0,02	0,012 ± 0,009
R13	0,138 ± 0,005	0,004 ± 0,003
R14	0,146 ± 0,005	0,012 ± 0,004
R15	0,138 ± 0,004	0,010 ± 0,004
R16	1,73 ± 0,02	0,034 ± 0,007
R17	1,73 ± 0,01	0,020 ± 0,006
R18	1,76 ± 0,01	0,026 ± 0,007
R19	0,216 ± 0,003	0,084 ± 0,006
R20	0,212 ± 0,004	0,074 ± 0,007
R21	0,217 ± 0,004	0,072 ± 0,006
R22	3,52 ± 0,01	0,08 ± 0,02
R23	3,71 ± 0,02	0,08 ± 0,01
R24	3,454 ± 0,009	0,050 ± 0,009
R25	0,597 ± 0,005	0,14 ± 0,01
R26	0,607 ± 0,006	0,16 ± 0,01
R27	0,601 ± 0,006	0,17 ± 0,02
R28	0,155 ± 0,006	0,052 ± 0,003
R29	0,159 ± 0,006	0,054 ± 0,005
R30	0,166 ± 0,004	0,058 ± 0,003
R31	0,16 ± 0,07	0,056 ± 0,007
R32	0,304 ± 0,009	0,062 ± 0,009
R33	0,16 ± 0,06	0,048 ± 0,009
A1	0,478 ± 0,001	0,048 ± 0,002

Muestra	Extracto seco	Ceniza
A2	0,504 ± 0,008	0,050 ± 0,02
A3	0,486 ± 0,006	0,052 ± 0,03
A4	0,293 ± 0,004	0,056 ± 0,007
A5	0,296 ± 0,007	0,062 ± 0,005
A6	0,307 ± 0,007	0,072 ± 0,004
A7	0,312 ± 0,003	0,026 ± 0,001
A8	0,310 ± 0,003	0,0280 ± 0,003
A9	0,307 ± 0,004	0,028 ± 0,05
A10	0,149 ± 0,006	0,034 ± 0,008
A11	0,160 ± 0,005	0,048 ± 0,008
A12	0,158 ± 0,005	0,046 ± 0,009
M1	0,16 ± 0,01	0,060 ± 0,009
M2	0,15 ± 0,01	0,05 ± 0,01
M3	0,17 ± 0,02	0,072 ± 0,009
M4	0,15 ± 0,02	0,060 ± 0,004
M5	0,144 ± 0,009	0,052 ± 0,005
M6	0,13 ± 0,01	0,048 ± 0,005
M7	0,199 ± 0,009	0,094 ± 0,003
M8	0,209 ± 0,008	0,092 ± 0,003
M9	0,195 ± 0,009	0,088 ± 0,004

n.d. no detectado; concentración ± desviación estándar; n=3.