



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

**CARACTERIZACIÓN ANALÍTICA DE
AGUARDIENTES ANISADOS**

TESIS DOCTORAL

JOSÉ MARCOS JURADO JURADO
Sevilla, 2004

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento:

- A los doctores D. Fernando de Pablos Pons y Dña. M^a Jesús Martín Valero, sin cuya dirección, no hubiera sido posible la realización de este trabajo.
- Al Dr. D. Alfonso Guiraúm Pérez, Director del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Sevilla, por haberme dado la oportunidad de realizar la mayor parte de este trabajo en dicho departamento.
- A la Dra. Dña. Pilar Bermejo Barrera, Directora del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Santiago de Compostela, por haber puesto a mi servicio las instalaciones de este departamento.
- Al Dr. D. Fernando de Pablos Pons, por su buena disposición, su incondicional ayuda y su comprensión en mis comienzos.
- A la Dra. Dña. M^a Jesús Martín Valero, por haberme animado en todo momento y hacerme ver las cosas un poco más fáciles.
- Al Dr. D. Antonio Gustavo González González, por sus enseñanzas, consejos y su agradable compañía.
- Al Dr. D. Antonio Moreda Piñeiro, por sus enseñanzas en el campo de las técnicas espectroscópicas y la atención que siempre ha mostrado.
- A la Universidad de Sevilla y La Fundación El Monte, por la beca F.P.I. disfrutada.
- A la empresa Los Alcores de Carmona S. L., en especial a D. José Antonio Rodríguez, por permitirme visitar sus instalaciones, su atención y explicaciones.
- Al personal de administración y servicios del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Sevilla, Sofía, Joaquín y Gustavo, por haber estado siempre dispuestos a prestarme su ayuda.

- A mi gran familia, sobre todo a mis padres, por haberme escuchado y apoyado en todo momento. Y a mi hermana Ana y mis sobrinas, Raquel y Anita, que son las que me han acompañado estos últimos años.
- A Ángela, por estar siempre conmigo y ayudarme desde el principio.
- A mis amigos, de Villamartín y de Sevilla, por entender mis ausencias y simplemente por serlo.
- A Raúl, por su paciente escucha y ánimos.
- A Alfonso, Felix y Joaquín, por esos desayunos que hacen que el día comience con buen pie.
- A Gustavo Peñas, por sus enseñanzas en mis comienzos con el ICP y por las charlas de media tarde, que siempre amenizan el trabajo de un doctorando.
- A los compañeros y personal docente del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Sevilla, por los buenos momentos y por hacer mi trabajo más agradable.
- A los integrantes del Grupo de Elementos Traza, Espectroscopía y Especiación de la Universidad de Santiago de Compostela, por haberme atendido y ayudado durante mi estancia.
- A todos los que encontré en mi camino y crearon las circunstancias que hasta aquí me han traído.

INDICE

Abreviaturas

Objetivos

| | |
|--|----|
| I. Introducción | 1 |
| I.1. Introducción histórica | 1 |
| I.1.1. Breve historia de los aguardientes y licores | 1 |
| I.1.2. Los anisados | 3 |
| I.2. Definición, elaboración y tipos de anises | 8 |
| I.2.1. Definición y elaboración de anís | 8 |
| I.2.2. Tipos de anises | 9 |
| I.2.3. Otras definiciones | 10 |
| I.3. Parámetros de calidad en bebidas anisadas | 12 |
| I.4. Composición mineral y orgánica de las bebidas alcohólicas | 12 |
| I.4.1. Determinación de metales en bebidas alcohólicas | 16 |
| I.4.2. Determinación de compuestos orgánicos en bebidas alcohólicas | 18 |
| I.4.2.1. Cromatografía Líquida de Alta Resolución | 18 |
| I.4.2.2. Cromatografía de gases | 21 |
| I.4.3. Otras técnicas utilizadas en el análisis de la composición de bebidas alcohólicas | 25 |
| I.5. Aplicaciones de los métodos de reconocimiento de patrones en la caracterización de alimentos | 26 |

| | |
|---|-----|
| I.6. Bibliografía | 35 |
| II. Quimiometría | 59 |
| II.1. Análisis de la varianza | 59 |
| II.1.1. ANOVA de dos factores anidados | 59 |
| II.1.2. Prueba de la genuina diferencia significativa de Tukey | 62 |
| II.2. Detección de valores extremos | 64 |
| II.2.1. Valores extremos: definición y tipos | 64 |
| II.2.2. Detección de outliers dispersivos: criterio de Cochran | 65 |
| II.2.3. Detección de outliers centrales: ensayos de Grubbs | 66 |
| II.3. Reconocimiento de patrones | 68 |
| II.3.1. Introducción a los métodos de reconocimiento de patrones | 68 |
| II.3.1.1. Conceptos básicos en el Reconocimiento de Patrones | 70 |
| II.3.1.2. Preprocesado de los datos | 72 |
| II.3.2. Visualización de datos: Análisis en Componentes Principales | 74 |
| II.3.3. Reconocimiento de Patrones no supervisado: Análisis Cluster | 80 |
| II.3.4. Reconocimiento de Patrones supervisado | 85 |
| II.3.4.1. Análisis Discriminante Lineal | 87 |
| II.3.4.2. SIMCA | 93 |
| II.4. Diseño de experimentos | 94 |
| II.4.1. Diseño factorial a dos niveles | 96 |
| II.4.2. Experimentos de bloque y diseño fraccional | 98 |
| II.5. Bibliografía | 106 |

| | |
|---|-----|
| III. Parte experimental | 113 |
| III.1. Material y reactivos | 113 |
| III.1.1. Aparatos | 113 |
| III.1.2. Reactivos y disoluciones | 114 |
| III.1.2.1. Reactivos | 114 |
| III.1.2.2. Patrones | 115 |
| III.1.3. Muestras | 116 |
| III.1.3.1 Muestras analizadas mediante ICP-AES | 116 |
| III.1.3.2. Muestras analizadas mediante ET-AAS | 117 |
| III.1.3.3. Muestras analizadas mediante HPLC-DAD | 117 |
| III.2. Procedimientos | 118 |
| III.2.1. Determinación de B, Ca, Fe, Mg, Na, Si y Zn mediante ICP-AES | 118 |
| III.2.1.1. Métodos de mineralización por vía seca | 118 |
| III.2.1.2. Mineralización húmeda | 119 |
| III.2.2. Determinación de cobre y plomo mediante ET-AAS | 121 |
| III.2.3. Determinación de anetol mediante HPLC-DAD | 124 |
| III.3. Bibliografía | 125 |
| IV. Resultados y discusión | 129 |
| IV.1. Determinación de B, Ca, Fe, Mg, Na, Si y Zn por ICP-AES | 129 |
| IV.1.1. Comparación de los métodos de mineralización | 129 |
| IV.1.2. Efecto matriz | 147 |
| IV.1.3. Parámetros de calidad del método | 153 |
| IV.1.3.1. Exactitud | 153 |
| IV.1.3.2. Precisión | 153 |

| | |
|---|------------|
| IV.1.3.3. Calibración, linealidad y límites de detección y cuantificación | 154 |
| IV.1.4. Determinación de Zn, B, Fe, Mg, Ca, Na y Si en anisados | 157 |
| IV.2. Determinación de cobre y plomo mediante ETAAS | 162 |
| IV.2.1. Determinación de cobre | 162 |
| IV.2.1.1. Mecanismo de atomización del cobre | 162 |
| IV.2.1.2. Diseño y optimización del método | 163 |
| IV.2.1.2.1. Programa de temperatura | 163 |
| IV.2.1.2.2. Modificador de matriz | 168 |
| IV.2.1.3. Efecto matriz | 169 |
| IV.2.1.4. Parámetros de calidad del método | 171 |
| IV.2.1.4.1. Exactitud | 171 |
| IV.2.1.4.2. Precisión | 175 |
| IV.2.1.4.3. Calibración, linealidad y sensibilidad | 175 |
| IV.2.1.5. Determinación de cobre en anisados | 177 |
| IV.2.2. Determinación de plomo | 178 |
| IV.2.2.1. Mecanismo de atomización del plomo | 178 |
| IV.2.2.2. Diseño y optimización del método | 178 |
| IV.2.2.2.1. Programa de temperatura | 178 |
| IV.2.2.2.2. Modificador de matriz | 182 |
| IV.2.2.3. Efecto matriz | 183 |
| IV.2.2.4. Parámetros de calidad del método | 184 |
| IV.2.2.4.1. Exactitud | 184 |
| IV.2.2.4.2. Precisión | 187 |
| IV.2.2.4.3. Calibración, linealidad y sensibilidad | 187 |
| IV.2.2.5. Determinación de plomo en anisados | 188 |
| IV.3. Determinación de anetol en anisados mediante HPLC | 189 |
| IV.3.1. Diseño del método | 189 |

| | |
|--|------------|
| IV.3.1.1. Asimetría y factor de cola | 193 |
| IV.3.2. Efecto matriz | 194 |
| IV.3.3. Parámetros de calidad del método | 195 |
| IV.3.3.1. Exactitud | 195 |
| IV.3.3.2. Precisión | 197 |
| IV.3.3.3. Robustez | 197 |
| IV.3.3.4. Calibración, linealidad y límites de detección y cuantificación | 200 |
| IV.3.4. Determinación de anetol en anisados | 202 |
| IV.4. Diferenciación de denominaciones de origen de anisados según su perfil metálico | 204 |
| IV.4.1. Visualización de los datos mediante PCA | 209 |
| IV.4.2. Análisis cluster | 211 |
| IV.4.3. Análisis discriminante lineal | 213 |
| IV.4.4. Modelado suave independiente por analogía de clases | 214 |
| IV.5. Bibliografía | 217 |
| V. Resumen y conclusiones | 223 |

Abreviaturas

| | |
|--------|---|
| AAS | Espectroscopía de Absorción Atómica (Atomic Absorption Spectrometry) |
| ANN | Redes Neuronales Artificiales (Artificial Neural Networks) |
| ANOVA | Análisis de la varianza (Analysis of Variance) |
| CA | Análisis Cluster (Cluster Analysis) |
| ET-AAS | Espectroscopía de Absorción Atómica con atomización Electrotérmica (Electrothermal) |
| FID | Detector de Ionización de Llama (Flame Ionisation Detector) |
| GC | Cromatografía de Gases (Gas Chromatography) |
| HG-AAS | Espectroscopía de Absorción Atómica con Generación de Hidruros (Hydride Generation) |
| HPLC | Cromatografía Líquida de Alta Resolución (High Performance Liquid Chromatography) |
| ICP-MS | Espectroscopía de plasma inducido acoplado-masas (Inductively coupled plasma mass spectroscopy) |
| KNN | Método de los K-vecinos más próximos (K-nearest neighbours) |
| LDA | Análisis Discriminante Lineal (Linear Discriminant Analysis) |
| PCA | Análisis de Componentes Principales (Principal Component Analysis) |
| PLS | Mínimos Cuadrados Parciales (Partial Least Squares) |
| PR | Reconocimiento de Patrones (Pattern Recognition) |
| SIMCA | Modelado Suave Independiente por Analogía de Clases (Soft Independent Modelling of Class Analogy) |
| SPME | Microextracción en fase sólida (Solid Phase Microextraction) |

Objetivos

Dado que, el método recomendado en la legislación, para la determinación de metales en anisados, presenta graves inconvenientes y que no existen alternativas eficaces en la bibliografía, uno de los objetivos del presente trabajo es proponer un método para la mineralización y posterior determinación de metales en bebidas alcohólicas anisadas. Se considerarán elementos tales como zinc, boro, cobre, magnesio, hierro, calcio, plomo, sodio y silicio.

Debido a que los métodos de digestión son una etapa crítica en el método analítico, pues son una fuente potencial de errores, se ha hecho especial hincapié en el estudio de esta etapa del análisis. En algunos casos y con el fin de minimizar la influencia del tratamiento de la muestra se intentará realizar un análisis directo sin tratamiento previo.

La metodología propuesta por la legislación para la determinación de anetol en bebidas anisadas considera una etapa previa de destilación y la determinación de este componente mediante cromatografía de gases. La etapa de destilación hace que aumente el tiempo de análisis. El tercer objetivo de este trabajo es desarrollar un método de determinación de anetol en muestras de anís en el que se prescindan de esta etapa de destilación, es decir, desarrollar y poner a punto un método de determinación directa de anetol en este tipo de bebidas.

Hasta la fecha, no se han aplicado técnicas de análisis multivariante y de reconocimiento de patrones para la caracterización de anisados. Por ello, otro objetivo que se plantea en el presente trabajo es utilizar el contenido de zinc, boro magnesio, hierro, calcio, sodio y silicio como descriptores químicos que permitan la diferenciación de muestras de anís con denominación de origen. En primer lugar se evaluará la capacidad discriminatoria de los parámetros determinados con este fin. Posteriormente se tratará de establecer, mediante técnicas de reconocimiento de patrones, las reglas de clasificación que discriminen las muestras.

I. Introducción

I.1. Introducción histórica

I.1.1. Breve historia de los aguardientes y licores

La historia de aguardientes y licores va emparejada a la del utensilio que los hace posibles, el alambique. Fueron los egipcios los que dieron los primeros pasos en el arte de la destilación. El mercurio se obtenía al calentar cinabrio sobre un plato de hierro, colocado dentro de una olla cubierta por un puchero o *ambix* en el que condensaban los vapores de mercurio. Posteriormente se usó el término para el aparato completo de destilación, que los árabes perfeccionaron y denominaron *al anbiq* [1, 2]. Fueron ellos los primeros en destilar vino para obtener alcohol, pero, debido a los preceptos religiosos del Corán, solo usaban la destilación y obtención de alcohol para la producción de perfumes y elixires. Así, Averroes (1126-1198) cita el procedimiento para obtener agua de rosas, perfume de jazmín o nardo, y otros ungüentos medicinales, pero nunca menciona la obtención de alcohol como bebida [1].

Las primeras descripciones encontradas en Europa, mencionando el alcohol obtenido mediante destilación, datan del año 1100. Se encuentran en manuscritos del gran centro médico que fue Salerno. Cien años después, el alcohol, obtenido por la destilación del vino, era ya una sustancia bien conocida [2]. Arnau de Vilanova (1238-1313) y Ramón Llull (1232-1316) pueden considerarse como los padres de los aguardientes que hoy tomamos, por haber recibido de los árabes los secretos de la alquitara y la destilación, y perfeccionar sus técnicas [1]. El valenciano Arnau de Vilanova, notable médico, alquimista, teólogo y escritor, da buena fe de su labor de alquitero en sus obras. Por ejemplo, en "*Elixir de vinorum mirabilis especierum et artificiatum vinum*" se encuentran numerosas referencias al *elixir de la vida eterna*, que suponía era el alcohol, extraído por destilación del vino o sus heces. Tras su muerte, su discípulo, el mallorquín Llull, continuará con esta pasión por el aguardiente, considerando al alcohol de vino como una de las medicinas más eficaces [1, 3].

Durante la Edad Media, el alcohol concentrado solía prepararse en dos etapas; la primera destilación producía un alcohol de 60%, al que se le daba el nombre de *aqua ardens*, o aguardiente, una nueva destilación subía la concentración al 96%, el producto

final se conocía por el nombre de *aqua vitae*, o agua de la vida. En 1320, se producía alcohol en gran escala en Módena (Italia) y su conocimiento se extendió a Francia y Alemania [1].

Monasterios y farmacias empleaban este alcohol para preparar cocciones de hierbas, que al principio se vendían como medicinas. La peste negra, que devastó la población de Europa, fue una de las causas de la difusión producida en el consumo de alcohol fuerte. Después de ese holocausto, la costumbre de beber brandy, licores y aguardiente o ginebra (de 33 a 45% de alcohol, o más), quedó firmemente arraigada como costumbre social. Hasta entonces los licores que se bebían contenían pequeños porcentajes de alcohol, tales como vinos y cervezas (7 a 15% en volumen) [1]. El auge de las preparaciones médicas y farmacéuticas del alcohol, influyeron en la popularización del aguardiente. El problema era que los alcoholes eran toscos, rudos y de mal sabor, lo que se intentó solucionar agregándoles miel, azúcar, limón, naranja, flores de azahar, pétalos de rosa, granos de anís, etc. [1, 3].

A finales del siglo XVIII, Edouard Adam inventa un revolucionario sistema para rectificar alcoholes, basado en una segunda destilación de los mismos, que es un anticipo de las modernas columnas de destilación. Consistía en un sistema de vasos escalonados llenos de vino, calentando el primer vaso, de modo que los vapores de éste hicieran lo propio con el segundo, y así sucesivamente. Cuando se agotaba el líquido del primer vaso, se bajaba el segundo y se volvía a colocar el primero en último lugar, lleno de vino. Pero, aunque los alcoholes así obtenidos eran más puros, su sabor y aroma habían desaparecido prácticamente, lo que hizo volver a recurrir a plantas, frutas y especias para hacerlos más agradables. Gracias a la fertilidad de los territorios americanos, el azúcar comenzó a abundar, con lo que fue posible edulcorar los alcoholes de forma más económica, pues hasta entonces se había hecho, principalmente, con miel. Así, se incremento notablemente la producción y demanda de licores. El procedimiento de destilación de Adam es modificado en varias ocasiones. En 1830, el irlandés Coffey, perfecciona este alambique continuo, siendo hoy el más usado en las destilerías de todo el mundo, por su gran rendimiento [1, 3].

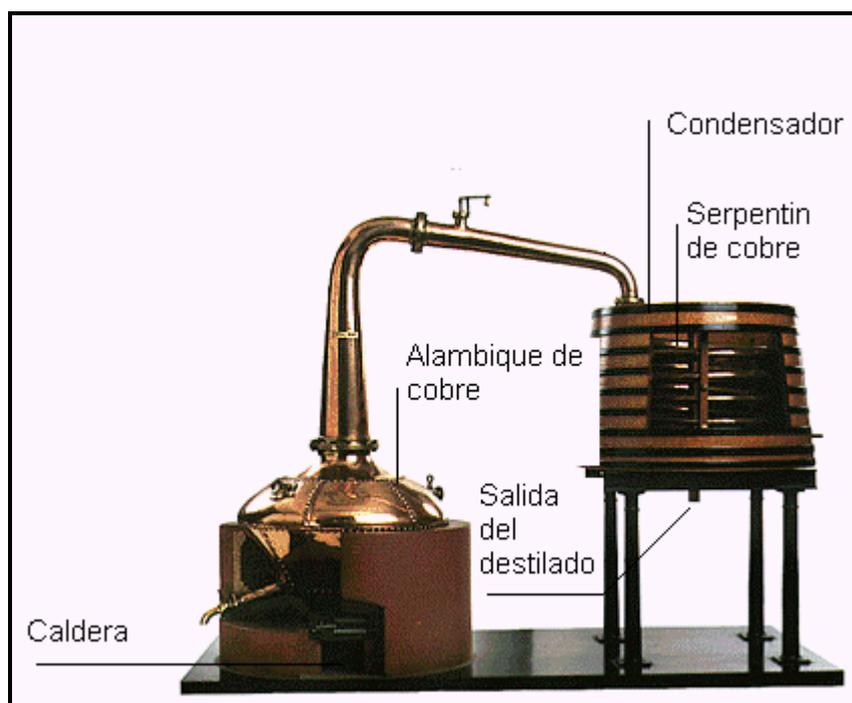


Figura I.1. Sistema de destilación clásico.

En la evolución del alambique podemos encontrar otra modalidad derivada del aparato perfeccionado por los árabes y que ha permanecido prácticamente invariable hasta nuestros días. Es el alambique pot, que permite obtener los mejores licores y aguardientes, pero en un proceso lento y delicado, donde un fallo en la destilación provoca la obtención de flemas y alcohol metílico, que los hacen no aptos para el consumo. El líquido a destilar se coloca en una caldera, donde se calienta, los vapores desprendidos ascienden a un capitel y se enfrían y condensan en un serpentín, saliendo finalmente en forma de líquido. En este proceso se hace necesaria una segunda destilación, para eliminar las flemas [1].

I.1.2. Los anisados

Ya se ha mencionado la gran fama del espíritu del vino, el aguardiente, en el ámbito farmacológico y terapéutico. La semilla de anís era considerada, por egipcios, griegos y romanos, un remedio eficaz contra afecciones gastrointestinales. Son conocidos sus usos como carminativo, expectorante, digestivo, antiespasmódico e insecticida. Celso (s. I d. C.) considera al anís como una buena panacea contra

envenenamientos, dolores de útero y afecciones de riñón, y se atribuye a Galeno (129-199) la sentencia "*anisi semen maxime utile est*". Ya en la época del Emperador Carlomagno se creía que el anís era útil "*por fare avoir à feme lait y as home esperme*". Con todo esto, la unión de anís y alcohol no podía tardar en producirse [1].

El nacimiento del anís no es del todo claro. Unos lo sitúan en Provenza y Aquitania, otros en tiempos de Abderramán III, gran aficionado a los alambiques y convencido de las virtudes del anís. Pero lo que parece más probable es que fueran los holandeses, que tenían la exclusividad en el comercio de la badiana (anís estrellado o de China) y eran grandes maestros en la destilación del vino, los que extendieron el gusto por este tipo de aguardiente.

En Francia, en tiempos de Luis XVI, eran muy populares las bebidas aromatizadas con anís, considerándose en los siglos XVII y XVIII una bebida de la aristocracia. En el año 1700, una mujer, Marie Brizard, fundó la primera empresa francesa de anisette. Este anisado, cuya base de elaboración era anís verde, canela, corteza de nuez moscada, macerado en alcohol y endulzado con azúcar de caña, es el denominado anisette de Bourdeaux. El anís francés es una bebida suave, entre 25 y 30°, que se consume después de las comidas con fines digestivos. Pero existen otros anisados más secos, que se toman generalmente diluidos en agua, como son Pernod, Ricard, etc. No obstante, estos anisados contienen extractos naturales de palo de regaliz, y no son considerados como anises, sino que se denominan pastis [1, 3, 4].

En el mercado español existe el mayor número de variedades de anís y marcas de anisados. En 1885, Pablo Esparza crea en Villalba una de las marcas más antiguas y míticas, el *Anís Esparza*, hoy denominado *Anís de las Cadenas*. En 1895, Francisco Serrano López-Brea comienza la elaboración del *Anís de la Asturiana*. A finales del XIX, Vicente Bosch, comienza a producir *Anís del Mono*, que llegó a ser el de mayor fama y notoriedad en esta época. Bosch tuvo tres ideas innovadoras. La primera fue colocar en la etiqueta un mono, considerando el prestigio de los anisados alicantinos de Monóvar, el pueblo en el que los destiladores se habían salvado de los efectos del cólera. Por asociación a las virtudes del anís alicantino, la gente pedía simplemente un *mono*, ¡qué mejor publicidad para un producto! La segunda gran idea vino al observar la cantidad de anises apoyados en figuras de animales que llegaban al mercado. En 1897 convoca un concurso de carteles publicitarios, que gana una obra modernista de Ramón

Casas (Figura I.2). Por último introduce el uso de la botella diamantina, hoy día el envase por excelencia para el anís [1].



Figura I.2. Anís del mono: Con este cartel de estilo modernista, Ramón Casas obtuvo el primer premio del concurso convocado por el empresario Vicente Bosch para promocionar su conocida marca de anís. En la actualidad se conserva en el Museu d'Art Modern de Barcelona.

El reglamento europeo por el que se establecen las normas generales relativas a la definición, designación y presentación de las bebidas espirituosas [4], considera varias denominaciones de origen para bebidas espirituosas anisadas. Las denominaciones contempladas por la Unión Europea son, en España, Cazalla, Chinchón, Rute y Ojén, y en Portugal, Évora anisada.

La madrileña villa de Chinchón produce anises muy demandados, sobre todo los más secos. El anís de Chinchón cuenta con una tradición de elaboración que se remonta al siglo XVII, cuando los campos de Chinchón se convierten en grandes extensiones de viñedos y se cultivan importantes superficies de matalauva. Los cosecheros, además de

producir y elaborar vinos, obtenían orujos, que macerados con granos de anís verde y destilados en alquitara daban lugar al aguardiente anisado de Chinchón.

La zona de elaboración y embotellado de los anises amparados por la denominación geográfica *Chinchón* está constituida por el término municipal de Chinchón (Madrid). La legislación vigente en España denomina *Chinchón* a la bebida espirituosa anisada, azucarada o no, elaborada a partir de un destilado, de macerados de anís verde en mezcla hidroalcohólica de alcoholes naturales de origen agrícola, en alambiques de cobre [5], con lo que tienen la denominación *Destilado*, según la normativa europea sobre bebidas espirituosas [4]. Como ya veremos, la legislación vigente define el anís extraseco como aquel que tiene una graduación alcohólica superior a 50° e inferior o igual a 55° [6]. Chinchón, debido a la alta calidad de sus productos, posee la autorización para destilar anises entre 70-74°, denominado Chinchón seco especial [1, 5].

La bebida espirituosa anisada «Chinchón» se obtiene destilando en alambiques de cobre el anís verde, en presencia de alcohol natural, de origen agrícola, y agua. Previo al proceso de destilación, se macera durante doce o catorce horas el grano de anís en una solución alcohólica de grado medio. A continuación se inicia la destilación, introduciendo vapor de agua en una camisa de doble fondo del alambique, con el objeto de que no entre en contacto directo con la masa a destilar. Se realiza un fraccionamiento del destilado en tres partes, que atendiendo al orden, se denominan cabezas, centros y colas. De estas fracciones, la del centro, que es la de mayor volumen, de olor y sabor agradable y limpio, es la que se utiliza para la elaboración de anisados, denominándose destilado de anís o alcoholato de anís. Este destilado alcohólico de anís, obtenido por destilación simple, lleva los aceites esenciales extraídos y destilados de la matalauva y constituye la base para la elaboración de los distintos tipos de «Chinchón». El alcoholato de anís, de una graduación alcohólica aproximada del 74-79%, mezclado con jarabe simple de sacarosa, agua desmineralizada y azúcar blanquilla de primera calidad, da lugar a los productos dulces, y mezclado con agua desmineralizada a los secos [5].

Entre los anisados producidos en Andalucía, han sido los de Ojén los que peor suerte han corrido, pues los anisados de esta localidad malagueña han desaparecido completamente del mercado. Más suerte han tenido Cazalla (Sevilla) y Rute (Córdoba), que siguen elaborando sus anises por el sistema de doble destilación [1, 3].

El Consejo Regulador de la Denominación de Origen *Cazalla* se remonta al año 1952 [7]. *Cazalla* sigue produciendo su anís, pero en escala muy reducida, comparado con su gran difusión en los años veinte, cuando fue promocionado en la Exposición Iberoamericana de Sevilla, en el año 1929 [1].

En Rute, los hijos de Rafael Reyes, continúan con la elaboración del *Anís Machaquito extraseco*, producto obtenido de la doble destilación, en alambiques de cobre, de alcohol, agua desmineralizada y descalcificada, azúcar, granos de anís verde, y Anís Machaquito dulce, producto elaborado en frío [1, 3]. La historia del Anís Machaquito se remonta al año 1846, cuando D. Rafael Reyes Rodríguez, maestro destilador, empezó a elaborar este anís y venderlo, como en aquellos tiempos se hacía, en pueblos y cortijos. Era tal la calidad de su producto que muy pronto la demanda aumentó enormemente, y lo obligó a plantearse la ampliación y reestructuración de su empresa, así nacieron, en 1876, las marcas *Anís Venus* y *Anís Nueva España*. Un año que marca época es 1903, cuando un torero cordobés, D. Rafael González Madrid (1880-1955), de sobrenombre "Machaquito", triunfa en los ruedos de todo el mundo. Este torero cede su sobrenombre y su imagen a D. Rafael Reyes Rodríguez, dando lugar al conocido *Anís Machaquito* [8].

La empresa Destilerías de Rute, fundada en 1860, toma la imagen y el alias de otro torero, coetáneo de Machaquito, para una de sus marcas de anís. Así, en las etiquetas de *Anís Bombita*, podemos ver la figura del sevillano Ricardo Torres Reina (1879-1936) [8].

En otros países mediterráneos se preparan bebidas anisadas, como son el anís escarchado en Portugal, el sambuca italiano, el ouzo y el mastika en Grecia y el raki turco. En Iberoamérica también se producen aguardientes de anís, siendo bastante conocidos los de Colombia, Costa Rica, Argentina y México [1, 3].

I.2. Definición, elaboración y tipos de anises

I.2.1. Definición y elaboración de anís

Bebida espirituosa anisada es aquella obtenida por aromatización de alcohol etílico de origen agrícola, normalmente orujos de uva o vino, con extractos naturales de anís verde o matalauva (*Pimpinella anisum*), de anís estrellado o badiana (*Illicium verum*), de hinojo (*Foeniculum vulgare*) o de cualquier otra planta que contenga el mismo constituyente aromático principal. Debe emplearse agua desmineralizada y azúcar, en el caso que proceda, de cuya pureza dependerá la calidad del anís. Para que la bebida espirituosa anisada pueda denominarse anís, su aroma característico deberá provenir exclusivamente del anís verde, estrellado y del hinojo, o mezcla de estos [3, 4].

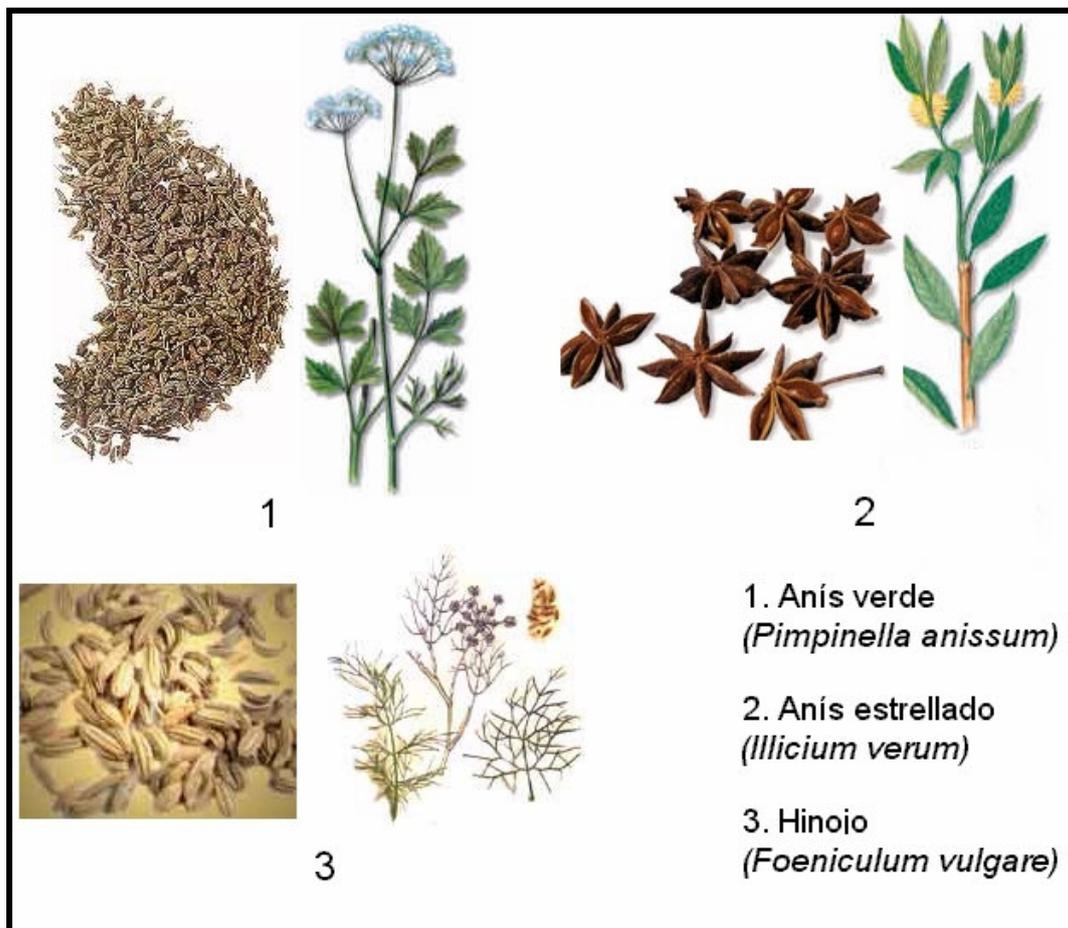


Figura I.3. Plantas utilizadas para la elaboración de bebidas alcohólicas anisadas.

Dicha aromatización puede llevarse a cabo por maceración y/o destilación, redestilación del alcohol mezclado con las semillas u otras partes de las plantas mencionadas anteriormente, adición de extractos destilados naturales de plantas anisadas o combinación de estos tres métodos. Podrán utilizarse como complemento otros extractos vegetales naturales o semillas aromáticas, siempre que el sabor del anís siga siendo preponderante [4].

I.2.2. Tipos de anises

Según su composición y características, se pueden considerar los siguientes tipos de anises [6]:

- Anís destilado.

Obtenido por destilación en mezcla hidroalcohólica de granos de anís verde o estrellado y de otras plantas aromáticas. Esta bebida contiene alcohol destilado en presencia de tales semillas en una proporción mínima del 20 % del volumen del alcohol absoluto del producto.

- Anís en frío.

Es el obtenido por dilución de aceites esenciales de matalauva o de badiana y de otras sustancias naturales de origen vegetal.

Dentro de estos dos tipos genéricos de anís se distinguen distintas clases, como son, anís extraseco, seco, semidulce, dulce y escarchado. Las características de los mismos se presentan en la Tabla I.1.

Tabla I.1. Características de los distintos tipos de anís.

| Características | Extraseco | Seco | Semidulce | Dulce | Escarchado* |
|---|-----------|---------|-----------|----------|-----------------|
| Grado alcohólico | 50°-55° | 35°-50° | 35°-45° | 35°-45° | 35°-45° |
| Contenido en azúcares totales (g/l de sacarosa) | <50 | <50 | 50-260 | >260 | Sobresaturación |
| Aceites esenciales (g/l) | 1.75-3.75 | 1.0-3.0 | 0.75-1.5 | 0.75-1.5 | ---- |

* Deberá presentar el azúcar cristalizado en las ramas vegetales que sirven de soporte a tal fin.

I.2.3. Otras definiciones

- Anís verde o matalauva (*Pimpinella anisum*).

Nombre común de una planta anual de la familia de las umbelíferas (*Umbelliferae*). Es originaria de Egipto y se cultiva en Siria, Malta, España y Alemania. Crece hasta unos 30 centímetros de altura, con tallo ramoso, hojas inicialmente casi redondas y después hendidas en lacinias, flores pequeñas y blancas. Tiene por frutos semillas aovadas, verdosas, menudas y aromáticas, de olor grato y sabor dulzón cálido. Tanto el aroma como el sabor se deben a un aceite llamado esencia de anís, que contiene anetol (Figura I.4.); éste y sus derivados se usan en la preparación de perfumes y aromatizantes. La semilla se usa como condimento en la elaboración de los licores (anís) y en medicina, como estimulante y carminativo [8-10].

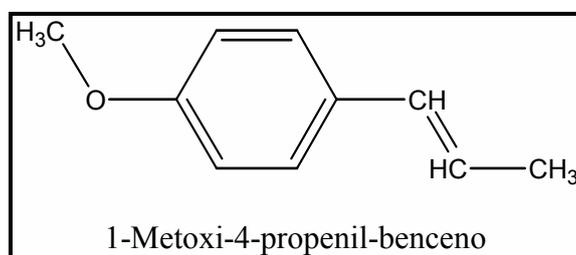


Figura I.4. Anetol.

- Anís estrellado, anís de China o badiana (*Illicium verum*).

Es el fruto del badián, árbol de la familia de las magnoliáceas (*Magnoliaceae*), de hasta seis metros de altura, y debe el nombre a la disposición estrellada de los 6 a 12 carpelos que lo forman; son leñosos, duros, con una sola semilla cada uno. Las características del fruto, la semilla y la esencia son muy similares a las del anís verde, y la esencia encuentra las mismas aplicaciones [8-10].

- Hinojo (*Foeniculum vulgare*).

Planta herbácea de la familia de las umbelíferas, con tallos de 12 a 14 decímetros, erguidos, ramosos y algo estriados; hojas partidas en muchas lacinias largas y filiformes; flores pequeñas y amarillas, en umbelas terminales, y fruto oblongo, con líneas salientes bien señaladas y que encierra diversas semillas menudas. Toda la planta es aromática, de gusto dulce, y se usa en medicina y como condimento [8-10].

- Aceite esencial natural.

Es el producto obtenido de la destilación de la semilla del anís o de la badiana, con un peso específico comprendido entre 0,983 y 0,987 a 25 °C y un punto de fusión comprendido entre los 20 y 23 °C [6].

I.3. Parámetros de calidad en bebidas anisadas

El punto segundo del artículo cuarto de la Reglamentación Especial para la elaboración, circulación y comercio de anís [11], modificado parcialmente por el Real Decreto número 1424/1988 [6], establece las siguientes cantidades toleradas para los componentes mencionados en la Tabla I.2.

Tabla I.2. Cantidades toleradas de los distintos parámetros de calidad en bebidas anisadas.

| Compuesto | Cantidad máxima permitida |
|-----------------------|---------------------------|
| Metanol | 1 g/l |
| Bases nitrogenadas | Exento |
| Compuestos sulfurados | Exento |
| Furfural | Exento |
| Metales pesados | |
| Arsénico | 0.8 mg/l |
| Cinc | 10.0 mg/l |
| Cobre | 10.0 mg/l |
| Plomo | 1.0 mg/l |

I.4. Composición mineral y orgánica de las bebidas alcohólicas

Las propiedades organolépticas de vinos y bebidas destiladas dependen de su contenido en componentes orgánicos e inorgánicos. La determinación cuantitativa de estos compuestos es de gran importancia desde el punto de vista analítico y tecnológico, tanto para realizar el control de calidad del producto elaborado, como por su posible interés nutricional y toxicológico [12].

La presencia de metales en vinos puede tener distintos orígenes. Puede deberse tanto a factores naturales como exógenos. Los factores naturales se relacionan con la variedad de la uva, clima y el tipo y composición del suelo [12-14]. Por otro lado, los factores exógenos se relacionan con el uso de fertilizantes, insecticidas, fungicidas, procesos de elaboración, fermentación, sistemas de vinificación, corrosión de equipos y otras fuentes de contaminación [12, 15]. El origen del contenido metálico en el caso de

bebidas destiladas se encuentra tanto en sus materias primas, como en los procesos y dispositivos usados en su elaboración.

Uno de los elementos principales que forman parte de los fertilizantes es el potasio, mientras que calcio, magnesio y sodio se encuentran entre los secundarios. También es importante tener en cuenta el empleo de oligoelementos como boro, cobalto, cobre, hierro, manganeso, molibdeno y zinc [16]. Fernández Pereira [14] realizó una revisión bibliográfica sobre la importancia de los metales en la elaboración del vino. En cuanto a la fertilización, menciona los efectos del cromo, molibdeno, wolframio, boro y zinc en el crecimiento de la uva y en el aumento de azúcares y otros compuestos. Además, repasa la influencia de elementos como manganeso, zinc, molibdeno, hierro, cobre y plomo en la actividad enzimática en procesos de fermentación.

Como se ha mencionado antes, las propiedades organolépticas de los vinos quedan afectadas por su composición. Por ejemplo, hierro y cobre pueden ser la causa de su oscurecimiento e inestabilidad. Calcio y potasio producen la precipitación de sales tartáricas en vinos embotellados. Magnesio, cobre y aluminio suelen ser responsables de turbidez. Por otro lado, el estaño es responsable de una disminución del aroma en vinos y el sabor agrio se puede deber a la presencia de zinc en bajas concentraciones. Otros elementos que afectan al sabor son potasio (que da un sabor amargo a alta concentración e insípido si es baja), magnesio, sodio, hierro y aluminio [12, 14].

Además de la modificación de propiedades organolépticas, es preciso tener en cuenta el efecto negativo, debido a su toxicidad, de arsénico, plomo, cadmio, zinc [12-15] y aluminio [17]. En algunos casos, la toxicidad depende de la forma química o especie del elemento. Por ejemplo, en el caso del cromo, los compuestos de cromo (VI) muestran un carácter tóxico, mutagénico y cancerígeno, mientras que los de cromo (III), más frecuente en alimentos y bebidas, presenta baja toxicidad [18].

Desde un punto de vista nutricional, también se hace interesante el estudio del contenido metálico en bebidas alcohólicas. El hierro quizá haya sido el elemento más estudiado en vinos, relacionándolo con efectos terapéuticos en enfermos de anemia. También tiene gran interés el estudio de la relación sodio/potasio, desde un punto de vista dietético, en el caso de problemas de hipertensión [14]. Por otro lado, es de

destacar el papel del cromo en el metabolismo de carbohidratos, colesterol y proteínas [18].

La composición orgánica del vino esta muy influenciada por la variedad de la uva empleada en su elaboración, su microbiología, las prácticas de cultivo de la uva y el proceso de fermentación. En la uva aparece una gran variedad de compuestos polifenólicos, que van a pasar a formar parte del vino. Estos compuestos presentan una gran variedad de estructuras y están implicados en reacciones ácido-base, de oxidación-reducción, equilibrios de formación de complejos, oligomerización y precipitación. La formación de precipitados con las proteínas puede explicar el sabor astringente que causan estos compuestos [19].

El uso de pesticidas en el cultivo de la uva, produce la presencia de residuos de los mismos en los productos comerciales elaborados. Existe una gran variedad de los mismos en el mercado y su uso debe estar regulado por los gobiernos, debido a su carácter potencialmente tóxico [20].

En el proceso de fermentación, los microorganismos metabolizan los azúcares y otros componentes de la uva en etanol, dióxido de carbono, y cientos de productos secundarios que contribuyen a las cualidades organolépticas de los vinos [21]. Aparte de los beneficios de un consumo moderado de alcohol, frente a enfermedades cardiovasculares, la presencia de otros constituyentes en vinos y bebidas alcohólicas le confieren muchas propiedades beneficiosas. Por ejemplo, la presencia de flavonoides, hidroxiestilbenos, catequinas y otros compuestos fenólicos previene el daño oxidativo, la formación de radicales libres y ayudan a reducir la respuesta inflamatoria [22, 23].

Otros compuestos formados en el proceso de fermentación, como las aminas biogénicas, que aparecen debido a la acción de los microorganismos sobre los aminoácidos, son indeseables en el producto final, debido a su potencial toxicidad [24]. El contenido en compuestos como el carbamato de etilo, que aparece en bebidas alcohólicas destiladas, como el whisky y el brandy, debe ser reducido debido a su carácter cancerígeno [25].

Algunos vinos y bebidas destiladas necesitan un proceso de maduración, que se realiza en barriles de madera, donde se producen numerosos procesos, muy importantes para la calidad del sabor, aroma y color del producto final [19]. Algunos de estos procesos son reacciones de oxidación, hidrólisis, evaporación de moléculas de bajo peso

molecular y concentración de las de mayor tamaño [26]. Las sustancias fenólicas complejas, como los taninos, se extraen de la madera y se hidrolizan para dar, entre otros compuestos, ácido gálico y elágico. La hidrólisis de polisacáridos como la celulosa y hemicelulosa, producen la aparición de una gran variedad de carbohidratos (glucosa, galactosa, xilosa, arabinosa, ribosa, etc.). La lignina sufre un proceso de etanolisis y, por acción del oxígeno, produce la acumulación de aldehidos aromáticos y ácidos benzoico y cinámico [19, 26].

El contenido en compuestos como los ácidos benzoico y cinámico, furfural y 5-hidroximetil-2-furaldehido, se ha relacionado con el proceso de envejecimiento de whisky y brandy, permitiendo la clasificación de bebidas de este tipo en función del tiempo de envejecimiento [27, 28].

Durante el envejecimiento de vinos espumosos, la fracción nitrogenada sufre cambios que se traducen en el incremento de la concentración de aminoácidos, la reducción del contenido proteico y la aparición de péptidos de distinto tamaño, que influyen en la calidad de la espuma [29].

Otras bebidas alcohólicas que son aromatizadas con aceites esenciales de plantas y frutas presentan compuestos más específicos del tipo de bebida, como es el caso del anetol en bebidas anisadas [4] y pacharán [30], o ciertos terpenos, como d-limoneno en destilados a base de cítricos [31] y β -pineno en licores de menta [32]. Los compuestos terpénicos contribuyen al matiz frutal y floral del aroma de muchas bebidas alcohólicas y pueden usarse como discriminantes la variedad de vinos y destilados. Existe una gran variedad de componentes del aroma del vino y bebidas destiladas, la mayoría son alcoholes de elevado peso molecular, ácidos orgánicos volátiles y sus esteres, aldehídos y acetatos [32].

Mueller *et al.* [33] estudiaron el contenido en emodina, crisofanol y fisciión en licores aromatizados con extractos de plantas. El estudio de estas antraquinonas es de gran interés debido a su posible carácter mutagénico.

Otras sustancias de interés son los aromatizantes y colorantes usados en la elaboración de bebidas alcohólicas. El contenido máximo permitido de sustancias aromatizantes queda establecido en el anexo II de la Directiva del Consejo (88/388/CEE) del 22 de junio de 1988, relativa a la aproximación de las legislaciones de

los Estados Miembros en el ámbito de los aromas utilizados en los productos alimenticios [34]. Entre las mismas se encuentran el ácido agárico, aloína, β -azarona, berberina, cumarina, ácido cianhídrico, hipericina, pulegona, cuasina, safrol e isosafrol, santonina y α - y β -tuyona. Ninguna de estas sustancias se puede añadir como tal a los productos elaborados, deberán ser introducidos de manera natural o mediante la adición de aromas preparados a partir de productos naturales.

También pueden aparecer sustancias colorantes, cuyo uso alimentario queda regulado en la Directiva 94/36/CEE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 30 de junio de 1994 [35].

I.4.1. Determinación de metales en bebidas alcohólicas

Las técnicas analíticas más utilizadas en la determinación del contenido mineral en bebidas alcohólicas son las de absorción y emisión atómica. Antes de realizar la determinación de estos elementos, es necesario llevar a cabo la mineralización de la muestra. Existe poca información en la bibliografía sobre el tratamiento de muestras de anisados. La legislación española recomienda como método oficial la mineralización seca de la muestra, previa adición de 1 ml de ácido sulfúrico, con una redisolución ácida de las cenizas obtenidas [36]. Algunos autores también proponen este tipo de métodos para el análisis del contenido metálico en vinos, con adición de sulfúrico [37] o sin ella [38]. Este proceso presenta bastantes inconvenientes, principalmente debidos a problemas de contaminación y pérdidas de analito por volatilización [39].

González *et al.* [12] compararon la determinación directa de hierro, cobre, plomo, zinc y manganeso en vinos, mediante espectroscopía de absorción atómica (AAS), tras calibrar el instrumento con un vino sintético, con el empleo de una mezcla de ácidos nítrico y sulfúrico para eliminar la matriz y sus posibles efectos. Salvo en el caso de cobre y manganeso, los elementos estudiados presentan de forma apreciable interferencias debidas a la matriz, con lo que se hace necesaria la digestión inicial de la muestra.

Cabrera *et al.* [40] proponen la mineralización de 5 ml de vino con 5 ml de ácido nítrico en un tubo pyrex calentado a 100 °C, en un bloque de aluminio, durante tres horas. Este tratamiento es aplicable a otras bebidas alcohólicas para la determinación de

plomo mediante espectroscopía de absorción atómica con generación de hidruros (HG-AAS, Hydride Generation Atomic Absorption Spectroscopy) [41]. También se propone la digestión de muestras de diversas bebidas alcohólicas con 1 ml de ácido nítrico y unos miligramos de pentóxido de vanadio, actuando como catalizador. La muestra se calienta a 120 °C durante 90 min. Este procedimiento se ha utilizado en la determinación de cromo [18], cadmio [42] y aluminio [43-45] mediante espectroscopía de absorción atómica con atomizador electrotérmico (ET-AAS, Electrothermal Atomic Absorption Spectroscopy).

Para la determinación de plomo, Goosens [46] propone la mineralización de 10 ml de vino con 5 ml de ácido nítrico. La mezcla se coloca en un vaso de teflón y se calienta durante dos horas. Después se añade 3 ml de ácido perclórico y se calienta a 90 °C durante toda una noche. Las determinaciones se llevan a cabo mediante espectroscopía de plasma inducido acoplado-masas (ICP-MS, Inductively Coupled Plasma Mass Spectroscopy). La misma técnica fue empleada por Stefanova *et al.* [47] para la determinación directa de aluminio, arsénico, bario, cadmio, cobre, cromo, estroncio, manganeso, plomo y zinc, utilizando rodio-103 y renio-187 como patrones internos.

Otra posibilidad consiste en realizar la digestión de la muestra en un horno microondas. Galani *et al.* [15] proponen un pretratamiento de la muestra con ácido nítrico a temperatura ambiente. Tras 18 horas se transfieren los reactores al horno microondas, manteniendo una potencia de 100 W y variando la presión de 20 a 175 psi, en cinco pasos.

Baluja-Santos *et al.* [48] realizaron una revisión bibliográfica sobre determinación de arsénico, antimonio, bismuto, plomo, estaño, selenio y telurio en vinos y otras bebidas mediante HG-AAS. Desaconseja el uso de la mineralización por vía seca, pero considera que el uso de inhibidores de volatilización, como la mezcla de óxido y nitrato de magnesio, es una alternativa a los métodos de mineralización por vía húmeda. No obstante, se aconseja el uso de estos últimos, usando ácido nítrico, perclórico, sulfúrico y peróxido de hidrógeno o mezclas de los mismos. También se aconseja el uso de sistemas cerrados y de digestión en horno microondas.

Vique *et al.* utilizaron la digestión ácida en horno microondas para la posterior determinación de platino [49] y níquel [50] en vinos franceses por espectroscopia de absorción atómica con atomizador electrotérmico. Los niveles de platino encontrados

fueron en la mayoría de los casos inferiores a 10 $\mu\text{g/l}$, obteniéndose recuperaciones del 92.5 al 102%. El contenido en níquel, que provenía principalmente de los tanques de almacenamiento del vino, variaba entre 5.4 y 87.9 $\mu\text{g/l}$.

Otros autores también emplean ET-AAS para la determinación de aluminio [51, 52], cadmio [53], hierro [54], níquel [54], plomo [53, 55, 56].

Además de técnicas de emisión y absorción atómica, pueden emplearse técnicas potenciométricas y voltamperométricas. Mannino [57] presenta una revisión bibliográfica sobre la determinación de metales en bebidas alcohólicas y no alcohólicas mediante técnicas potenciométricas. Ostapczuk [58] desarrolla un procedimiento para la determinación de cadmio, plomo y cobre en vinos mediante análisis potenciométrico de redisolución con un electrodo de película de mercurio. Barbeira [59] propone la determinación de trazas de zinc, plomo y cobre en ron mediante voltamperometría de redisolución anódica sin tratamiento previo de la muestra, reduciendo los límites de detección respecto a la espectroscopía de absorción atómica.

Ijeri y Srivastava [60] proponen el uso de un electrodo de pasta de carbono modificado químicamente con éteres corona para la determinación de plomo en disoluciones hidroalcohólicas mediante voltamperometría diferencial de pulso, llegando a un límite de detección de 20 $\mu\text{g/l}$

I.4.2. Determinación de compuestos orgánicos en bebidas alcohólicas

I.4.2.1. Cromatografía Líquida de Alta Resolución

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, High Performance Liquid Chromatography) es una de las técnicas más utilizadas en la determinación de compuestos orgánicos en bebidas alcohólicas. Muchas de las aplicaciones de esta técnica tratan sobre el análisis de compuestos fenólicos y furanos en bebidas envejecidas.

Goldberg *et al.* [22] describen un método para la determinación de fenoles y derivados del furfural en bebidas destiladas mediante la inyección directa de las mismas en el sistema cromatográfico. Los fenoles se eluyen en fase reversa utilizando como fase móvil agua y acetonitrilo utilizando un detector de fila de fotodiodos. Se establece un programa de gradiente que va desde el 10 % acetonitrilo hasta el 50% del mismo. La

columna estaba termostata a 25 °C. Canas *et al.* [61, 62] determinan los mismos compuestos en brandies utilizando agua y metanol al 70% para establecer el gradiente. Los mismos disolventes fueron empleados por Pascual-Teresa *et al.* [63] para la determinación de polifenoles en vinos, cerveza y licores de fruta, previa reacción de derivatización post-columna con *p*-dimetilaminocinamaldehído en medio ácido.

Bettin et al. [64] proponen un método de análisis de fenoles y derivados en bebidas alcohólicas por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa con detección de fluorescencia. Para la elución de los compuestos se utilizó una mezcla de agua/acetonitrilo/ácido acético 88:10:2 (disolución A) y una mezcla acetonitrilo/acético 98:2 (disolución B), estableciéndose un gradiente que variaba entre un 15% de la disolución B y el 100% de la misma.

McMurrough y Byrne [65] han realizado una revisión bibliográfica sobre la determinación mediante HPLC de los compuestos responsables del sabor amargo de las bebidas alcohólicas, haciendo énfasis en los compuestos fenólicos en cerveza.

Fernandez *et al.* [66] estudiaron el contenido de cumarinas en ron, analizando estos compuestos mediante HPLC con detección UV y comparando los resultados con los obtenidos por fluorescencia. Se realizó un gradiente utilizando acetonitrilo y agua como fase móvil, aumentando el porcentaje de acetonitrilo en el tiempo. Las dos técnicas empleadas eran adecuadas para la determinación de estos compuestos, siendo la espectrofluorimetría la que presentaba una mayor exactitud. Los mismos autores [67] determinaron el contenido en cumarinas en ron, whisky y brandy, además de hacerlo en los extractos etanólicos de la madera de los barriles usados en su envejecimiento y en muestras de caramelo, utilizados como colorantes.

Nicoletti *et al* [68] desarrollaron un método para la identificación y determinación de 5-hidroximetil-2-furaldehído y 2-furaldehído en bebidas alcohólicas. Se estableció un régimen isocrático con acetonitrilo al 6% y detección a 280 nm, utilizando una microcolumna de fase reversa (300 x 1 mm d.i.) con flujo de fase móvil de 60 μ l/min. Otros autores también emplean microcolumnas para la determinación de 5-hidroximetil-2-furaldehído, 2-(4-hidroxifenil)etanol y 3-(2-hidroxietil)indol en vinos y cerveza [69].

Varios autores describen métodos para la determinación de derivados del furano en brandy [70] y whisky [28]. En el caso de los anisados, los métodos oficiales de

análisis establecidos en la legislación española [36] proponen un método en fase reversa en régimen isocrático, utilizando metanol al 10% con un tampón $\text{HPO}_4^{=}/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ como fase móvil, y detección UV a 285 nm para detectar la presencia de furfural e hidroximetilfurfural.

Loukou *et al.* [71] proponen un método para la determinación simultánea de once aminas biogénicas en vino. En primer lugar se sometieron las aminas a una derivatización con cloruro de dansilo. Los compuestos dansilados se purificaron mediante una extracción en fase sólida en cartuchos de C-18. Las dansilamidas fueron separadas en una columna de fase reversa mediante una elución en gradiente con un sistema binario de acetonitrilo/agua y detección de fluorescencia. La identidad de los compuestos se confirmó mediante cromatografía líquida a presión atmosférica con detección por espectrometría de masas con ionización química. Este mismo método de separación se llevó a cabo para la determinación de aminas en vinos y cerveza utilizando un detector de ultravioleta a 254 nm [72] y la detección simultánea ultravioleta/fluorescencia [73].

Vidal-Carou *et al.* [24] optimizaron y validaron un método de determinación de aminas biogénicas mediante HPLC en fase reversa de par iónico con una derivatización post-columna con *o*-ftalaldehído y detección espectrofluorométrica. Se realizó una elución en gradiente con acetonitrilo/agua. La columna fue termostata a 40°C. Otro compuesto nitrogenado, el etil carbamato, se ha cuantificado mediante HPLC en vino y brandy, con derivatización en precolumna con 9-xantidrol y detección fluorimétrica [74].

La cromatografía líquida de alta resolución también puede ser aplicada al análisis de azúcares en licores. Blanco Gomis *et al.* [26] utilizaron una columna de C8 para la determinación de este tipo de compuestos en brandy. Los disolventes utilizados fueron tetrahidrofurano tamponado con citrato sódico a pH 5.5 y acetonitrilo. Se estableció un programa de gradiente en el que la proporción de acetonitrilo se mantiene al 1% durante 20 minutos y se aumenta a un 28% en 8 minutos. La columna se termostató a 40 °C. El sistema de detección utilizado fue de fila de fotodiodos.

Otro campo de aplicación importante de la cromatografía líquida es la identificación y determinación de compuestos que forman parte de los aceites esenciales naturales utilizados en la aromatización de bebidas alcohólicas. Currò *et al.* [75]

describieron un método en fase reversa (C18), a temperatura ambiente, en régimen isocrático con acetonitrilo/agua (45:55) y un flujo de 2 ml/min, para la determinación simultánea de β -azarona, safrol, isosafol y anetol en licores aromatizados utilizando un detector de fluorescencia. Los mismos autores estudiaron el contenido en hipericina, α -tuyona y β -tuyona en bebidas alcohólicas con detección de fluorescencia [76-77]. Para derivados de la aloina se utiliza el detector ultravioleta [78].

Ferreira *et al.* [79] propusieron un método de cromatografía líquida de alta resolución para la determinación de compuestos responsables del aroma en vinos y otras bebidas alcohólicas. Éste método permite la inyección directa de los extractos del aroma sin necesidad de realizar ningún pretratamiento previo, como en el caso de la cromatografía de gases.

El ácido carmínico, un colorante natural utilizado en la elaboración de muchos alimentos, puede determinarse en presencia de otros colorantes por cromatografía líquida de alta resolución [80], utilizando una mezcla de acetonitrilo y ácido fórmico como fase móvil y una columna de C18.

I.4.2.2. Cromatografía de gases

La cromatografía de gases es la técnica más utilizada para la determinación de los compuestos responsables del aroma en vinos y destilados. Como ya hemos dicho, los compuestos aromáticos principalmente encontrados en la fracción volátil de las bebidas alcohólicas son los alcoholes de elevado peso molecular, ácidos grasos y sus etil ésteres, acetatos y aldehídos.

El estudio de terpenos, compuestos responsables del aroma afrutado de muchos vinos, se lleva a cabo mediante cromatografía de gases. Entre los más estudiados se encuentran el α -pineno, β -pineno, limoneno, linalool, α -terpineol, geraniol, etc. Debido a la baja concentración de estos compuestos y a la gran complejidad de la fracción volátil de las muestras de bebidas alcohólicas, es preciso llevar a cabo una extracción previa de estos compuestos antes de su cuantificación. Diéguez *et al.* [32] proponen una extracción en fase sólida en cartuchos de C18 con este fin, utilizando una mezcla de diclorometano y pentano como eluyentes. Posteriormente llevaron a cabo la determinación de terpenos y norisoprenoides de 13 átomos de carbono en los extractos

mediante cromatografía de gases en una columna capilar con fase estacionaria de polietilenglicol y un detector de ionización de llama, confirmando la presencia de los compuestos mediante cromatografía de gases-masas. Otros autores proponen una extracción líquido-líquido con hexano para la preconcentración de este tipo de compuestos [30, 31] o la microextracción en fase sólida (SPME, Solid Phase Microextraction) previa a la detección por cromatografía de gases-masas (GC-MS, Gas Chromatography Mass Spectrometry)[81, 82].

Lay-Keow Ng [83] realizó una revisión bibliográfica sobre el uso de la cromatografía de gases con detección espectrométrica de masas para la determinación de ácidos grasos y sus ésteres en destilados, vinos y cerveza. Esta revisión incide en los distintos métodos de preconcentración que pueden llevarse a cabo y la aplicabilidad de la inyección directa en destilados, debido a sus matrices relativamente limpias.

Diéguez *et al.* [84] estudiaron el contenido en ácidos carboxílicos de cadena corta (C₂-C₆), responsables del olor rancio en destilados envejecidos, así como el contenido en ácidos grasos de cadena larga en bebidas alcohólicas. Las muestras fueron preconcentradas mediante una extracción en fase sólida. La separación de estos compuestos se llevó a cabo en una columna capilar de polietilenglicol y detección de ionización de llama.

Pino *et al.* [85] determinaron el contenido en etil ésteres de ácidos grasos (C₆, C₈, C₁₀, C₁₂) en el aroma de ron blanco. Propusieron la preconcentración de estos compuestos mediante microextracción en fase sólida en espacio de cabeza, observando el efecto del contenido alcohólico y salino de las muestras en este procedimiento. También optimizaron la cantidad de muestra, temperatura y tiempo de extracción.

Conner *et al.* [86] también estudiaron el efecto del alcohol etílico en el proceso de SPME, con el fin de comprobar si el aroma umbral de distintas bebidas alcohólicas dependía del contenido en etanol o sólo de las interacciones entre compuestos aromáticos. El aumento de la solubilidad de los ésteres al aumentar el contenido alcohólico, reducía la concentración de estos en el espacio de cabeza. La determinación de estos compuestos se realizó mediante cromatografía de gases y detector de ionización de llama.

Ebeler *et al.* [87] compararon la microextracción en fase sólida en espacio de cabeza y la extracción en continuo líquido-líquido en la determinación de aromas en

brandy mediante cromatografía de gases. En general, el procedimiento de SPME fue más selectivo que la extracción líquido-líquido con freón para los ésteres y ácidos grasos. En el caso de los alcoholes superiores, la extracción líquido-líquido resultó más efectiva.

Fitzgerald *et al.* [88] compararon la microextracción en fase sólida en espacio de cabeza y por inmersión en la determinación de alcoholes, ésteres y acetatos de ácidos grasos en muestras de whisky. Ésta última ofrecía mayores señales para seis de los compuestos a determinar, pero no fue adecuada para la determinación de butan-2-ol, propanol e isobutanol. Además se compararon tres fibras distintas para llevar a cabo la microextracción, poli(dimetilsiloxano)-divinilbenceno, carboxeno-poli(dimetilsiloxano) y poli(acrilato), siendo esta última la más adecuada.

La preconcentración de ácidos carboxílicos y fenoles puede llevarse a cabo mediante una extracción de intercambio iónico en fase sólida, su elución con acetonitrilo y derivatización con metil trimetilsililtrifluoroacetamida. La determinación de los derivados silados se llevó a cabo mediante GC-MS [89].

La separación, identificación y cuantificación de anetol en anisados, según la legislación española vigente [36] se debe llevar a cabo mediante cromatografía de gases con detector de ionización de llama. La muestra se destila, recogiendo el destilado en un matraz situado en un baño de hielo. Se inyecta el destilado, previa adición de mentol como patrón interno, en el sistema cromatográfico y se cuantifica la muestra mediante la relación en área existente entre el analito y el patrón interno. También se ha propuesto la extracción líquido-líquido con n-pentano para la determinación de este compuesto en pacharán [30] y pastis [90].

Recientemente, en la identificación de aromas en bebidas alcohólicas, se ha introducido la denominada detección olfatométrica [91]. Tras la separación cromatográfica, el efluente de la columna se divide en dos entre el detector del sistema y un portal de olfateo. Una serie de expertos, entrenados con aromas sintéticos, pulsan un interruptor al oler el aroma. Esta técnica ha sido aplicada en la caracterización del perfil del aroma de diversas bebidas alcohólicas [87, 92, 93].

Guichard *et al.* [93] sometieron ocho muestras de destilados de manzana a un proceso de cata y, posteriormente, separaron los componentes del aroma mediante cromatografía de gases, sometiendo el efluente a un análisis olfatométrico y detección

por ionización de llama (FID, Flame Ionisation Detector). De los setenta y uno olores detectados en el análisis sensorial, diecinueve eran comunes a todas las muestras. Veintiocho se relacionaron con parámetros de calidad de los destilados y veinticuatro eran demasiado débiles para atribuir cualidades específicas. Posteriormente [94], se identificaron y cuantificaron estos aromas mediante GC-MS y GC-FID.

Watts *et al.* [95-96] estudiaron el contenido en ésteres, aldehídos y metilcetonas en brandies franceses mediante SPME y GC-MS. Los autores encontraron una correlación directa entre el contenido en metilcetonas, responsables de la aparición de aromas indeseables durante el envejecimiento, y etil ésteres, con la clasificación de los destilados en función de su edad. Otros autores [97] proponen una derivatización con *o*-(2,3,4,5,6-pentafluorobencil)-hidroxilamina de aldehídos y cetonas previa a la microextracción en fase sólida, determinando los pentafluorobencilderivados mediante cromatografía de gases con detector de captura electrónica. Comparando este procedimiento con la extracción líquido-líquido, se observa que la reproducibilidad para la SPME es menor, aunque se obtienen límites de detección de un orden de magnitud menor [98]. Otro procedimiento de pretratamiento para estos compuestos es la obtención de tiazolidinderivados con cisteamina (2-aminoetanotiol) y la posterior extracción con cloroformo. La determinación se lleva a cabo mediante cromatografía de gases con detector de fósforo y nitrógeno [99].

Casella *et al.* [100] llevaron a cabo la determinación del contenido en compuestos del azufre en vinos mediante cromatografía de gases con detección amperométrica. Los autores desarrollaron un electrodo de carbono químicamente modificado con cobre. La detección electroquímica propuesta permitió la determinación de sulfocompuestos en vinos sin derivatización previa. También se ha propuesto el uso de un detector de quimioluminiscencia específico para los compuestos con azufre [101].

I.4.3. Otras técnicas utilizadas en el análisis de la composición de bebidas alcohólicas.

La electroforesis capilar es una técnica de separación muy utilizada para la determinación de la composición orgánica y mineral de bebidas alcohólicas. Se han descrito métodos para la determinación de azúcares [102], ácidos orgánicos [103, 104], compuestos fenólicos [105-107], aniones y cationes [108, 109] en vinos y destilados.

El uso de biosensores para la determinación de alcoholes de cadena corta [110-112] se está extendiendo considerablemente. Los más utilizados son los que contienen alcoholdehidrogenasa (ADH), β -nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) oxidasa y NAD^+ enlazado a un polímero de soporte. El alcohol reacciona con el NAD^+ en presencia de ADH formando el correspondiente aldehído y NADH. La detección amperométrica basada en la oxidación del NADH en presencia de la enzima NADH-oxidasa se utiliza para cuantificar el contenido en alcohol [113-115]. Entre estos sensores con detección amperométrica, también se han descrito biosensores para la determinación de glicerol [116] y acetaldehído [117] y un sensor de óxido de cobre para la determinación de etanol [118].

Otra modalidad de sensores son los denominados sensores ópticos. Mohr *et al.* [119] construyeron un sensor para la determinación de alcoholes utilizando 4-(N,N-dioctilamino)-4'-trifluoroacetil-azobenceno impregnado en membranas de PVC. La absorbancia, a 490 nm, de este compuesto disminuye, aumentando a 430 nm, en presencia de disoluciones acuosas de etanol, lo que se puede utilizar para su detección. Los autores también construyeron un sensor con *p*-N,N-dioctilamino-4'-trifluoroacetilstilbena, que permitía la detección fluorimétrica de alcohol [120], y con derivados de la fenolbetaína, utilizando medidas de reflectancia [121]. También se han descrito sensores ópticos para la determinación de ácido gálico y derivados [122].

Otras técnicas utilizadas en el análisis de bebidas alcohólicas son la espectroscopía UV [123, 124], de fluorescencia [125], quimioluminiscencia [126, 127] y la espectroscopía de infrarrojo [128-131].

I.5. Aplicaciones de los métodos de reconocimiento de patrones en la caracterización de alimentos

El análisis multivariante en combinación con las técnicas de reconocimiento de patrones constituye un procedimiento muy eficaz en el estudio y caracterización de alimentos [132], quedando claro su gran importancia y el interés de su aplicación en el control de calidad de este tipo de muestras, por ejemplo, en la detección de fraudes [133] y en todos los estudios relacionados con la implantación de las denominaciones de origen.

Desde los trabajos de Kowalski sobre la interpretación de datos químicos mediante técnicas de reconocimientos de patrones [134, 135] y sus aplicaciones a la diferenciación de vinos [136, 137], varios autores han propuesto el uso de técnicas quimiométricas para caracterizar diversos tipos de alimentos a partir de datos multivariantes de su composición química.

Mangas *et al.* [138] realizaron un estudio del perfil fenólico de distintas variedades de manzanas de sidra con el fin de clasificarlas como amargas y no amargas. Para ello analizaron los compuestos fenólicos mediante RP-HPLC y se aplicaron diversas técnicas quimiométricas como análisis de componentes principales (PCA, Principal Component Analysis), análisis discriminante lineal (LDA, Linear Discriminant Analysis) y mínimos cuadrados parciales (PLS, Partial Least Squares). En otro trabajo del mismo autor se realizó la caracterización de manzanas de sidra según su contenido en ácidos grasos [139] empleando las mismas técnicas quimiométricas. Para la clasificación de manzanas en función de su estado de madurez se determinaron azúcares, ácidos orgánicos, polifenoles y pectinas, se redujo la dimensionalidad de la matriz de datos mediante análisis de componentes principales y se emplearon técnicas de modelado, como PLS y modelado suave independiente por analogía de clases (SIMCA, Soft Independent Modelling of Class Analogy) [140]. La caracterización de sidras fue realizada a partir del perfil orgánico de las mismas [141, 142].

Otros autores han empleado el análisis en componentes principales para la diferenciación de naranjas en función del periodo de conservación [143]. Esta técnica también se ha utilizado para estudiar los efectos de distintos revestimientos de

polisacáridos en el mantenimiento de la calidad y aumento del periodo de conservación de mangos y bananas [144], para mostrar como afectan las condiciones de almacenamiento a distintas variedades de cereza [145] o clasificar melocotones y nectarinas en función de su estado de madurez [146].

Padin *et al.* [147] caracterizaron patatas diferenciando aquellas que tenían el Certificado de Origen y Calidad “Denominación Específica: Patata de Galicia” de las que no. En el estudio aplicaron diversas técnicas, como análisis cluster (CA, Cluster Analysis), análisis de componentes principales, análisis discriminante lineal, el método de los K-vecinos más proximos (KNN, K-nearest neighbours), SIMCA y redes neuronales artificiales (ANN, Artificial Neural Networks), y utilizaron como variables el contenido en 10 elementos determinados mediante espectroscopía de absorción atómica. El perfil metálico proporcionó información suficiente para establecer un criterio de clasificación en base al origen de las patatas [147-148]. Anderson *et al.* [149] también usaron el contenido mineral para diferenciar patatas según su origen utilizando redes neuronales artificiales.

Barrado *et al.* [150] utilizaron el contenido en ácidos grasos, determinados mediante cromatografía de gases, previa obtención de sus ésteres metílicos, para clasificar truchas de acuerdo con la piscifactoría de procedencia de las mismas. Para este fin utilizaron análisis factorial y cluster. En otro trabajo [151], este autor y sus colaboradores realizaron una diferenciación de varios tipos de marisco, utilizando el contenido en ácidos grasos y las mismas técnicas quimiométricas, distinguiendo entre los que habían sido bien cocinados y los que sufrieron un proceso incompleto (cocción en el caso de los moluscos, fritura o plancha para los crustáceos). Se diferenciaron tres grupos: crustáceos bien cocinados, crustáceos mal cocinados y bivalvos (cocinados y crudos).

Bechmann *et al.* [152] utilizaron el análisis en componentes principales para identificar qué parámetros del proceso de congelación eran más importantes para mantener la calidad del bacalao congelado. Además emplearon un modelo de PLS para predecir propiedades físicas, químicas y sensoriales, responsables de la calidad del producto, de distintos procesos de congelado.

González *et al.* [153] caracterizaron productos derivados del cerdo ibérico a partir de su contenido en volátiles. El análisis discriminante lineal y el modelado suave

independiente por analogía de clases permitieron la diferenciación de estos productos en función del régimen alimenticio de los cerdos (recebo, recebo y bellota y bellota).

Sacchi *et al.* [154] determinaron el contenido en β -sitosterol, n-alquenos, trans-2-alquenos y otros compuestos volátiles en aceite de oliva mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear. Estas muestras fueron clasificadas respecto a sus regiones de origen mediante PCA y análisis cluster, obteniendo una capacidad de clasificación del 95%. Otros autores utilizaron el contenido en ácidos grasos, alcoholes, triterpenos policíclicos y escualeno para la diferenciación de aceites de oliva, en función del cultivo de origen, mediante LDA, previa reducción del número de variables con PCA [155]. Utilizando técnicas quimiométricas es posible diferenciar aceite de oliva, aceite de oliva virgen y aceite de orujo [156], entre aceite de oliva y distintos tipos de aceite de semilla [157] y detectar adulteraciones [158, 159]. Utilizando procedimientos de PLS y PCA es posible agrupar distintos aceites de semilla en función del año de cosecha utilizando el contenido en ácidos grasos [160].

Pena y Herrero [161] aplicaron algunas técnicas quimiométricas para clasificar muestras de mieles gallegas según su origen (Lugo y Orense), para lo que determinaron once parámetros usados en el control de calidad de este producto. De éstos, la humedad y la acidez libre resultaron ser los más importantes en la clasificación. Por otro lado, López *et al.* [162] también determinaron parámetros relacionados con el control de calidad de mieles, como humedad, cenizas, materia insoluble, azúcares reductores, sucrosa, conductividad, acidez total y libre, pH, hidroximetilfurfural y actividad de la diastasa, aplicando técnicas quimiométricas como CA, PCA, LDA, KNN y SIMCA. Usando sólo la acidez total y los valores de diastasa se consiguió una buena diferenciación de mieles. Latorre *et al.* [163] también clasificaron mieles por su tipo, pero considerando el contenido metálico (Li, Rb, Na, K, Mg, Zn, Cu, Fe, Mn, Ni y Co) mediante espectroscopía de absorción y emisión atómica (AAS/AES). Las técnicas quimiométricas empleadas fueron las mismas que en el caso anterior. También diferenciaron mieles gallegas de mieles que no pertenecen a esta región a partir del contenido metálico [164].

Terrab *et al.* [165] también han aplicado técnicas quimiométricas a la diferenciación de mieles del Noroeste de Marruecos. Utilizando análisis de componentes principales y análisis discriminante por pasos (SDA), realizaron el estudio quimiométrico del contenido en azúcares, determinados mediante GC-MS. Obtuvieron una correcta clasificación del 70% de las muestras analizadas. En el caso de las mieles de ligamaza, una secreción de ciertos insectos que se alimentan de la savia de las plantas, la clasificación fue del 100%. Esta clasificación también fue posible utilizando el contenido en agua, pH, acidez, hidroximetilfurfural, actividad de la diastasa y prolina [166]. Utilizando estas mismas técnicas y redes neuronales artificiales, a partir del contenido metálico de las mieles, se clasificaron mieles de distinta procedencia floral con una efectividad del 92% [167]. Utilizando todos estos parámetros en conjunto, la clasificación de mieles de eucalipto, cítricos, *Lythrum*, umbelíferas y ligamaza fue del 97% [168].

Otros autores también proponen el uso de técnicas quimiométricas para la caracterización de mieles a partir del contenido metálico [169] y en aminoácidos [170]. También se ha propuesto el empleo de técnicas quimiométricas a los datos obtenidos tras el análisis cromatográfico de mieles, como un punto de partida para la caracterización de alimentos y detección de sus adulteraciones [171].

El café ha sido estudiado por varios autores. Martín *et al.* [172] diferenciaron variedades de café tostados en base a su composición química, determinando su contenido orgánico y mineral. Para llevar a cabo esta diferenciación, se emplearon técnicas quimiométricas como PCA, CA y SIMCA. Las diferencias principales entre los grupos identificados provenían principalmente del contenido en hidroximetilfurfural y magnesio. Los mismos autores [173] caracterizaron variedades de café verde a partir de su perfil metálico. Aplicando PCA y CA, concluyeron que los contenidos en fósforo, manganeso y cobre eran variables apropiadas para diferenciar las variedades arábica y robusta. Llegaron a la misma conclusión en la caracterización de muestras de café tostado [174] usando PCA, CA y PLS.

En otros trabajos estos mismos autores analizaron el perfil de ácidos grasos por GC con el fin de poder diferenciar entre variedades de café. Los ácidos determinados fueron mirístico, palmítico, araquídico, palmitoleico, esteárico, oleico, linoleico, linolénico, eicosenoico y behénico. Para poder diferenciar las distintas variedades se

aplicó PCA y LDA, llegando a la conclusión de que los descriptores más discriminantes eran los ácidos oleico, linoleico, linolénico y mirístico [175]. La diferenciación entre variedades arábica y robusta, en base a su composición química, analizando ácido clorogénico, cafeína, trigonelina, extracto acuoso, aminoácidos libres totales y polifenoles totales se realizó utilizando CA, PCA y KNN [176].

González *et al.* [177] analizaron tocoferoles y triglicéridos en café mediante HPLC y estudiaron la eficacia de éstos como parámetros de autenticación, para lo que utilizaron PCA y LDA. La diferenciación entre las variedades arábica y robusta se hizo con ambos perfiles, y también estudiaron como cambian los perfiles en el proceso de tueste. Valdenebro *et al.* [178] caracterizaron mezclas de café tostado arábica y robusta usando como parámetros químicos el contenido en esteroides de estas variedades, que se determinó mediante GC. Se determinaron 12 esteroides y se aplicó el PCA, resultando ser el Δ^5 avenasterol un parámetro fundamental para establecer el porcentaje de variedad arábica en mezclas de cafés tostados y comerciales.

Downey y BouSSION [179] y Briandet *et al.* [180] han diferenciado variedades arábica y robusta de café en base a los espectros IR obtenidos. Murota [181] llevó a cabo la diferenciación de las variedades de café en base al perfil de componentes volátiles obtenido mediante GC-MS. El contenido mineral también ha sido utilizado por Krivan *et al.* [182], Anderson *et al.* [183] y Haswell *et al.* [184] para diferenciar tipos de café. Maetzu *et al.* [185] diferenciaron las distintas variedades botánicas y tipos de tostado de café expreso utilizando el análisis de componentes principales y distintos parámetros físicos, químicos y sensoriales.

El contenido metálico ha sido empleado en la diferenciación entre tés negros y verdes [186] y para la determinación de su origen geográfico [187]. Fernández *et al.* [188] que diferenciaron té verde, negro e instantáneo empleando como parámetros químicos el contenido en cafeína y catequinas usando HPLC como técnica de análisis y PCA y LDA como técnicas quimiométricas. Esta diferenciación también se llevó a cabo, utilizando el contenido en estos compuestos y otros alcaloides de la purina, mediante modelado suave independiente por analogía de clases [189]. Los mismos autores emplearon el contenido metálico para diferenciar muestras de té en función de su variedad y origen geográfico [190] e infusiones, té instantáneo y bebidas refrescantes de té [191]. Togari *et al.* [192] clasificaron tipos de té en base a su composición en

componentes volátiles empleando GC-MS para los análisis y CA, PCA, PLS y LDA como técnicas quimiométricas.

Los vinos han sido ampliamente estudiados desde un punto de vista quimiométrico. Latorre *et al.* [193] utilizaron técnicas quimiométricas, como CA, PCA, KNN y SIMCA, para la diferenciación de vinos gallegos con denominación de origen a partir de su contenido en elementos traza. Las determinaciones se efectuaron mediante AAS. Las denominaciones de origen Rias Baixas, Ribeiro y Valdeorras quedan correctamente clasificadas a partir del contenido en litio y rubidio. Frías *et al.* [194] utilizaron técnicas de reconocimiento de patrones para la clasificación de vinos procedentes de las Islas Canarias. Rizzon *et al.* [195] intentaron diferenciar vinos producidos en Brasil, Argentina y Uruguay atendiendo a su contenido metálico. Determinaron el contenido en 11 elementos en vinos de estos países. Mediante análisis de componentes principales llegaron a la conclusión que la mayor capacidad discriminante se debía a litio, magnesio, fósforo, potasio, rubidio, sodio, manganeso y hierro. Los vinos argentinos eran más ricos en litio, sodio, magnesio y fósforo; mientras que los brasileños lo eran en rubidio y manganeso. Los procedentes de Uruguay presentaron una composición mineral intermedia.

Vasconcelos y Chaves [196] caracterizaron tipos de vino de distintas variedades de *Vitis vinifera* analizando el contenido de aminoácidos libres mediante cromatografía de gases capilar y aplicando técnicas tales como CA, PCA y LDA. La composición en aminoácidos se correlacionó en todos los casos con la variedad de uva de la que procedía el vino. El contenido en aminoácidos libres y aminos biogénicas también puede ser utilizado en la diferenciación geográfica, del año de cosecha y el proceso de elaboración [197].

Forcen *et al.* [198] caracterizaron vinos y mostos de Mallorca analizando la composición de algunos compuestos volátiles de las muestras mediante GC junto con otros parámetros. Las técnicas quimiométricas empleadas fueron análisis discriminante múltiple (MDA) y CA. Las variables más discriminantes en el caso de los vinos y de acuerdo con MDA fueron la densidad, el contenido alcohólico, la intensidad del color, el contenido en nitrógeno y cis-3 hexen-1 ol. En el caso de los mostos las variables más discriminantes fueron los grados Baumé, intensidad de color y el contenido en prolina.

En la clasificación por regiones, las variables más importantes resultaron ser acetato de 2-pentiletilo y glicerol en el caso de los vinos y pH y alcohol bencílico en los mostos.

Marengo *et al.* [199] clasificaron vinos Nebbiolo en función del tratamiento con fungicidas que había recibido la uva. Se determinaron 55 variables, 17 en la uva y el resto en muestras de vino. CA permitió separar las muestras en tres clusters, según que el tratamiento se basara en el uso de sulfato de cobre, hidróxido de cobre y Mancozeb.

García Parrilla *et al.* [200] diferenciaron vinagres de vino Sherry atendiendo a su calidad, determinando el perfil fenólico de estas muestras en función del tiempo. Los análisis se llevaron a cabo mediante HPLC con sistema de detección de fotodiodo array. Las técnicas quimiométricas empleadas fueron PCA, LDA y SDA. Las variables que más modificaban su concentración con el tiempo fueron 5-hidroximetilfurfural, ácido gálico, ácido p-hidroxibenzoico, el glicósido del ácido tartárico, ácido p-cumárico e isoquercetrina, lo que indica que son variables útiles para diferenciar los vinagres, sin embargo la composición fenólica resultó insuficiente para conocer la edad del producto.

Benito *et al.* [201] utilizaron veinte parámetros, entre compuestos orgánicos y metales, para llevar a cabo la caracterización de vinagres en función de su Denominación de Origen. Utilizando SIMCA clasificaron correctamente el 93% de las muestras y, mediante redes neuronales artificiales, el 89%. A la hora de diferenciar distintos tipos de vinagres dependiendo del periodo de envejecimiento en barricas de los mismos y de las materias primas de partida se puede utilizar el análisis discriminante lineal, empleando el contenido en compuestos fenólicos como variables [202].

Bellido *et al.* [203] clasificaron y diferenciaron algunos tipos de cerveza utilizando como descriptores químicos doce elementos metálicos, pH, coeficiente de absortividad a 269 nm y conductividad. Las técnicas quimiométricas empleadas fueron ANOVA y LDA. La primera técnica indicó diferencias entre latas y botellas, mientras que la segunda agrupó las muestras según el tipo.

Alcázar *et al.* [204] emplearon, además de PCA y LDA, otros métodos de reconocimiento de patrones basados en redes neuronales artificiales en la discriminación de tipos de cerveza. El contenido en manganeso, fósforo, magnesio y potasio, resultaron ser las variables más importantes para la clasificación de las mismas. Los mismos autores diferenciaron cervezas según su origen geográfico, atendiendo al contenido

mineral de las mismas, empleando análisis en componentes principales y discriminante lineal [205].

Taylor *et al.* [206] estudiaron la aplicación que tenía en la industria cervecera el uso de detectores de aroma electrónicos. Llevaron a cabo un estudio en el que se diferenciaron, determinando el aroma con este tipo de instrumentación y aplicando técnicas quimiométricas, variedades de lúpulo, además de monitorizar el espacio de cabeza de la fermentación y maduración de cervezas tipo lager premium. Mediante medidas de este tipo, Bailey *et al.* [207] diferenciaron cervezas y variedades de lúpulo y malta. Otros autores también utilizan técnicas quimiométricas para llevar a cabo la verificación de las variedades de lúpulo [208-209].

Mangas *et al.* [141] utilizaron la concentración en componentes volátiles y no volátiles para, mediante la aplicación PCA, PLS y SIMCA, diferenciar sidras en base a la formación de espuma. El contenido en polisacáridos ácidos y 1-propanol resultaron las variables más relevantes. Utilizando un modelo de regresión de mínimos cuadrados parciales diferenciaron sidras de manzanas asturianas de las elaboradas con materias primas de otras procedencias [142]. Los autores también caracterizaron brandies de sidra de diferentes edades mediante la evaluación de la composición furánica y fenólica. En primer lugar emplearon CA y PCA para establecer las variables más discriminantes en base a las materias primas y tiempo de envejecimiento [27] y, posteriormente, emplearon LDA, KNN, SIMCA y PLS para llevar a cabo esta caracterización [210]. El contenido en furfural permitió la distinción de brandies de acuerdo con las sidras usadas para obtener el destilado, según fueran frescas o reconstituidas a partir de un concentrado. Para la tipificación de las edades de los destilados, tras la aplicación de las técnicas de modelado, las variables que resultaron más discriminantes fueron el contenido en aldehídos aromáticos y en ácido siríngico. El contenido en azúcares también permitió la clasificación de estos destilados en base a su edad y al tipo de roble del que estaban hechas las barricas para su envejecimiento [26].

Los métodos de ANN también fueron usados por Cameán *et al.* [211] para la diferenciación de brandies españoles (Sherry y Penedés) atendiendo a la concentración encontrada para once metales. Gómez y Bartolomé [212] clasificaron brandies españoles en función de su calidad a partir del contenido fenólico de los mismos, pH y

color, observando la distribución de las muestras en el espacio definido por los dos primeros componentes principales.

Wilson *et al.* [213] clasificaron tipos de whiskies en base a su contenido en metanol y a su contenido en aceites de fusel, determinados mediante cromatografía de gases. González-Arjona *et al.* [214] también usaron los aceites de fusel como descriptores para diferenciar whiskies irlandeses.

Otros autores han diferenciado ron [215], aguardiente [216] y otras bebidas alcohólicas [217] aplicado técnicas de reconocimiento de patrones.

I.6. Bibliografía

1. C. Delgado. El libro de los aguardientes y licores. Alianza Editorial, S.A. Madrid, 1995.
2. A. Valiente-Barderas. Historia de la destilación. *Educación Química*, **1996**, 7, 76-82.
3. J. Muñoz Ramos, Enciclopedia de los Alcoholes, Editorial Planeta S. A., Barcelona, 2002.
4. Reglamento (CEE) núm. 1576/89, 29-5-1989 (DOCE 12-6-1989, núm. L 160, P. 0001-0017).
5. Orden Ministerial 18-11-1994, Ministerio Agricultura, Pesca y Alimentación (BOE 28-11-1994, núm. 284, pág. 36350).
6. Real Decreto 25-11-1988, nº 1424/1988, Ministerio de Relaciones con las Cortes y de Secretaría del Gobierno (BOE 1-12-1988, núm. 288, pág. 34033).
7. Orden Ministerial 10-9-1952, Ministerio de Industria (BOE 12-10-1952, núm. 286, pág. 4683).
8. Enciclopedia Microsoft® Encarta® 2002. © 1993-2001 Microsoft Corporation.
9. D.R.A.E.
10. Diccionario Enciclopédico Ilustrado Durvan. Durvan S.A. de Ediciones. Bilbao, 1987.
11. Real Decreto 5-3-1982, nº 644/1982, Presidencia del Gobierno (BOE 2-4-1982, núm. 79, pág. 8630)
12. M. J. González, M. C. Martínez, M. V. Aguilar. Determination of Fe, Cu, Zn, Mn, and Pb in D.O.C. Méntrida wines. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*, **1988**, 187, 325-329.
13. M. Pérez. Analytical and toxicological aspects of metals in wine. *Revue des Enologues et des Techniques Viticoles et Enologiques*, **1991**, 61, 19-20.
14. C. Fernández. The importance of metallic elements in wine, a literature survey. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*, **1988**, 186, 295-300.
15. S. Galani-Nikolakaki, N. Kallithrakas-Kontos, A. A. Katsanos. Trace element analysis of Cretan wines and wine products. *The Science of the Total Environment*, **2002**, 285, 155-163.

16. Orden Ministerial 28-5-1998, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (BOE 2-6-1998, núm. 131, pág. 18028).
17. F. F. López, C. Cabrera, M. L. Lorenzo, M. C. López. Aluminium content in foods and beverages consumed in the Spanish diet. *Journal of Food Science*, **2000**, 65, 206-210.
18. E. Lendinez, M. C. López, C. Cabrera, M. L. Lorenzo. Determination of chromium in wine and other alcoholic beverages consumed in Spain by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Journal of AOAC International*, **1998**, 8, 1043-1047.
19. M. R. Bronze, L. F. Vilas Boas, A. P. Belchior. Analysis of old brandy and oak extracts by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, **1997**, 768, 143-152.
20. G. J. Soleas, J. Yan, K. Hom, D. M. Goldberg. Multiresidue analysis of seventeen pesticides in wine by gas chromatography with mass-selective detection. *Journal of Chromatography A*, **2000**, 882, 205-215.
21. H. F. Graham. Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, **2003**, 86, 11-22.
22. D. M. Goldberg, B. Hoffman, J. Yang, G. J. Soleas. Phenolic constituents, furans, and total antioxidant status of distilled beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1999**, 47, 3978-3985.
23. D. M. Goldberg, G. J. Soleas, M. Levesque. Moderate alcohol consumption: the gentle face of Janus. *Clinical Biochemistry*, **1999**, 32, 505-518.
24. M. C. Vidal-Carou, F. Lahoz-Portolés, S. Bover-Cid, A. Mariné-Font. Ion-pair high-performance liquid chromatographic determination of biogenic amines and polyamines in wine and other alcoholic beverages. *Journal of Chromatography A*, **2003**, 998, 235-241.
25. M. Aresta, M. Boscolo, D. W. Franco. Copper (II) catalysis in cyanide conversion into ethyl carbamate in spirits and relevant reactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2001**, 49, 2819-2824.
26. 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.

27. J. Mangas, R. Rodríguez, J. Moreno, B. Suárez, D. Blanco. Evolution of aromatic and furanic congeners in the maturation of cider brandy: a contribution to its characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1996**, 44, 3303-3307.
28. J. Jaganathan, S. M. Dugar. Authentication of straight whisky by determination of the ratio of furfural to 5- hydroxymethyl-2-furaldehyde. *Journal of the AOAC International*, **1999**, 82, 997-1001.
29. V. Moreno-Arribas, E. Pueyo, F. J. Nieto, P. J. Martín-Álvarez, M. C. Polo. Influence of the polysaccharides and the nitrogen compounds on foaming properties of sparkling wines. *Food Chemistry*, **2000**, 70, 309-317.
30. T. Fernández-García, M. E. Martín, A. Casp. Quantification of significant volatile components of pacharán. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, **1998**, 206, 414-416.
31. V. Andrea, N. Nadia, R. M. Teresa, A. Andrea. Analysis of some Italian lemon liquors (Limomcello). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2003**, 51, 4978-4983.
32. S. C. Diéguez, M. L. G. de la Peña, E. F. Gomez. Approaches to spirit aroma: contribution of some aromatic compounds to the primary aroma in samples of orujo spirits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2003**, 51, 7385-7390.
33. S. O. Mueller, M. Schmitt, W. Dekant, H. Stopper, J. Schlatter, P. Schreier, W. K. Lutz. Occurrence of emodin, chrysophanol and physcion in vegetables, herbs and liquors. Genotoxicity and anti-genotoxicity of the anthraquinones and of the whole plants. *Food and Chemical Toxicology*, **1999**, 37, 481-491.
34. Directiva (CEE) núm. 88/388, 22-6-1988 (DOCE 15-7-1988, núm L 184, P. 0061-0066).
35. Directiva (CEE) núm. 94/36, 30-6-1994 (DOCE 10-9-1994, núm. L 237 P. 0013-0029).
36. Orden 8-5-1987, Ministerio de Relaciones con las Cortes y de Secretaria del Gobierno (BOE 13-5-1987, núm. 114, pág. 13973)
37. M. Olalla, M. C. González, C. Cabrera, C. López. Optimised determination of iron in grape juice, wines, and other alcoholic beverages by atomic absorption spectrometry. *Journal of AOAC International*, **2000**, 83, 189-195.

38. G. P. Molinari, M. Trevisan, P. Natali, A. A. M. Del Re. Determination of tin in wines and sugar beets by means of atomic absorption spectroscopy with hydride generation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1987**, 35, 727-731.
39. Y. Pomeraz, C. E. Meloan. Food Analysis: Theory and Practice, Chapman and Hall, New York, 1994.
40. C. Cabrera, Y. Madrid, C. Cámara. Determination of lead in wine, other beverages and fruit slurries by flow injection hydride generation atomic absorption spectrometry with on-line microwave digestion. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **1994**, 9, 1423-1426.
41. C. 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 Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1997**, 45, 1812-1815.
42. C. Mena, C. Cabrera, M. L. Lorenzo, M. C. López. Cadmium levels in wine, beer and other alcoholic beverages: possible sources of contamination. *The Science of the Total Environment*, **1996**, 181, 201-208.
43. 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.
44. F. F. López, C. Cabrera, M. L. Lorenzo, M. C. López. Aluminum Content in Foods and Beverages Consumed in the Spanish Diet. *Journal of Food Science*, **2000**, 65, 206-210.
45. F. F. López, C. Cabrera, M. L. Lorenzo, M. C. López. Aluminium content of drinking waters, fruit juices and soft drinks: contribution to dietary intake. *The Science of the Total Environment*, **2002**, 292, 205-213.
46. J. Goossens, T. Smaele, L. Moens, R. Dams. Accurate determination of lead in wines by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, **1993**, 347, 119-125.
47. V. Stefanova, V. Kmetov, L. Futekov, D. Georgieva. Direct flow-injection multielement analysis of hard drinks by upgraded Elan-500 ICP MS. *Analytical Laboratory*, **1997**, 6, 31-42.

48. C. Baluja-Santos, A. González-Portal. Application of hydride generation to atomic-absorption spectrometric analysis of wines and beverages: a review. *Talanta*, **1992**, 39, 329-339.
49. C. C. Vique, P. L. Teissedre, M. T. Cabanis, J. C. Cabanis. Determination of platinum in wine by graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Journal of AOAC International*, **1997**, 80, 57-62.
50. P. L. Teissedre, C. C. Vique, M. T. Cabanis, J. C. Cabanis. Determination of nickel in French wines and grapes. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1998**, 49, 205-210.
51. S. Catarino, A. S. Curvelo, R. Bruno de Sousa. Determination of aluminum in wine by graphite furnace AAS: Validation of analytical method. *Atomic Spectroscopy*, **2002**, 23, 196-200.
52. A. J. McKinnon, R. W. Cattrall, G. R. Scollary. Aluminum in wine - its measurement and identification of major sources. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1992**, 43, 166-170.
53. G. P. G. Freschia, C. S. DakuzaKu, M. Moraes, J. A. Nóbrega, J. A. Gomes. Simultaneous determination of cadmium and lead in wine by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta*, **2001**, 56B, 1987-1993.
54. A. Escobal, C. Iriondo, C. Laborra, E. Ulibarrena. Application of FAAS and GFAAS to the control of cloudiness in Txakoli wine. *Atomic Spectroscopy*, **1995**, 16, 162-164.
55. L. Jorhem, B. Sundstroem. Direct determination of lead in wine using graphite furnace AAS. *Atomic Spectroscopy*, **1995**, 16, 226-228.
56. P. A. Brereton, P. Robb, C. M. Sargent, H. M. Crews, R. Wood. Determination of lead in wine by graphite furnace atomic absorption spectrophotometry: interlaboratory study. *Journal of AOAC International*, **1997**, 80, 1287-1297.
57. S. Mannino. Application of potentiometric anodic-stripping analysis to the determination of metals in foods. *Rivista della Società Italiana di Scienza dell'Alimentazione*, **1986**, 15, 11-16.
58. P. Ostapczuk, H. R. Eschnauer, G. R.; Scollary. Determination of cadmium, lead and copper in wine by potentiometric stripping analysis. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, **1997**, 358, 723-727.

59. P. J. S. Barbeira, N. R. Stradiotto. Simultaneous determination of trace amounts of zinc, lead and copper in rum by anodic stripping voltammetry. *Talanta*, **1997**, 44, 185-188.
60. V. S. Ijeri, A. K. Srivastava. Voltammetric determination of lead at chemically modified electrodes based on crown ethers. *Analytical Science*, **2001**, 17, 605-608.
61. S. Canas, M. C. Leandro, M. I. Spranger, A. P. Belchior. Low molecular weight compounds of chestnut wood (*Canastea sativa L.*) and corresponding aged brandies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1999**, 47, 5023-5030.
62. S. Canas, A. P. Belchior, M. I. Spranger, R. Bruno-de-Sousa. High-performance liquid chromatography method for analysis of phenolic acids, phenolic aldehydes, and furanic derivatives in brandies. Development and validation. *Journal of Separation Science*, **2003**, 26, 496-502.
63. S. Pascual-Teresa, D. Treutter, J. C. Rivas-Gonzalo, C. Santos-Buelga. Analysis of flavanols in beverages by high-performance liquid chromatography with chemical reaction detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1998**, 46, 4209-4213.
64. S. M. Bettin, W. D. Isique, D. W. Franco, M. L. Andersen, S. Knudsen, L. H. Skibsted. Phenols and metals in sugar-cane spirits. Quantitative analysis and effect on radical formation and radical scavenging. *European Food Research and Technology*, **2002**, 215, 169-175.
65. I. McMurrough, J. R. Byrne. HPLC analysis of bittering substances, phenolic compounds, and various compounds of alcoholic beverages. *Food Science and Technology*, **1992**, 52, 579-641.
66. M. E. Fernandez, J. Quesada, M. Villalon, M. C. López. Comparison of methods for determining coumarins in distilled beverages. *Food Chemistry*, **2000**, 70, 251-258.
67. M. E. Fernandez, J. Quesada, M. Villalon, M. C. López. Factors that influence the presence of coumarins in alcoholic beverages in barrels from oak wood. *Alimentaria*, **2001**, 320, 127-135.
68. I. Nicoletti, C. Corradini, E. Cogliandro, D. Corradini. Identification and dosage of 2-furaldehyde and 5-hidroxymetil-2-furaldehyde in beverages by reversed phase chromatography with a microbore column. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, **1996**, 19, 1241-1254.

69. G. P. Cartoni, F. Coccioli, M. Spagnoli. Analysis of ethereal extracts of wines and other alcoholic beverages by high performance liquid chromatography with microbore columns. *Journal of chromatography A*, **1997**, 782, 219-226.
70. M. Villalon, J. Quesada, H. López, M. C. López. High performance liquid chromatography determination of furanic compounds in commercial brandies and caramels. *Journal of liquid Chromatography*, **1992**, 153, 513-524.
71. Z. Loukou, A. Zotou. Determination of biogenic amines as dansyl derivatives in alcoholic beverages by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection and characterization of the dansylated amines by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **2003**, 996, 103113.
72. A. Zotou, Z. Loukou, E. Soufleros, I. Stratis. Determination of biogenic amines in wines and beers by high performance liquid chromatography with pre-column dansylation and ultraviolet detection. *Chromatographia*, **2003**, 57, 429-439.
73. Z. Loukou, A. Zotou. A comparative survey of the simultaneous ultraviolet and fluorescence detection in RP-HPLC determination of dansylated biogenic amines in alcoholic beverages. *Chromatographia*, **2003**, 58, 579-585.
74. P. Herbert, L. Santos, M. Bastos, P. Barros, A. Alaves. New HPLC method to determine ethyl carbamate in alcoholic beverages using fluorescence detection. *Journal of Food Science*, **2002**, 67, 1616-1620.
75. P. Currò, G. Micali, F. Lanuzza. Determination of β -asarone, safrole, isosafrole and anethole in alcoholic drinks by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, **1987**, 404, 273-278.
76. G. Micali, F. Lanuzza, P. Curro. High-performance liquid chromatographic determination of the biologically active principle hypericin in phytoterapeutic vegetable extracts and alcoholic beverages. *Journal of Chromatography A*, **1996**, 731, 336-339.
77. G. Micali, F. Lanuzza. HPLC determination of α - and β -thujone, potentially toxic components of natural flavorings, in alcoholic beverages. *Flavour and Fragrance Journal*, **1995**, 10, 329-333.
78. F. Zonta, P. Bogoni, P. Masotti, G. Micali. High-performance liquid chromatographic profiles of aloe constituents and determination of aloin in beverages,

with reference to the EEC regulation for flavoring substances. *Journal of Chromatography A*, **1995**, 718, 99-106.

79. V. Ferreira, P. Hernández-Orte, A. Escudero, R. López, J. Cacho. Semipreparative reversed-phase liquid chromatographic fractionation of aroma extracts from wine and other alcoholic beverages. *Journal of Chromatography A*, **1999**, 864, 77-88.

80. P. R. N. Carvalho, C. H. Collins. HPLC determination of carminic acid in foods and beverages using diode array and fluorescence detection. *Chromatographia*, **1997**, 45, 63-66.

81. C. Da Porto, L. Pizzale, M. Bravin, L. S. Conte. Analyses of orange spirit flavour by direct-injection gas chromatography-mass spectrometry and headspace solid-phase microextraction/GC-MS. *Flavour and Fragrance Journal*, **2003**, 18, 66-72.

82. S. E. Ebeler, G. M. Sun, M. Datta, P. Stremple, A. K. Vickers. Solid-phase microextraction for enantiomeric analysis of flavors in beverages. *Journal of AOAC International*, **2001**, 84, 479-485.

83. Lay-Keow Ng. Analysis by gas chromatography/mass spectrometry of fatty acids and esters in alcoholic beverages and tobaccos. *Analytica Chimica Acta*, **2002**, 465, 309-318.

84. S. C. Diéguez, L. D. Díaz, M. L. G. de la Peña, E. F. Gómez. Variation of volatile organic acid during storage at low and room temperatures. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, **2002**, 35, 452-457.

85. J. Pino, M. P. Martí, m. Mestres, J. Pérez, 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.

86. J. M. Conner, L. Bikmyre, A. Paterson, J. R. Piggott. Headspace concentrations of ethyl esters at different alcoholic strengths. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **1998**, 77, 121-126.

87. S. E. Ebeler, M. B. Terrien, C. E. Butzke. Analysis of brandy aroma by solid-phase microextraction and liquid-liquid extraction. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **2000**, 80, 625-630.

88. G. Fitzgerald, K. J. James, K. MacNamara, M. A. Stack. Characterisation of wiskeys using solid-phase microextraction with gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **2000**, 896, 351-359.

89. L.-K. Ng, P. Lafontaine, J. Harnois. Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of acids and phenols in distilled alcohol beverages. Application of anion-exchange disk extraction combined with in-vial elution and silation. *Journal of Chromatography A*, **2000**, 873, 29-38.
90. P. Brereton, S. Hasnip, A. Bertrand, R. Wittkowski, C. Guillou. Analytical methods for the determination of spirit drinks. *Trends in analytical Chemistry*, **2003**, 22, 19-25.
91. E. Leclaire, R. Cantagrel, L. Maignial, G. Snackers, G. Ferrari. Characterization of young cognac aroma. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, **1999**, 33, 133-141.
92. O. Lablanque, G. Snackers, R. Cantagrel, G. Ferrari. Characterisation of young Cognac spirit aromatic quality. *Analitica Chimica Acta*, **2002**, 458, 191-196.
93. H. Guichard, S. Lemesle, J. Ledauphin, D. Barillier, B. Picoche. Chemical and sensorial aroma characterization of freshly distilled Calvados. 1. Evaluation of quality and defects on the basis of key odorants by olfactometry and sensory analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2003**, 51, 424-432.
94. J. Ledauphin, H. Guichard, J. F. Saint-Clair, B. Picoche, D. Barillier. Chemical and sensorial aroma characterization of freshly distilled Calvados. 2. Identification of volatile compounds and key odorants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2003**, 51, 433-442.
95. V. A. Watts, C. E. Butzke, R. B. Boulton. Study of aged cognac using solid-phase microextraction and partial least-squares regression. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2003**, 51, 7738-7742.
96. 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.
97. 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.
98. W. Wardencki, J. Orlita, J. Namiesnik. Comparison of extraction techniques for gas chromatographic determination of volatile carbonyl compounds in alcohols. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, **2001**, 369, 661-665.

99. M. Lau, J. D. Ebeler, S. E. Ebeler. Gas chromatographic analysis of aldehydes in alcoholic beverages using a cysteamine derivatization procedure. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1999**, 50, 324-333.
100. I. G. Casella, M. Contursi, E. Desimoni. Amperometric detection of sulfur-containing compounds in alkaline media. *Analyst*, **2002**, 127, 647-652.
101. R. D. M. Prentice, G. McKernan, J. H. Bryce. A source of dimethyl disulfide and dimethyl trisulfide in grain spirit produced with a Coffey still. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, **1998**, 56, 99-103.
102. A. Z. Carvalho, J. A. F. da Silva, C. L. do Lago. Determination of mono- and disaccharides by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. *Electrophoresis*, **2003**, 24, 2138-2143.
103. M. V. G. Moreno, C. J. Jurado, C. G. Barroso. Method devised for determining low molecular weight organic acids in vinic samples by capillary electrophoresis: validation of the method with real samples. *European Food Research and Technology*, **2001**, 213, 381-385.
104. M. V. G. Moreno, C. J. Jurado, C. G. Barroso. Determination of organic acids by capillary electrophoresis with simultaneous addition of Ca and Mg as complexing agents. *Chromatographia*, **2003**, 57, 185-189.
105. M. R. Bronze, L. F. Vilas Boas, A. P. Belchior. Analysis of old brandy and oak extracts by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, **1997**, 768, 143-152.
106. G. Cartoni, F. Coccioli, R. Jasionowska. Capillary electrophoretic separation of phenolic acids. *Journal of Chromatography A*, **1995**, 709, 209-214.
107. A. Panosyan, G. Mamikonyan, M. Torosyan, E. Gabrielyan, S. Mkhitarian. Analysis of aromatic aldehydes in brandy and wine by high-performance capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry*, **2001**, 73, 4379-4383.
108. I. Haumann, J. Boden, A. Mainka, U. Jegle. Simultaneous determination of inorganic anions and cations by capillary electrophoresis with indirect UV detection. *Journal of Chromatography A*, **2000**, 895, 269-277.
109. V. C. Trenerry. The determination of the sulphite content of some foods and beverages by capillary electrophoresis. *Food Chemistry*, **1996**, 55, 299-603.

110. M. J. L. Castanon, A. J. M Ordieres, P. T. Blanco. Amperometric detection of ethanol with poly-(*o*-fenilenediamine)-modified enzyme electrodes. *Biosensors & Bioelectronics*, **1997**, 12, 511-520.
111. A. Morales, F. Cespedes, E. Martinez-Fabregas, S. Alegret. Ethanol amperometric biosensor based on alcohol oxidase-graphite-polymer biocomposite. *Electrochimica Acta*, **1998**, 43, 3575-3579.
112. A. de Prada, N. Pena, M. L. Mena, A. J. Reviejo, J. M. Pingarron. Graphite-Teflon composite bienzyme amperometric biosensors for monitoring of alcohols. *Biosensors & Bioelectronics*, **2003**, 18, 1279-1288.
113. B. Leca, J.-L. Marty. Reusable ethanol sensor based on a NAD⁺-dependent dehydrogenase without coenzyme addition. *Analytica Chimica Acta*, **1997**, 340, 143-148.
114. B. Leca, J.-L. Marty. Reagentless ethanol sensor based on a NAD-dependent dehydrogenase. *Biosensors & Bioelectronics*, **1997**, 12, 1083-1088.
115. A. S. Santos, R. S. Freire, L. T. Kubota. Highly stable amperometric biosensor for ethanol based on Meldola's blue adsorbed on silica gel modified with niobium oxide. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **2003**, 547, 135-142.
116. M. Nuculescu, S. Sigina, E. Csoeregi. Glycerol dehydrogenase based amperometric biosensor for monitoring of glycerol in alcoholic beverages. *Analytical Letters*, **2003**, 36, 1721-1737.
117. T. Noguer, J.-L. Marty. Reagentless sensors for acetaldehyde. *Analytical Letters*, **1997**, 30, 1069-1080.
118. T. R. L. C Paixao, D. Corbo, M. Bertotti. Amperometric determination of ethanol in beverages at copper electrodes in alkaline medium. *Analytica Chimica Acta*, **2002**, 472, 123-131.
119. G. J. Mohr, D. Citteiro, U. E. Spichiger-Keller. Development of chromogenic reactants for optical sensing of alcohols. *Sensors and Actuators*, **1998**, B49, 226-234.
120. G. J. Mohr, U. E. Spichiger-Keller. Novel fluorescent sensor membranes for alcohols based on *p*-N,N-Dioctylamino-4'-trifluoroacetylstilbeno. *Analytica Chimica Acta*, **1997**, 351, 189-196.

121. P. Blum, G. J. Mohr, K. Matern, J. Reichert, U. E. Spichiger-Keller. Optical alcohol sensor using lipophilic Reichardt's dyes in polymer membranes. *Analytica Chimica Acta*, **2001**, 432, 269-275.
122. S. L. Wiskur, E. V. Anslyn. Using a synthetic receptor to create an optical-sensing ensemble for a class of analytes: a colorimetric assay for the aging of Scotch. *Journal of the American Chemical Society*, **2001**, 123, 10109-10110.
123. F. Iglesia, F. Lazaro, R. Puchades, A. Maquieira. Automatic determination of 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF) by a flow-injection method. *Food Chemistry*, **1997**, 60, 245-250.
124. A. D. Magri, A. L. Magri, F. Balestrieri, A. Sacchini, D. Marini. Spectrophotometric micromethod for the determination of ethanol in commercial beverages. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, **1997**, 357, 985-988.
125. M. Mariaud, P. Levillain. New quantitative determination of 2,3-dioxobutane (diacetyl) in alcoholic beverages by an indirect spectrofluorometric procedure with use 2,3-diaminonaphthalene as derivatization reagent. *Talanta*, **1994**, 41, 75-79.
126. S. I. Montalvo, J. D. Ingle. Chemiluminescence during the oxidation of alcohol by permanganate: application to the determination of ethanol in gin. *Talanta*, **1993**, 40, 167-172.
127. M. J. Navas. A. M. Jimenez. Chemiluminiscent methods in alcoholic beverages analysis. *Journal of agricultural and food chemistry*, **1999**, 47, 183-189.
128. E. K. Kemsley, R. H. Wilson, P. S. Belton. Potential of Fourier transform infrared spectroscopy and fiber optics for process control. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1992**, 40, 435-438.
129. M. Gallignani, S Garrigues, M. Guardia. Derivative Fourier transform infrared spectrometric determination of ethanol in alcoholic beverages. *Analytica Chimica Acta*, **1994**, 287, 275-283.
130. A. Pérez-Ponce, M. Guardia, Partial least-squares-Fourier transform infrared spectrometric determination of methanol and ethanol by vapor-phase generation. *Analyst*, **1998**, 123, 1253-1258.
131. M. E. Lafargue, M. H. Feinberg, J.-J. Daudin, D. N. Rutledge. Homogeneity check of agricultural and food industries samples using near infrared spectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2003**, 375, 496-504.

132. A. Kauffman. Multivariate Statistics as a classification tool in the food laboratory. *Journal of AOAC International*, **1997**, 80, 665-675.
133. Piggot, J. R. (Ed.). Statistical procedures in food research, Elsevier Applied Science, Londres, **1986**.
134. B. R. Kowalski, C. F. Bender. Pattern Recognition. A powerful approach to interpreting chemical data. *Journal of the American Chemical Society*, **1972**, 94, 5632-5639.
135. B. R. Kowalski, C. F. Bender. Pattern Recognition. II. Linear and nonlinear methods for displaying chemical data. *Journal of the American Chemical Society*, **1972**, 95, 686-693.
136. W. O. Kwan, B. R. Kowalski. Classification of wines by applying pattern recognition to chemical-composition data. *Journal of Food Science*, **1978**, 43, 1320-1323.
137. W. O. Kwan, B. R. Kowalski, R. K. Skogerboe. Pattern Recognition analysis of elemental data. Wines of *Vitis vinifera* cv. Pinot Noir from France and United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1979**, 27, 1321-1326.
138. J. J. Mangas, R. Rodríguez, B. Suarez, A. Picinelli, E. Dapena. Study of the phenolic profile of cider apple cultivars at maturity by multivariate techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1999**, 47 (10), 4046-4052.
139. D. Blanco, J. J. Mangas, I. Margolles, P. Arias. Characterization of cider apples on the basis of their fatty acid profiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2002**, 50 (5), 1097-1100.
140. D. Blanco, I. Herrero, J. J. Mangas. Characterisation of apple cider cultivars by chemometric techniques using data from high-performance liquid chromatography and flow injection analysis. *Analyst*, **1998**, 1187-1191.
141. J. J. Mangas, J. Moreno, R. Rodriguez, A. Picinelli, B. Suarez. Analysis of polysaccharides in cider: their effect on sensory foaming properties. *Journal of agricultural and Food Chemistry*, **1999**, 47, 152-156.
142. A. Picinelli, B. Suarez, J. Moreno, R. Rodriguez, L. M. Caso-Garcia, J. J. Mangas. Chemical characterization of Asturian cider. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2000**, 48, 3997-4002.

143. C. M. Lanza, E. Pagliarini, G. Lanza. Study of the shelf-life of cured cv Tarocco oranges by sensory and physicochemical parameters. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **2000**, 80, 241-246.
144. F. S. Kittur, N. Saroja, Habibunnisa, R. N. Tharanathan, Polysaccharide-based composite coating formulations for shelf-life extension of fresh banana and mango. *European Food Research and Technology*, **2001**, 213, 306-311.
145. M. Esti, L. Cinquanta, F. Sinesio, E. Moneta, M. Di Matteo. Physicochemical and sensory fruit characteristics of two sweet cherry cultivars after cool storage. *Food Chemistry*, **2002**, 76, 399-405.
146. T. Lavilla, I. Recasens, M. L. López, J. Puy. Multivariate analysis of maturity stages, including quality and aroma, in “Royal Glory” peaches and “Big Top” nectarines. *Journal of the science of Food and Agriculture*, **2002**, 82, 1842-1849.
147. P. M. Padin, R. M. Pena, S. Garcia, C. Herrero, R. Iglesias, S. Barro. Characterization of Galician (N. W. Spain) quality brand potatoes: a comparison study of several pattern recognition techniques. *Analyst*, **2001**, 126, 97-103.
148. R. M. Pena, S. García, R. Iglesias, S. Barro, C. Herrero. Authentication of Galician (N. W. Spain) quality brand potatoes using metal analysis. Classical pattern recognition techniques versus a new vector quantization-based classification procedure. *Analyst*, **2001**, 126, 2186-2193.
149. K. A. Anderson, B. A. Magnuson, M. L. Tschirgi, B. Smith. Determining the geographic origin of potatoes with trace metal analysis using statistical and neural networks classifiers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1999**, 47, 1568-1575.
150. E. Barrado, F. Jimenez, F. Prieto, C. Nuevo. The use of fatty-acid profiles of the lipids of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to differentiate tissue and dietary feed. *Food Chemistry*, **2003**, 81, 13-20.
151. F. De la Rosa, E. Barrado, M. Vega, R. Pardo. Multivariate analysis applied to the study of the changes produced in fatty acid composition of shellfish species after cooking. *Química Analítica*, **1998**, 17, 131-137.
152. I. E. Bechmann, H. S. Jensen, N. Boknaes, K. Warm, J. Nielsen. Prediction of chemical, physical and sensory data from process parameters for frozen cod using multivariate analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **1998**, 78, 329-336.

153. I. González, J. L. Pérez, C. González, J. Hernández, N. Álvarez. Differentiation of products derived from Iberian breed swine by electronic olfactometry (electronic nose). *Analytica Chimica Acta*, **2000**, 424, 279-287.
154. R. Sacchi, L. Mannina, P. Fiordiponti, P. Barone, L. Paolillo, M. Patumi, A. Segre. Characterization of Italian Extra Virgin olive oils using ¹H-NMR spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1998**, 46, 3947-3951.
155. L. Giansante, D. Di Vincenzo, G. Bianchi. Classification of monovarietal Italian olive oils by unsupervised (PCA) and supervised (LDA) chemometrics. *Journal of the Science and Food Agriculture*, **2003**, 83, 905-911.
156. F. Pena, S. Cardenas, M. Gallego, M. Varcарcel. Characterization of olive oil classes using a chemsensor and pattern recognition techniques. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **2002**, 79, 1103-1108.
157. S. M. Scott, D. James, Z. Ali, W. T. O'Hare, F. J. Rowell. Total luminescence spectroscopy with pattern recognition for classification of edible oils. *Analyst*, **2003**, 128, 966-973.
158. M. C. Cerrato, J. L. Pérez, C. García, M. E. Fernández, B. Moreno, M. Forina. Electronic nose based on metal oxide semiconductor sensors as a fast alternative for the detection of adulteration of virgin olive oils. *Analytica Chimica Acta*, **2002**, 459, 219-228.
159. V. G. Dourtoglou, T. Dourtoglou, A. Antonopoulos, E. Stefanou, S. Lalas, c. Poulos. Detection of olive oil adulteration using principal component analysis applied on total and regio FA content. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **2003**, 80, 203-208.
160. M. Decker, B. Ronn, S. S. Jorgensen. Thermally assisted in-line methylation and gas chromatography with statistical data analysis for determination of fatty acid distribution and fingerprinting of plant seeds and oils. *European Food Research and Technonolgy*, **2000**, 211, 366-373.
161. R. Pena, C. Herrero. Pattern recognition analisis applied to classification of honeys from two geographic origins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1993**, 41, 560-564.

162. B. López, M. J. Latorre, M. I. Fernández, M. A. García, S. García, C. Herrero. Chemometric classification of honeys according to their type based on quality control data. *Food Chemistry*, **1996**, 55, 281-287.
163. M. J. Latorre, R. Peña, C. Pita, A. Botana, S. García, C. Herrero. Chemometric classification of honeys according to their type. II. Metal content data. *Food Chemistry*, **1999**, 66, 263-268.
164. M. J. Latorre, R. Pena, S. Garcia, C. Herrero. Authentication of Galician (N.W. Spain) honeys by multivariate techniques based on metal content data. *Analyst*, **2000**, 125, 307-312.
165. A. Terrab, J. M. Vega, M. J. Diez, F. J. Heredia. Characterisation of northwest Moroccan honeys by gas chromatographic-mass spectrometric analysis of their sugar components. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **2002**, 82, 179-185.
166. A. Terrab, M. J. Diez, F. J. Heredia. Characterization of Moroccan unifloral honeys by their physicochemical characteristics. *Food Chemistry*, **2002**, 79, 376-379.
167. A. Terrab, A. G. González, M. J. Diez, F. J. Heredia. Mineral content and electrical conductivity of the honeys produced in Northwest Morocco and their contribution to the characterisation of unifloral honeys. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **2003**, 83, 637-643.
168. A. Terrab, A. G. González, M. J. Diez, F. J. Heredia. Characterisation of Moroccan unifloral honeys using multivariate analysis. *European Food Research and Technonolgy*, **2003**, 218, 88-95.
169. J. Devillers, J. C. Dore, M. Marengo, F. Poirier-Duchene, N. Galand, C. Viel. Chemometrical analysis of 18 metallic and nonmetallic elements found in honeys sold in France. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2002**, 50, 5998-6007.
170. P. M. Cometto, P. F. Faye, R. D. Di Paola, M. A. Rubio, M. A. J. Aldao. Comparison of free amino acids profile in Honey from three Argentinean regions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2003**, 51, 5079-5087.
171. C. B. Y. Cordella, J. S. L. T. Militao, M.-C. Clement, D. Cabrol-Bass. Honey characterization and adulteration detection by pattern recognition applied on HPAEC-PAD profiles. 1. honey floral species characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2003**, 51, 3234-3242.

172. M.J. Martín, F. Pablos, A.G. González. Application of pattern recognition to the discrimination of roasted coffees. *Analytica Chimica Acta*, **1996**, 320, 191-197.
173. M. J. Martín, F. Pablos, A. G. González. Characterization of green coffee varieties according to their metal content. *Analytica Chimica Acta*, **1998**, 358, 177-183.
174. M. J. Martín, F. Pablos, A. G. González. Characterization of *arabica* and *robusta* roasted coffee varieties and mixture resolution according to their metal content. *Food Chemistry*, **1999**, 66, 365-370.
175. M. J. Martín, F. Pablos, A. G. González, M. S. Valdenebro, M. L. Camacho. Fatty acid profiles as discriminant parameters for coffee varieties differentiation. *Talanta*, **2001**, 54, 291-297.
176. M. J. Martín, F. Pablos, A. G. González. Discrimination between arabica and robusta green coffee varieties according to their chemical composition. *Talanta*, **1998**, 46, 1259-1264.
177. A. G. González, F. Pablos, M. J. Martín, M. Leon-Camacho, M. S. Valdenebro. HPLC analysis of tocopherols and triglycerides in coffee and their use as authentication parameters. *Food Chemistry*, **2001**, 73, 93-101.
178. M. S. Valdenebro, M. Leon-Camacho, F. Pablos, A. G. Gonzalez, M. J. Martin. Determination of the arabica/robusta composition of roasted coffee according to their sterol content. *Analyst*, **1999**, 124, 999-1002.
179. G. Downey, J. Bousson. Authentication of coffee bean variety by near-infra-red reflectance spectroscopy of dried extract. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **1996**, 71, 41-49.
180. R. Briandet, E. K. Kemsley, R. H. Wilson. Discrimination of *Arabica* and *Robusta* in instant coffee by Fourier-transform infra-red spectroscopy and chemometrics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1996**, 44, 170-174.
181. J. Murota. Canonical discriminant analysis applied to the headspace GC profiles of coffee cultivars. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **1993**, 57, 1043-1048.
182. V. Krivan, P. Barth, A. Feria-Morales. Multi-element analysis of green coffee and its possible use for the determination of origin. *Mikrochimica Acta*, **1993**, 110, 217-236.

183. K. A. Anderson, B. W. Smith. Chemical profiling to differentiate geographic growing origins of coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2002**, 50, 2068-2075.
184. S. J. Haswell, A. D. Walmsley. Multivariate data visualization methods based on multi-elemental analysis of wines and coffees using total reflection X-ray fluorescence analysis. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **1998**, 13, 131-134.
185. L. Maetzu, S. Andueza, C. Ibañez, M. P. de Pena, J. Bello, C. Cid. Multivariate methods for characterization and classification of espresso coffees from different botanical varieties and types of roast by foam, taste and mouthfeel. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2001**, 49, 4743-4747.
186. M. A. Herrador, A. G. González. Pattern recognition procedures for differentiation of Green, Black and Oolong teas according to their metal content from inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *Talanta*. **2000**, 53, 1249-1257.
187. A. Marcos, A. Fisher, G. Rea, S. J. Hill. Preliminary study using trace-element concentrations and a chemometrics approach to determine the geographical origin of tea. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **1998**, 13, 521-525.
188. P. L. Fernández, M.J. Martín, A.G. González, F. Pablos. HPLC determination of catechins and caffeine in tea. Differentiation of green, black and instant teas. *Analyst*, **2000**, 125, 421-425.
189. P. L. Fernández, A. López, F. Pablos, A. G. González, M. J. Martín. The use of catechins and purine alkaloids as descriptors for the differentiation of tea beverages. *Microchimica Acta*, **2003**, 142, 79-84.
190. P. L. Fernández, M. J. Martín, F. Pablos, A. G. González. Differentiation of tea (*Camellia sinensis*) varieties and their geographical origin according to their metal content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2001**, 49, 4775-4779.
191. P. L. Fernández, M. J. Martín, F. Pablos, A. G. González. Multi-element analysis of tea beverages by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *Food Chemistry*, **2002**, 76, 483-489.
192. N. Togari, A. Kobayashi, T. Aishima. Relating sensory properties of tea aroma to gas chromatographic data by chemometric calibration methods. *Food Chemistry*, **1995**, 50, 157-165.

193. M. J. Latorre, C. García, B. Medina, C. Herrero. Pattern recognition analysis applied to classification of wines from Galicia (northwestern Spain) with certified brand of origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1994**, 42, 1451-1455.
194. S. Frías, J. E. Conde, J. J. Rodríguez, F. García, J. P. Pérez. Classification of commercial wines from the Canary Islands (Spain) by chemometrics techniques using metallic contents. *Talanta*, **2003**, 59, 335-344.
195. L. A. Rizzon, A. Miele, J. P. Rosier. Discrimination of wines from the Mercosul countries according to their mineral composition. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, **1997**, 31, 43-47.
196. A. M. P. Vasconcelos, H. J. Chaves. Characterization of elementary wines of *Vitis vinifera* varieties by pattern recognition of free amino acid profiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1989**, 37, 931-937.
197. K. Heberger, E. Csomos, L. Simon-Sarkadi. Principal component and linear discriminant analyses of free amino acids and biogenic amines in Hungarian wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2003**, 51, 8055-8060.
198. M. Forcen, A. Mulet, A. Berna. Contribution of gas chromatographic and conventional data to the characterization of Majorcan musts and wines by means of pattern recognition techniques. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **1992**, 60, 229-238.
199. E. Marengo, V. Maurino, S. Angelino, R. Aigotti, C. Baiocchi, M. C. Gennaro. Pattern recognition of nebbiolo wine as a function of the fungicide treatment of the grape. *Analytical Letters*, **1999**, 32, 1653-1673.
200. M. C. García Parrilla, F. J. Heredia, A. M. Troncoso. Sherry wine vinegars: phenolic composition changes during aging. *Food Research International*, **1999**, 32, 433-440.
201. M. J. Benito, M. C. Ortiz, M. S. Sánchez, L. A. Sarabia, M. Iñiguez. Typification of vinegars from Jerez and Rioja using classical chemometric techniques and neural network methods. *Analyst*, **1999**, 124, 547-552.
202. R. Natera, R. Castro, M. de García-Moreno, M. J. Hernández, C. García-Barroso. Chemometric studies of vinegars from different raw materials and processes of production. *Journal of agricultural and Food Chemistry*, **2003**, 51, 3345-3351.

203. D. Bellido, J. M. Moreno, M. P. Hernandez. Differentiation and classification of beers with flame atomic spectroscopy and molecular absorption spectrometry and sample preparation assisted by microwaves. *Spectrochimica Acta*, **2000** , 55B, 855-864 .
204. A. Alcázar, F. Pablos, M. J. Martín, A. G. González. Multivariate characterisation of beers according to their mineral content. *Talanta*, **2002**, 57, 45-52.
205. A. Alcázar, M. J. Martín, F. Pablos, A. G. González. Diferenciación del origen geográfico de cervezas mediante técnicas de reconocimiento de patrones según su contenido mineral. *Cerveza y Malta*, **2003**, 157, 21-25.
206. M. Taylor, T. Bailey, R. Hammond, G. Merry. Potential applications for an electronic aroma detector within the brewing industry. *Technical Quarterly - Master Brewers Association of the Americas*, **1995**, 32, 175-9.
207. T. P. Bailey, R. V. Hammond, K. C. Persaud. Applications for an electronic aroma detector in the analysis of beer and raw materials. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, **1995**, 53, 39-42.
208. M. Kovacevic, M. Kac. Determination and verification of hop varieties by analysis of essential oils. *Food Chemistry*, **2002**, 77, 489-494.
209. S. Eri, B. K. Khoo, J. Lech, T. G. Hartman. Direct thermal desorption-gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry profiling of hop (*Humulus lupulus L.*) essential oils in support of varietal characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2000**, 48, 1140-1149.
210. J. J. Mangas, R. Rodríguez, J. Moreno, B. Suárez, D. Blanco. Furanic and phenolic composition of cider brandy. A chemometric study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1997**, 45, 4076-4079.
211. 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.
212. C. Gómez-Cordovés, B. Bartolomé. Application of principal component analysis to simple determinations of brandies as a means of verifying quality. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*, **1993**, 197, 260-263.
213. L. A. Wilson, J. H. Ding, A. E. Woods. Gas chromatographic determination and pattern recognition analysis of methanol and fusel oil concentrations in whiskeys. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, **1991**, 74, 248-56.

214. D. González-Arjona, V. González-Gallero, F. Pablos, A. G. González. Authentication and differentiation of irish whiskeys by higher-alcohol congener analysis. *Analytica Chimica Acta*, **1999**, 381, 257-264.
215. A. S. C. Sing, J. Smadja, E. M. Gaydou, J. Y. Conan. Reunion rum differentiation based on official methods of analysis. *Analisis*, **1994**, 22, 332-339.
216. E. A. Hernández, R. M. Avila, T. Capote, F. Rivas, A. G. Pérez. Classification of Venezuelan spirituous beverages by means of discriminant analysis and artificial neural networks based on their Zn, Cu, and Fe concentrations. *Talanta*, **2003**, 60, 1259-1267.
217. R. Kokkinofa, 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 statistical analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2003**, 51, 6233-6239.

II. Quimiometría

II.1. Análisis de la varianza

El análisis de la varianza, ANOVA, es una técnica estadística que se utiliza cuando se pretenden comparar varios valores medios. Esta técnica descompone la varianza total de una serie de datos en dos contribuciones, una debida a errores del tipo aleatorio, medida a través de la varianza de repetitividad (INTRA), y otra contribución sistemática debida a uno o más factores controlados (INTER). A continuación se comparan las dos varianzas mediante un ensayo F de Snedecor-Fisher para comprobar si el factor controlado incrementa significativamente la varianza debida a errores aleatorios. Si se acepta la igualdad de las varianzas, se concluye que no existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos al ir variando el factor controlado. Si no es así, el hecho de ir variando dicho factor estaría introduciendo errores de tipo sistemático y sería necesario averiguar que nivel de variación del factor introduce dicho error sistemático, lo que se consigue mediante la aplicación de un ensayo estadístico de comparaciones múltiples [1].

II.1.1. ANOVA de dos factores anidados

Cuando los resultados de un experimento pueden estar afectados por dos factores y se pretende estudiar el efecto de los mismos, hay que usar el análisis de la varianza denominado de dos factores, pudiéndose calcular la varianza de cada factor, la correspondiente a la interacción de ambos y la del error aleatorio [2]. El análisis de varianza de factores anidados es un caso especial de ANOVA. Recibe este nombre debido a que los factores subordinados aparecen anidados en los niveles del factor superior. Este método se utiliza para determinar la magnitud del error en varias fases de un experimento o de un proceso industrial [3].

Supongamos que realizamos una serie de experimentos variando un factor A en $i = (1-a)$ niveles. Para cada uno de los niveles de A variamos un factor B en $j = (1-b)$ niveles, realizando $k = (1-r)$ replicados. Esta serie de experimentos se puede representar con un esquema anidado como el que aparece en la Figura II.1. R_{ijk} es el k -ésimo resultado del experimento obtenido para el j -ésimo nivel del factor B en el i -ésimo nivel

del factor A . \bar{R}_j es la media aritmética de los r replicados del nivel j del factor B en el nivel i del factor A . \bar{R}_i es la media aritmética de los resultados obtenidos en el nivel i del factor A y \bar{R} es la media total de todos los resultados obtenidos.

$$\bar{R}_{ij} = \frac{\sum_{k=1}^r R_{ijk}}{r} \quad (2.1)$$

$$\bar{R}_i = \frac{\sum_{j=1}^b \bar{R}_{ij}}{b} \quad (2.2)$$

$$\bar{R} = \frac{\sum_{i=1}^a \bar{R}_i}{a} \quad (2.3)$$

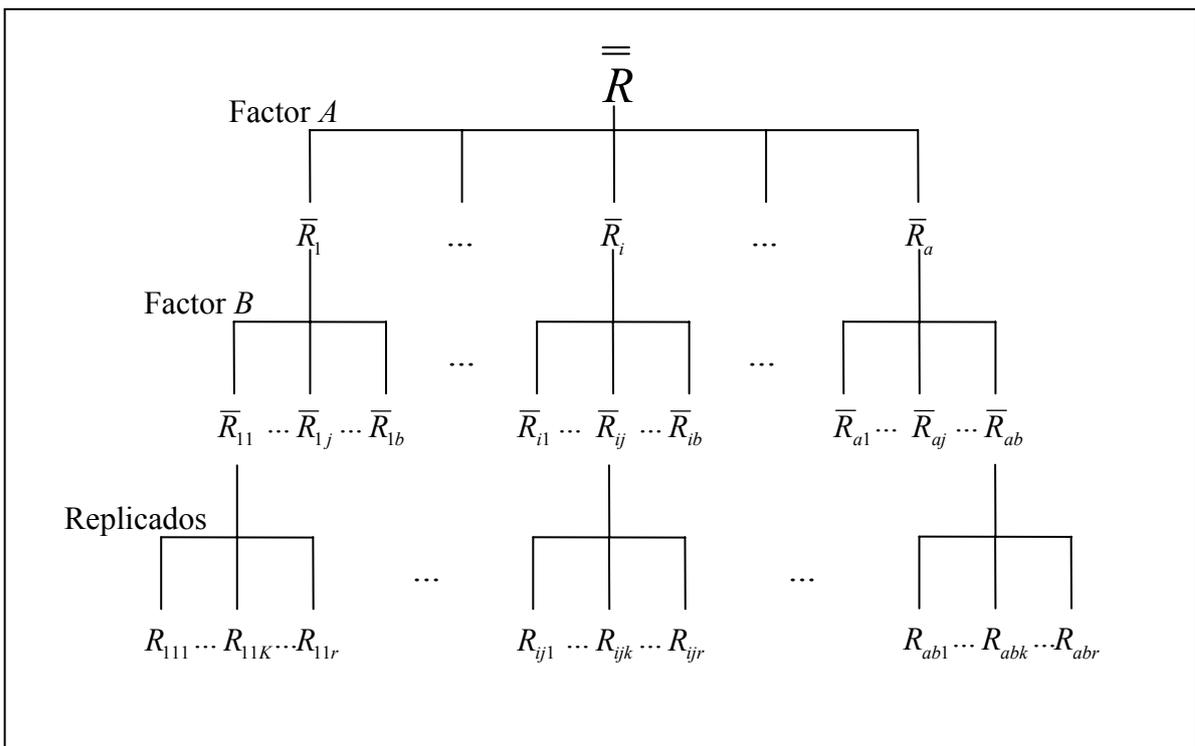


Figura II.1. Esquema anidado de un experimento variando dos factores con replicación.

En este modelo, la varianza total se descompone en los diferentes niveles. En el caso del ANOVA de dos factores anidados se obtiene la siguiente ecuación:

$$R_{ijk} = \mu + A_i + B_{ij} + \varepsilon_{ijk} \quad (2.4)$$

Donde el valor de cada observación R_{ijk} vendrá dado por la media de la población (μ), considerando la contribución a la varianza total del i -ésimo nivel del factor A (A_i), la contribución del j -ésimo nivel del factor B en el nivel i (B_{ij}) y el término de error aleatorio (ε_{ijk}) para la k -ésima observación del j -ésimo subnivel del nivel i [4]. Los cálculos de las varianzas para este modelo se presentan en la Tabla II.1.

Tabla II.1. Cálculo de las varianzas para un ANOVA de dos factores anidados.

| Fuente | Varianza | Cuadrado medio esperado |
|------------|---|---|
| Factor A | $S_{Factor A}^2 = \frac{rb \sum_{i=1}^a (\bar{R}_i - \bar{R})^2}{a-1}$ | $rb\sigma_{Factor A}^2 + r\sigma_{Factor B}^2 + \sigma_{rep}^2$ |
| Factor B | $S_{Factor B}^2 = \frac{r \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b (\bar{R}_{ij} - \bar{R}_i)^2}{a(b-1)}$ | $r\sigma_{Factor B}^2 + \sigma_{rep}^2$ |
| Error puro | $S_{rep}^2 = \frac{\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^r (R_{ijk} - \bar{R}_{ij})^2}{ab(r-1)}$ | σ_{rep}^2 |
| Total | $S_{Total}^2 = \frac{\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \sum_{K=1}^r (R_{ijk} - \bar{R})^2}{abr-1}$ | |

Una vez se realizan los cálculos de ANOVA se comprueba si el efecto de los factores es significativo. Para ello se comparan las varianzas obtenidas en cada fase del experimento (factor A o B) con la varianza del error puro mediante una prueba F de dos colas. Si el valor experimental de F es mayor que el valor crítico tabulado para un 95% de nivel de confianza existe entonces un sesgo significativo introducido por el factor.

Considerando el caso del factor A :

$$F_{\text{exp}} = \frac{S_{\text{Factor } A}^2}{S_{\text{rep}}^2} \quad (2.5)$$

Si $F_{\text{exp}} > F_{\text{tab}}(a-1, ab(r-1), 95\%)$, existen diferencias significativas entre la varianza del factor y la de error puro, lo que se traduce en que al ir variando los niveles del factor A se introducen en los resultados del experimento errores de tipo sistemático. De este modo, al menos un valor promedio \bar{R}_i difiere significativamente del resto, pero no conocemos el nivel i del factor A en el que ocurre esto.

II.1.2. Prueba de la genuina diferencia significativa de Tukey

Si una vez realizados los cálculos de ANOVA se han encontrado diferencias significativas entre la varianza de un factor y la del error puro, debemos averiguar que nivel de ese factor es el responsable de los errores sistemáticos que producen dichas diferencias. Con este fin se realiza el ensayo Tukey-HSD (Honest Significant Difference) [5], por el que se comparan dos a dos las medias obtenidas a cada nivel del factor. Aquel nivel que presente un valor promedio significativamente diferente del resto será el responsable del sesgo detectado y se elimina para recalcularse el ANOVA.

Supongamos que queremos comparar dos niveles p y q del factor principal de un sistema de dos factores anidados. Para que no haya diferencia significativa entre los valores promedio de estos dos niveles, \bar{R}_p y \bar{R}_q , se debe demostrar que ambos se corresponden con las medias muestrales de una misma población, de distribución normal, de media μ y varianza σ^2 . De este modo, si \bar{R}_p es la media muestral de una población de media μ_p y \bar{R}_q es la media muestral de una población de media μ_q , se debe cumplir, como hipótesis nula, que $\mu_p = \mu_q$.

Se define el intervalo de confianza de Tukey como:

$$\mu_p - \mu_q \in (\bar{R}_p - \bar{R}_q) \pm \frac{q_{r,v}^\alpha}{\sqrt{2}} \sqrt{S_{rep}^2 \left(\frac{1}{n_p} + \frac{1}{n_q} \right)} \quad (2.6)$$

Donde, $q_{r,v}^\alpha$ es el valor tabulado de la distribución del rango estandarizado [6], que depende del numero de repeticiones, r , y de los grados de libertad utilizados en la desviación estándar que se usa en el calculo de este intervalo, v , así como del nivel de confianza, α .

Teniendo en cuenta que, la varianza utilizada en la expresión anterior es una estimación de la de la población y debe considerar todas las muestras, se sustituye ésta por la varianza del error puro. Además, si en nuestro caso $n_p = n_q = n$, el intervalo de confianza de Tukey queda:

$$\mu_p - \mu_q \in (\bar{R}_p - \bar{R}_q) \pm \frac{q_{r,v}^\alpha}{\sqrt{2}} S_{rep} \sqrt{\frac{1}{n}} \quad (2.7)$$

Como $\mu_p - \mu_q = 0$, el intervalo de confianza de Tukey debe contener el cero, si no es así, se rechaza la hipótesis nula.

$$(\bar{R}_p - \bar{R}_q) - \frac{q_{r,v}^\alpha}{\sqrt{2}} S_{rep} \sqrt{\frac{1}{n}} < 0 < (\bar{R}_p - \bar{R}_q) + \frac{q_{r,v}^\alpha}{\sqrt{2}} S_{rep} \sqrt{\frac{1}{n}} \quad (2.8)$$

En la práctica, se parte de la hipótesis nula, $\mu_p = \mu_q$, y se calcula un valor de q experimental según:

$$q_{\text{exp}} = \frac{\bar{R}_p - \bar{R}_q}{S_{rep} \sqrt{\frac{1}{n}}} \quad (2.9)$$

Se compara este valor experimental de q con el valor tabulado [6]. Si $q_{\text{exp}} > q_{\text{tab}}$ se rechazaría la hipótesis nula, con lo que las dos medias presentarían diferencias

significativas entre sí. El nivel que presente diferencias significativas con el resto, se considera como causa del efecto significativo en la varianza total.

II.2. Detección de valores extremos

II.2.1. Valores extremos: definición y tipos

A la hora de realizar un experimento es necesario llevar a cabo una buena planificación del mismo. No obstante, en algunas ocasiones, se obtienen resultados que pueden parecer discrepantes o anómalos, a los que podemos denominar valores extremos. Los valores extremos se definen como observaciones de una muestra cuyo valor aparece bastante separado del resto, lo que sugiere que pueden provenir de una población diferente a la estudiada o son el resultado de un error de medida [7]. Estos valores extremos se pueden subdividir en “outliers” (valores aberrantes), cuando se detectan para un nivel de confianza del 99%, y “stragglers” (valores rezagados), cuando se detectan entre el 95% y el 99% de nivel de confianza [8].

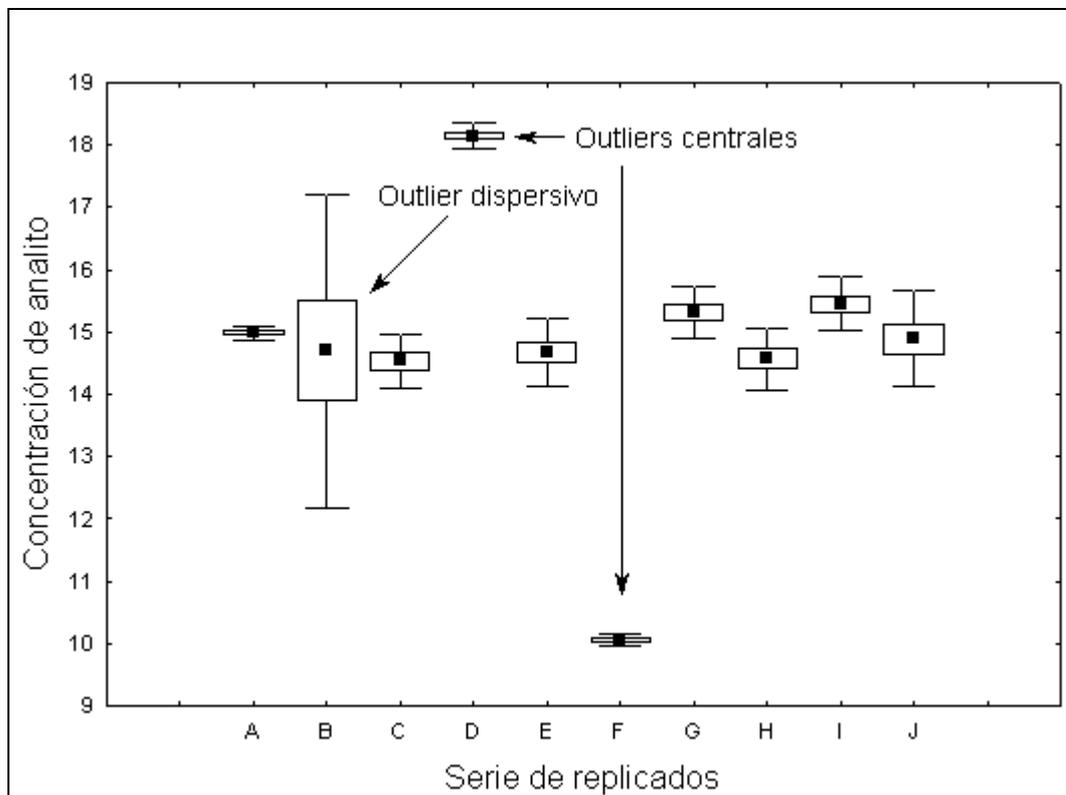


Figura II.2. Ejemplo gráfico de valores extremos dispersivos y centrales.

Cuando entre los resultados de un experimento se encuentran observaciones aberrantes, que pueden distorsionar las conclusiones del análisis estadístico de los datos, se hace necesaria su eliminación. Esta eliminación ha de realizarse aplicando criterios estadísticos adecuados. Estos criterios aparecen bien descritos en la bibliografía, aplicados a la identificación y rechazo de resultados aberrantes en los cálculos de ANOVA en ensayos colaborativos [8, 9].

Los resultados aberrantes aparecen tanto entre los valores promedios, lo que se denomina outliers centrales, como en la varianza de los replicados a partir de los que se obtienen dichos valores promedio, que reciben el nombre de outliers dispersivos. Un ejemplo de los mismos se puede observar en la Figura II.2. Aunque existen varios ensayos utilizados para la detección de los mismos haremos hincapié en los recomendados por la AOAC [9].

II.2.2. Detección de outliers dispersivos: criterio de Cochran

Cuando se tiene una serie de resultados agrupados en replicados, y se sospecha que una serie de replicados puede constituir un outlier dispersivo, es decir, que presenta una varianza sospechosa, por ser la mayor de la serie, se puede usar la prueba de Cochran [10]. De esta forma se decide si dicha varianza puede considerarse o no un outlier. El estadístico C de Cochran se calcula según la siguiente fórmula:

$$C = \frac{S_{max}^2}{\sum_{i=1}^n S_i^2} \quad (2.10)$$

El valor obtenido se compara con el tabulado $C(n, r, \alpha)$. Siendo S_{max}^2 la varianza sospechosa, n el número de series de replicados, S_i^2 las varianzas de cada una de estas series, r el número de replicados y α el nivel de significación. Si el valor calculado es mayor que el teórico, normalmente para un 99% de nivel de confianza, se considera que la serie de replicados sospechosa constituye un outlier dispersivo y se procede a su eliminación.

Aunque este criterio está pensado para un número de replicados fijo para cada serie ($r = \text{constante}$), se puede modificar el procedimiento para aplicarlo de forma general. Simplemente se calcula un valor promedio del número de medidas y se compara con el valor tabulado $C(n, \bar{r}, \alpha)$, siendo:

$$\bar{r} = \frac{\sum_{i=1}^n r_i}{n} \quad (2.11)$$

II.2.3. Detección de outliers centrales: ensayos de Grubbs

Cuando en una serie de resultados encontramos un valor sospechoso, debido a que se distancia del resto, debemos 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 II.3.

La mayoría de los ensayos detectan un solo outlier (outliers simples), pero no parejas de outliers que se enmascaran mutuamente (outliers dobles). Por ese motivo, se recomienda el uso de los tres ensayos de Grubbs [11], que permiten detectar outliers en los tres casos anteriormente descritos [8, 9]. La forma de llevar a cabo cada uno de estos ensayos se detalla a continuación.

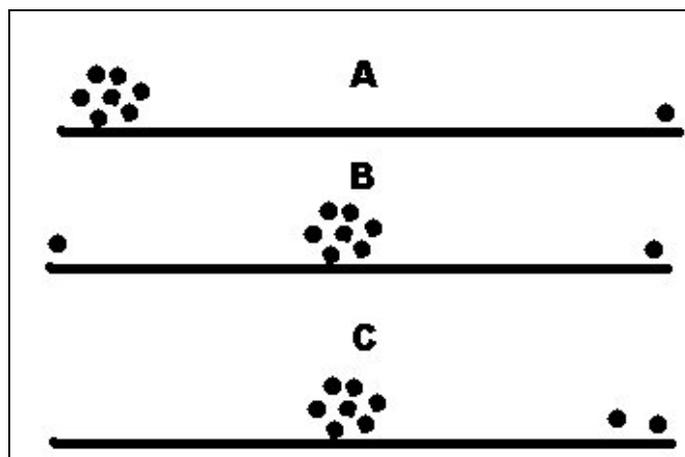


Figura II.3. Ejemplos de valores extremos simples (A), dobles separados diametralmente (B) y dobles vecinos (C).

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:

$$G1 = \frac{|\bar{x} - x_i|}{s} \quad (2.12)$$

Siendo x_i el valor sospechoso y \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 la expresión:

$$G2 = \frac{x_n - x_1}{s} \quad (2.13)$$

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 vecinales.

Mediante este ensayo se comprueba la posible anomalía de dos valores sospechosos situados en el mismo extremo. El estadístico G3 se calcula:

$$G3 = 1 - \left[\frac{(n-3) \cdot s_{n-2}^2}{(n-1) \cdot s^2} \right] \quad (2.14)$$

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 o stragglers según el criterio anteriormente establecido [8].

II.3. Reconocimiento de patrones

II.3.1. Introducción a los métodos de reconocimiento de patrones

Los métodos modernos de análisis automático facilitan la obtención de grandes cantidades de datos. El empleo de métodos espectroscópicos y cromatográficos pueden proporcionar datos analíticos sobre muchos componentes de una misma muestra. Cuando se dispone de varias variables medidas para una misma muestra nos encontramos ante lo que se denominan datos multivariantes [2]. Todo esto genera la necesidad de llevar a cabo un diseño apropiado de los experimentos y procedimientos a realizar, además de extraer la mayor cantidad de información posible de todos los datos obtenidos, mediante el empleo de herramientas matemáticas adecuadas. La disciplina encargada de desarrollar estas herramientas es, en el ámbito de la química, la *Quimiometría*.

El *Reconocimiento de Patrones* (PR, Pattern Recognition) es una rama de la inteligencia artificial, desarrollada a finales de los sesenta, que proporciona una aproximación general a la resolución de problemas de análisis de grandes conjuntos de datos, que pueden agruparse 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? [12]. Su campo de aplicación no sólo atañe a las ciencias experimentales, también incluye otras disciplinas como son psicología, política, pedagogía, lingüística, medicina... Debido a sus numerosas aplicaciones y a los grandes avances en el campo de la informática, ha sufrido un espectacular desarrollo en los últimos años.

Cuando se dispone de un conjunto de $n > 1$ variables y se pretende analizar e interpretar los datos, por medio de la estadística, se utiliza lo que se conoce como *Análisis Multivariante*. La información obtenida es de carácter multidimensional, por lo que utiliza extensamente los métodos del álgebra lineal, cálculo numérico, geometría lineal y otras clases de geometrías [13]. El Análisis Multivariante trabaja con variables que siguen una determinada función de distribución, ya que pertenecen a la estadística. En PR se 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.

Cuando hablamos de Reconocimiento de Patrones, el término patrón se refiere a acontecimientos, objetos o entes que presentan características establecidas y definidas. A un conjunto de patrones caracterizados por una relación común se le conoce como *clase*. Desde un punto de vista químico, los patrones son un conjunto de muestras descritas por una serie de variables o descriptores, que pueden ser parámetros físicos o químicos que caracterizan a dichas muestras. Los métodos de PR permiten predecir características de muestras que no se observan directamente a partir de un conjunto de medidas químicas pero que están relacionadas con alguna propiedad química.

De los cuatro niveles del reconocimiento de patrones definidos por Albano *et al.* [14], sólo consideraremos los dos primeros. El primer nivel 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 conocida. Es una técnica de "modelado duro" (*hard modelling*), ya que el patrón va a ser asignado a una determinada clase. En el segundo nivel, las fronteras se establecen no 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. En el tercer y cuarto nivel se considera la capacidad para relacionar las variables medidas con una o varias propiedades externas, pero éstos no serán objeto de estudio en esta memoria

II.3.1.1. Conceptos básicos en el Reconocimiento de Patrones

a) Espacio de modelos (Pattern Space):

Cualquier patrón u objeto i que se estudia, en nuestro caso una muestra, va a venir descrito por un conjunto de c variables y se va a representar por un vector fila

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

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

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

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 mismas, según la expresión:

$$x'_{ij} = \frac{x_{ij} - \bar{x}_j}{s_j} \quad (2.15)$$

donde:

$$\bar{x}_j = \frac{\sum_{i=1}^r x_{ij}}{r} \quad (2.16)$$

$$s_j = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^r (x_{ij} - \bar{x}_j)^2}{r-1}} \quad (2.17)$$

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.

b) Distancias en el espacio patrón [15]:

Se consideran dos vectores patrón \mathbf{x}_a y \mathbf{x}_b que pertenecen al espacio c-dimensional. De modo que:

$$\mathbf{x}_a = \{x_{a1}, x_{a2}, \dots, x_{ac}\}$$

$$\mathbf{x}_b = \{x_{b1}, x_{b2}, \dots, x_{bc}\}$$

Las distancias que más suelen emplearse son las siguientes:

- *Distancia euclídea:*

$$d_{ab} = \sqrt{\sum_{i=1}^c (x_{ai} - x_{bi})^2} \quad (2.18)$$

- *Distancia de Minkowski:*

$$d_{ab} = \left(\sum_{i=1}^c |x_{ai} - x_{bi}|^k \right)^{\frac{1}{k}} \quad (2.19)$$

donde k es un entero.

- *Distancia City Block o Manhattan:*

$$d_{ab} = \sum_{i=1}^c |x_{ai} - x_{bi}| \quad (2.20)$$

es equivalente a la Minkowski para $k=1$

- *Distancia Hamming:*

$$d_{ab} = \sum_{i=1}^c XOR(x_{ai}, x_{bi}) \quad (2.21)$$

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

- *Distancia de Mahalanobis:*

$$d_{ab}^2 = (x_a - x_b)^T C^{-1} (x_a - x_b) \quad (2.22)$$

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

II.3.1.2. 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 [16]:

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

$$x' = x_{ij} - \bar{x}_j \quad (2.23)$$

donde \bar{x}_j viene dado por la ecuación 2.16.

- *Normalización de columnas:* basta con dividir los valores de las variables entre la desviación estándar calculada según la ecuación 2.17.

$$x'_{ij} = \frac{x_{ij}}{s_j} \quad (2.24)$$

- *Autoescalado*: las variables originales sufren una transformación tipo Student. Este tipo de transformación se introdujo en la sección anterior y viene dada por la ecuación 2.14.

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

$$x'_{ij} = \frac{x_{ij} - \min_j(x_{ij})}{\max_j(x_{ij}) - \min_j(x_{ij})} \quad (2.25)$$

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

$$m = \frac{1}{r} \sum_{i=1}^r x_i \quad (2.26)$$

Ponderación y selección de variables.

- Ponderación de la varianza [12]

$$WV_j = \frac{r_1(m_j^{(1)} - m_j)^2 + r_2(m_j^{(2)} - m_j)^2}{S_j^{(1)2} + S_j^{(2)2}} \quad (2.27)$$

Donde m es el valor promedio de todos los patrones considerados y $m^{(l)}$ el valor promedio de los patrones de una determinada clase L. Cuanto mayor sea el valor de WV más discriminante será la variable j.

$$m = \frac{1}{r} \sum_{i=1}^r x_i \quad (2.28)$$

$$m^{(l)} = \frac{1}{r_l} \sum_{i=1}^{r_l} x_i^{(l)} \quad (2.29)$$

- Pesos de Fisher [17]

$$FW_j = \frac{(m_j^{(1)} - m_j^{(2)})^2}{(s_j^{(1)})^2 - (s_j^{(2)})^2} \quad (2.30)$$

Siendo $m^{(l)}$ el valor promedio de la clase L y $s^{(l)}$ su desviación estándar.

- Ponderación de Coomans [18], que es útil cuando se usan más de dos clases.

$$g_j = \frac{|m_j^{(1)} - m_j^{(2)}|}{s_j^{(1)} - s_j^{(2)}} \quad (2.31)$$

Siendo $m^{(l)}$ el valor promedio de la clase L y $s^{(l)}$ su desviación estándar.

- Método Λ de Wilks [19, 20]

$$\Lambda = \frac{\det(S_W)}{\det(S_T)} \quad (2.32)$$

Donde S_T es la matriz de varianza total y S_W es la matriz intraclase, que mide la dispersión dentro de cada clase. Los valores del parámetro Λ de Wilks van desde 1.0 (ningún poder discriminatorio) a 0.0 (poder discriminatorio máximo).

La matriz de varianza total es:

$$S_T = \sum_{i=1}^r (x_i - m)(x_i - m)^T \quad (2.33)$$

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

$$(S_T)_{jk} = \sum_{i=1}^r (x_{ij} - m_j)(x_{ik} - m_k) \quad (2.34)$$

La matriz intraclase se define como

$$S_W = \sum_{l=1}^L \sum_{i=1}^{r_l} (x_i^{(l)} - m^{(l)})(x_i^{(l)} - m^{(l)})^T \quad (2.35)$$

Cuando es entre dos variables j y k se tiene:

$$(S_W)_T = \sum_{l=1}^L \sum_{i=1}^{r_l} (x_{ij} - m_j)(x_{ik} - m_k) \quad (2.36)$$

II.3.2. Visualización de datos: Análisis en Componentes Principales

El Análisis en Componentes Principales (PCA), es un método de visualización de datos que tiene, como principal objetivo, reducir el tamaño de la matriz de datos, manteniendo la mayor parte de la información contenida en las variables originales y eliminando la información redundante o sin relevancia. Supongamos una matriz de datos multivariantes en la que se tienen c variables medidas para el conjunto total de muestras. En muchas ocasiones, estas variables se presentan correlacionadas, con lo que ofrecen una información redundante. El PCA transforma las c variables originales en otros c nuevos ejes llamados Componentes Principales o PC's mediante un giro en el espacio de r dimensiones. Los nuevos ejes son ortogonales entre sí, con lo cual no están correlacionados entre sí, y son combinaciones lineales de las variables originales. Estos PC's se van a generar sucesivamente, de forma que el primero explica la mayor parte de la varianza de los datos y los siguientes explican cantidades decrecientes de la varianza

residual. De esta forma, si sólo usamos los primeros Componentes Principales, podremos explicar la mayor parte de la varianza de los datos, reduciendo el número de variables necesarias para representar al conjunto de muestras [21].

Matemáticamente, se parte de una matriz de datos $X_{r,c}$, que se somete a un preprocesado. La matriz de covarianzas viene dada por $C=X^T X$. El PCA busca una matriz de similaridad (transformación ortogonal) $U_{c,c}$ que actúe sobre la matriz de datos $X_{r,c}$ para originar otra matriz $Y_{r,c}$, llamada matriz de scores, en la que los datos están referidos a los nuevos ejes o PC's:

$$Y_{r,c} = X_{r,c} U_{c,c} \quad (2.37)$$

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

$$Y_{r,c} Y_{r,c}^T = \Lambda_{c,c} \quad (2.38)$$

Donde $\Lambda_{c,c}$ es la nueva matriz de covarianzas, que es una matriz diagonal. Por tanto se tiene que:

$$Y^T Y = (XU)^T (XU) = U^T C U = \Lambda \quad (2.39)$$

De donde obtenemos la expresión final $\Lambda=U^T C U$ que se conoce como Transformación de Karhunen-Loewe.

Lo que se pretende es encontrar los vectores columna de la matriz de transformación U , que es ortogonal y en la que, por tanto se cumple que $U^T=U^{-1}$. De forma que multiplicando por U por la izquierda la expresión de Karhunen, se tiene: $U\Lambda=CU$. Si se reescribe la misma expresión pero en lugar de en forma matricial se hace vector a vector, se tiene: $u_j \lambda_j I = C u_j$. Ésta es una clásica ecuación de autovalores o autovectores: es decir, $u_j(C\lambda_j - I) = 0$, por lo que debe cumplirse que $\det(C - \lambda I) = 0$, donde I es la matriz unidad. Todo esto conduce a un polinomio de grado c :

$$\lambda^c + a_1 \lambda^{c-1} + a_2 \lambda^{c-2} + \dots + a_c = 0 \quad (2.40)$$

Dado que la matriz C es simétrica las c soluciones del polinomio son reales y positivas. Los valores 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:

$$\lambda_1 \geq \lambda_2 \geq \dots \geq \lambda_c \quad (2.41)$$

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 u_j y con ellos queda ya calculada la matriz U .

Las coordenadas de los datos en los nuevos ejes, Y , reciben el nombre de scores. Las variables se pueden expresar linealmente en función de los PC's y viceversa. Así:

$$x_{ij} = a_{i1}Pc_{i1} + a_{i2}Pc_{i2} + a_{i3}Pc_{i3} + \dots + a_{ic}Pc_{ic} \quad (2.42)$$

Los coeficientes a_{ik} 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 PC's 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:

$$\% \text{ var} = \frac{\lambda_j}{\sum_{j=1}^c \lambda_j} \quad (2.43)$$

Algunos de los criterios utilizados para seleccionar el número adecuado de Componentes Principales se enumeran a continuación:

- Criterio de Kaiser [22].

Es uno de los más sencillos y más aplicados. Admite que los datos están autoescalados y considera componentes principales explicativos aquellos cuyos autovalores correspondientes son mayores que la unidad ($\lambda > 1$).

- Criterio de la proporción de la varianza explicada [23].

Se escogen aquellos PC's que expliquen por lo menos hasta un 70% de la varianza.

- Criterio de las comunalidades [23].

Según este método, nos quedamos con aquellos Componentes Principales cuyas comunalidades sean ≈ 0.8 , no escogiéndose nunca aquellos PC's que tengan menos de 0.6 de comunalidad.

- Criterio de la función indicador de Malinowski [24].

Viene dado por la expresión siguiente:

$$IND = \frac{RSD}{(c-f)} \quad (2.44)$$

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

$$RSD = \sqrt{\frac{\sum_{i=f+1}^c \lambda_i}{r(c-f)}} \quad (2.45)$$

En la que f representa los Componentes Principales seleccionados. 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 [25]

La función F viene representada por

$$F = \frac{RSD_f^2}{RSD_{f+1}^2} \quad (2.46)$$

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.

- Criterio de la validación cruzada [26].

Este método está basado en el algoritmo NIPALS (Nonlinear Iterative Partial Least Squares), que es un método iterativo para calcular PC's. La validación cruzada consiste en eliminar un determinado porcentaje de los datos en la matriz X y calcular los correspondientes PC's. El criterio de bondad del ajuste consiste en calcular el valor PRESS (Predicted Residual Error Sum of Squares), que viene dado por la expresión:

$$PRESS_f = \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^c (x_{ij} - x_{ij}^*)^2 \quad (2.47)$$

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 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 volviendo a continuación 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, dos, tres, 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 seleccionados los f componentes principales significativos mediante alguno de los criterios indicados, se pueden escribir las variables originales de la siguiente forma:

$$x_j = a_{j1}PC_1 + a_{j2}PC_2 + \dots + a_{jf}PC_f + e_j \quad (2.48)$$

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:

$$\text{var}(x_i) = a_{j1}^2 + a_{j2}^2 + \dots + a_{jf}^2 + \text{var}(e_j) \quad (2.49)$$

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:

$$\text{COMUNALIDAD} = \sum_{k=1}^f a_{jk}^2 \quad (2.50)$$

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

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 [27], 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 la mayor parte de la varianza de los datos. Las variables son vectores en el BILOT y los objetos son puntos. Asimismo, la distancia euclídea entre dos puntos del BILOT 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. De esta forma, la representación del BILOT es una buena herramienta para establecer las posibles tendencias de los objetos. Además, observando esta representación es posible establecer cuales son las variables que mejor discriminan entre las clases, ya que las que presenten mayores valores de loadings (tanto positivos como negativos) para el primer PC serán las más discriminantes; de igual forma, variables con valores de loadings próximos van a proporcionar el mismo tipo de información acerca de los objetos y descriptores cuyos loadings están próximos al valor cero no aportarán mucha información.

II.3.3. Reconocimiento de Patrones no supervisado: Análisis Cluster

El análisis cluster o análisis de conglomerados (Cluster Analysis, CA) es un método de reconocimiento de patrones cuyo objetivo es, básicamente, encontrar agrupamientos de muestras a partir de las variables medidas. Esta técnica pertenece a las denominadas no supervisadas, pues no se conoce a priori las categorías o clases en las que se pueden agrupar las muestras [28, 29].

Para realizar un Análisis Cluster, cada muestra se trata como un punto en un espacio n-dimensional, donde cada uno de los ejes queda definido por las n variables medidas para caracterizar las muestras. El Análisis Cluster evalúa la similitud entre las muestras midiendo la distancia entre los puntos en el espacio creado por las n variables. Las muestras que pertenezcan a una misma categoría, es decir, que sean similares, aparecerán próximas en el espacio n-dimensional, mientras que las que sean distintas aparecerán separadas. Los agrupamientos naturales encontrados pueden servir para seleccionar las variables que permitan diseñar las reglas necesarias para clasificar futuros casos de categoría desconocida.

Como ya hemos dicho, el Análisis Cluster compara las distancias entre dos muestras. Las cualidades que debe tener la distancia medida para que sea adecuada son:

- Dos patrones distintos deben tener distancia positiva.
- La distancia de un patrón consigo mismo ha de ser nula.
- Debe cumplir la propiedad conmutativa.
- La distancia debe ser invariante a rotaciones y transformaciones. Normalmente, para cumplir esta condición se tienen que autoescalar las variables.
- También debe tener en cuenta la posible correlación entre las variables.

Se suele usar la distancia de Mahalanobis, o bien la distancia Euclídea si los datos han sido previamente autoescalados.

Existen, básicamente, dos tipos de métodos de Análisis Cluster: métodos jerárquicos y métodos no jerárquicos, según se conozcan a priori, o no, los clusters a formar.

- *Métodos jerárquicos:*

Son los métodos más utilizados a la hora de realizar un CA y su expresión visual más común es el *dendrograma*. 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. Por tanto, los métodos jerárquicos se pueden subdividir a su vez en:

1. *Métodos aglomerativos:* 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.

2. *Métodos divisivos:* se parte de un grupo formado por todos los casos en el 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.

El procedimiento para realizar un Análisis Cluster jerárquico aglomerativo comienza por calcular la matriz de distancias \mathbf{D} de dimensión $r \times r$ que es simétrica, sus elementos diagonales son todos nulos y el resto son números positivos. Una vez que se ha calculado la matriz \mathbf{D} cada ciclo del agrupamiento iterativo tiene lugar en los siguientes pasos:

- 1.- Buscar los dos objetos más próximos, cuyo elemento d_{ij} de la matriz \mathbf{D} sea menor.
- 2.- Agrupar los objetos i y j , en un cluster (ij) .
- 3.- Actualizar la matriz \mathbf{D} , eliminando las distancias con respecto a i y a j y calculando las distancias nuevas de los demás objetos con respecto al centroide del cluster (ij) .
- 4.- Con la nueva matriz $(r-1) \times (r-1)$ repetir el procedimiento entero hasta haber realizado $r-1$ agrupamientos.

Una cuestión importante a la hora de llevar a cabo un CA jerárquico es la elección de la *Regla de amalgamación* para la formación de clusters. La distancia entre dos clusters H y K puede escribirse mediante una ecuación formalmente idéntica aunque con diferentes parámetros, dependiendo éstos de la regla de amalgamación seleccionada, llamada ecuación de Lance-Williams [30]:

$$d_{(H,K)}^2 = \alpha_I d_{(H,I)}^2 + \alpha_J d_{(H,J)}^2 + \beta d_{(I,J)}^2 + \gamma |d_{(H,I)}^2 + d_{(H,J)}^2| \quad (2.51)$$

La ecuación de Lance-Williams permite el cálculo de la distancia entre dos clusters H y K, $d_{(H,K)}$, donde K representa el cluster formado más recientemente (I, J). De manera más conveniente la distancia $d_{(H,K)}$ debería escribirse $d_{(H,(I,J))}$. Los coeficientes α_I , α_J , β y γ son diferentes dependiendo del método de agrupar los clusters, como se indica en la Tabla II.2.

Tabla II.2. Coeficientes de la ecuación de Lance-Williams según la regla de amalgamación para siete modalidades distintas. El valor n_L representa el número de objetos en el cluster L ($L = I, J, H, K$) y el valor n_{LM} la suma $n_L + n_M$.

| Regla de amalgamación | Coeficientes de la ecuación de Lance-Williams | | | |
|--------------------------------------|---|-------------------|----------------------------|----------|
| | α_I | α_J | β | γ |
| Distancia mínima [31] | 0.5 | 0.5 | 0 | -0.5 |
| Distancia máxima [32] | 0.5 | 0.5 | 0 | 0.5 |
| Distancia promedio ponderada [33] | n_I / n_{IJ} | n_J / n_{IJ} | 0 | 0 |
| Distancia promedio no ponderada [32] | 0.5 | 0.5 | 0 | 0 |
| Centroide [32] | n_I / n_{IJ} | n_J / n_{IJ} | $-\alpha_I \cdot \alpha_J$ | 0 |
| Mediana [32] | 0.5 | 0.5 | -0.25 | 0 |
| Método de Ward [34] | n_{HI} / n_{HK} | n_{HJ} / n_{HK} | $-n_H / n_{HK}$ | 0 |

Los resultados obtenidos por el método de Ward son óptimos porque conduce a formación de los clusters más homogéneos posibles, aunque presenta tendencia a formar un número mínimo de éstos.

Una vez obtenido el dendograma correspondiente, debe establecerse una distancia umbral, d_0 , de la cual va a depender la formación de clusters. Si d_0 es muy grande se formará un solo grupo, mientras que, si por el contrario, esta distancia umbral es muy pequeña, puede darse la posibilidad de que cada muestra forma un cluster. Así, un valor intermedio de d_0 proporcionará un número determinado de clusters.

- *Métodos no jerárquicos*

1. Método de las K medias [35]

El método de las K medias, también llamado de la partición óptima sigue el siguiente algoritmo: Inicialmente, se selecciona el número de clusters a formar. Los datos se dividen al azar en el número apropiado de grupos y cada uno de ellos se representa por su centrotipo (centroide o miembro típico del grupo). Entonces se calcula la distancia media dentro de los grupos como el promedio de las distancias entre cada elemento del grupo y su centrotipo. Los objetos se transfieren y reagrupan de un grupo a otro de modo que se minimice esta distancia media entre grupos. El resultado conduce a una serie de clusters muy homogéneos.

2. Método del agrupamiento borroso [36] (Fuzzy clustering)

En este método la idea fundamental es el concepto de Zadeh de pertenencia parcial a un conjunto [37]. Así, se considera que:

- a) Una muestra (vector patrón) puede pertenecer simultáneamente a más de un grupo, con un grado de pertenencia en cada cluster particular representado por un número en el intervalo (0,1).
- b) La pertenencia total de una muestra determinada a todos los clusters es la unidad.

El Algoritmo de agrupamiento borroso usa la notación $u_{ik} = u_i(\mathbf{x}_k)$ para representar el grado de pertenencia del vector patrón \mathbf{x}_k en el cluster i . Las dos condiciones anteriores pueden entonces expresarse como:

$$0 \leq u_{ik} \leq 1 \quad \forall i, k \quad (2.52)$$

$$\sum_{i=1}^n u_{ik} = 1 \quad \forall k \quad (2.53)$$

donde n es el número de clusters, que debe conocerse a priori.

El algoritmo es un proceso iterativo. En la primera iteración se dividen los objetos en los correspondientes grupos y se calculan los centrotipos (centroides). Después, se calcula la distancia de cada uno de los objetos a cada centrotipo. El grado de pertenencia de cada objeto a cada grupo viene asignado por la ecuación:

$$u_{ik} = \frac{1}{\sum_{j=1}^n \left(\frac{d_{ik}}{d_{jk}} \right)^2} \quad (2.53)$$

donde d_{jk} denota la distancia entre el patrón \mathbf{x}_k y el centrotipo del cluster j .

El paso siguiente es calcular nuevos centrotipos v_i según:

$$v_i = \frac{\sum_{k=1}^r u_{ik}^2 \mathbf{x}_k}{\sum_{k=1}^r u_{ik}^2} \quad (2.54)$$

Estos nuevos centrotipos se usan para calcular de nuevo el grado de pertenencia de cada muestra a cada grupo, que a su vez se emplea en el cálculo de nuevos centrotipos. Las iteraciones continúan hasta que se consigue algún criterio de finalización. Uno muy usado consiste en parar las iteraciones cuando la separación máxima en la posición de los centrotipos en dos iteraciones consecutivas no supera un umbral previamente establecido.

Para concluir, recordemos que la hipótesis de cualquier método de PR es que objetos similares con respecto a una propiedad determinada se encontrarán próximos entre sí en el espacio patrón y formarán clusters. Si los clusters están bien definidos, y

dichas agrupaciones no contravienen nuestra intuición y experiencia química, podemos adscribirlos a las diversas clases que constituyen el conjunto de datos.

II.3.4. 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. Este 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 o predicción (*evaluation, prediction or test set*) [38]. Las reglas de clasificación se desarrollan empleando los objetos contenidos en el conjunto de entrenamiento y éstas se comprueban utilizando el conjunto de predicción. El porcentaje de objetos del conjunto de entrenamiento clasificados correctamente recibe el nombre de tasa de reconocimiento (*recalling or recognition rate*). El clasificador se comprueba con los objetos del conjunto de predicción y el porcentaje de casos correctamente clasificados recibe el nombre de facultad predictora (*prediction ability*). Así pues, el conjunto total de objetos se divide en el conjunto de entrenamiento, el cual suele estar constituido por un 75% de los casos del conjunto de datos conocido inicial, y el conjunto de ensayo, formado por el 25% restante [39]. La selección de estos porcentajes se lleva a cabo de manera aleatoria pero aplicándose a los objetos de cada clase (es decir tomar estocásticamente el 75% de objetos en la clase I, la II, etc para formar el conjunto de entrenamiento). Los resultados de la eficacia en el reconocimiento y la facultad predictiva se dan como valores promedio de diez repeticiones del procedimiento para diferentes constituciones aleatoriamente seleccionadas de los conjuntos de entrenamiento y evaluación.

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*) [40]. En esta técnica, se parte del conjunto conocido completo y a continuación, se selecciona aleatoriamente uno de los objetos y se "deja fuera", es decir,

este único objeto 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 procede de manera análoga, finalizando el proceso cuando se llega al último caso. La eficacia predictiva se calcula contabilizando los éxitos y fallos en clasificar cada patrón.

Antes de comentar los distintos métodos de reconocimiento de patrones supervisado utilizados, indicaremos los fundamentos estadísticos de la clasificación supervisada.

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

$$P(x) = P(x/I)P(I) + P(x/II)P(II) \quad (2.56)$$

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

$$P(I/x) = P(x/I)P(I)/P(x) \quad (2.57)$$

de forma análoga:

$$P(II/x) = P(x/II)P(II)/P(x) \quad (2.58)$$

de acuerdo con esta aproximación estadística [41], 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 $P(I/x) \geq P(II/x)$, el caso se asigna a la clase I.

II.3.4.1. 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. El LDA 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 a finales de los años treinta [42]. El procedimiento consiste en encontrar combinaciones lineales de las variables, que van a ser las denominadas funciones discriminantes, tal que sea máximo el cociente:

$$F = \frac{S_B}{S_w} \quad (2.59)$$

Donde S_w es la varianza intramuestral, calculada según la Ecuación 2.35, y S_B la varianza entre muestras, que se calcula como sigue:

$$S_B = \sum_{l=1}^L r_l (m^{(l)} - m)(m^{(l)} - m)^T \quad (2.60)$$

donde r y m quedan definidos en el apartado 2.3.1.2.

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 [43]. A continuación se enumeran varios de estos criterios.

- Λ de Wilks [19], que ya fue introducido en la Sección II.3.1.2. como:

$$\Lambda = \frac{\det(S_w)}{\det(S_T)} \quad (2.61)$$

Los valores de Λ van desde 1 (ningún poder discriminante) hasta 0 (máximo poder discriminatorio).

- Λ parcial de Wilks. Es la medida de Λ para la contribución de una variable determinada en el modelo:

$$\Lambda_{parcial} = \frac{\Lambda (\text{después de añadir la variable})}{\Lambda (\text{antes de añadir la variable})} \quad (2.62)$$

- Estadístico F [44], que se obtiene a partir del valor de lambda parcial según:

$$F = \frac{N - k - R}{k - 1} \cdot \frac{1 - \Lambda_{parcial}}{\Lambda_{parcial}} \quad (2.63)$$

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 continua 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 incluyen de todas las variables en el modelo, eliminando una en cada paso, atendiendo a su menor poder discriminante (*backward selection*).

Una vez seleccionadas las R variables más significativas, se procede al cálculo de las funciones discriminantes, también denominadas variables canónicas [45], que son combinación lineal de las R variables discriminantes, de modo que se observe la mayor separación posible entre clases y se reduzca el número de dimensiones sin que haya pérdidas en la diferenciación entre clases. Las funciones discriminantes constituyen unos nuevos ejes donde las diferencias entre categorías se observan más claramente. La expresión analítica de estas funciones es la siguiente:

$$f (X_1, X_2, \dots, X_R) = v_1 X_1 + v_2 X_2 + \dots + v_R X_R = v^T X \quad (2.64)$$

En definitiva, las 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 hacer que los promedios entre cada categoría sean lo más diferentes entre sí y, por otra parte, que cada clase tenga la menor desviación interna posible. Esto se consigue calculando los vectores \mathbf{v}^T que hacen máximo el cociente:

$$F = \frac{\mathbf{v}^T \mathbf{S}_B \mathbf{v}}{\mathbf{v}^T \mathbf{S}_w \mathbf{v}} \quad (2.65)$$

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

$$\frac{\partial F}{\partial \mathbf{v}} = \frac{\partial (\mathbf{v}^T \mathbf{S}_B \mathbf{v} / \mathbf{v}^T \mathbf{S}_w \mathbf{v})}{\partial \mathbf{v}} = 0 \quad (2.66)$$

$$\frac{\partial F}{\partial \mathbf{v}} = \frac{\mathbf{S}_B \mathbf{v} (\mathbf{v}^T \mathbf{S}_w \mathbf{v}) - (\mathbf{v}^T \mathbf{S}_B \mathbf{v}) \mathbf{S}_w \mathbf{v}}{(\mathbf{v}^T \mathbf{S}_w \mathbf{v})^2} = 0 \quad (2.67)$$

De aquí:

$$\mathbf{S}_B \mathbf{v} (\mathbf{v}^T \mathbf{S}_w \mathbf{v}) - (\mathbf{v}^T \mathbf{S}_B \mathbf{v}) \mathbf{S}_w \mathbf{v} = 0 \quad (2.68)$$

$$\mathbf{S}_B \mathbf{v} - F \mathbf{S}_w \mathbf{v} = 0 \quad (2.69)$$

Finalmente:

$$\mathbf{S}_w^{-1} \mathbf{S}_B \mathbf{v} = F \mathbf{v} \quad (2.70)$$

Esta 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 \mathbf{x}_i que pertenece a la clase k a la expresión:

$$DS_i^{(k)} = \mathbf{v}^T \mathbf{x}_i^{(k)} \quad (2.71)$$

De esta forma, el objeto x_i se puede clasificar según su posición con respecto al nuevo eje f , comparándolo con los centroides de las clases existentes. Suponiendo dos clases 1 y 2, cuyos centroides son, respectivamente, $\overline{DS}^{(1)}$ y $\overline{DS}^{(2)}$, el objeto x_i pertenecerá a la clase 1 si se cumple:

$$|DS_i - \overline{DS}^{(1)}| < |DS_i - \overline{DS}^{(2)}| \quad (2.72)$$

En caso contrario, pertenecerá a la clase 2.

Esta es una manera de clasificar objetos pero, generalmente en el análisis discriminante lineal, 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*, expresadas en el apartado II.3.4. 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:

$$P(c_k/x_i) = \frac{P(x_i/c_k) P(c_k)}{\sum_{j=1}^k P(x_i/c_j) P(c_j)} = \frac{P(x_i/c_k) P(c_k)}{P(x_i)} \quad (2.73)$$

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:

$$P(x_i/c_1) = \frac{1}{(2\pi)^{R/2} \sigma_1 \sigma_2 \dots \sigma_R} e^{-\frac{1}{2} \left[\left(\frac{x_{i1} - \mu^{(1)}}{\sigma_1^{(1)}} \right)^2 + \dots + \left(\frac{x_{iR} - \mu_R^{(1)}}{\sigma_R^{(1)}} \right)^2 \right]} \quad (2.74)$$

La expresión anterior se puede reescribir como:

$$P(x_i/c_1) = \frac{1}{(2\pi)^{R/2} (\det \Sigma)^{1/2}} e^{-\frac{1}{2} [(x_i - \mu^{(1)})^T \Sigma^{-1} (x_i - \mu^{(1)})]} \quad (2.75)$$

donde:

$$\Sigma^{-1} = \begin{bmatrix} \sigma_1^2 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & \sigma_2^2 & 0 & 0 \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ 0 & 0 & 0 & \sigma_R^2 \end{bmatrix} \quad (2.76)$$

En general:

$$P(x_i/c_k) = \frac{1}{(2\pi)^{R/2} (\det \Sigma)^{1/2}} e^{-\frac{1}{2} [(x_i - \mu^{(k)})^T \Sigma^{-1} (x_i - \mu^{(k)})]} \quad (2.77)$$

Tomando como función discriminante:

$$g(x_i)^{(k)} = \ln P(c_k) + \ln P(x_i/c_k) \quad (2.78)$$

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

$$g(x_i)^{(k)} = \ln P(c_k) - \frac{1}{2} (R \ln 2\pi + \ln (\det \Sigma)) - \frac{1}{2} (x_i^T - \mu^{(k)})^T \Sigma^{-1} (x_i - \mu^{(k)}) \quad (2.79)$$

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 $P(c_j) = P(k)$ y Σ es común. Por tanto:

$$g(x_i)^{(k)} = -\frac{1}{2} (x_i - \mu^{(k)})^T \Sigma^{-1} (x_i - \mu^{(k)}) = -\frac{1}{2} D_i^{(k)^2} \quad (2.80)$$

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

$$g(x_i)^{(k)} = -\frac{1}{2}x_i^T \Sigma^{-1} x_i + x_i^T \Sigma^{-1} \mu^{(k)} - \frac{1}{2}\mu^{(k)T} \Sigma^{-1} \mu^{(k)} \quad (2.81)$$

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

$$g(x_i)^{(k)} = x_i^T \Sigma^{-1} \mu^{(k)} - \frac{1}{2}\mu^{(k)T} \Sigma^{-1} \mu^{(k)} \quad (2.82)$$

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

$$CS_i^{(k)} = x_i^T \Sigma^{-1} \mu^{(k)} - \frac{1}{2}\mu^{(k)T} \Sigma^{-1} \mu^{(k)} \quad (2.83)$$

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

$$m^{(k)} = \frac{1}{r_k} \sum_{i=1}^{r_k} x_i^{(k)} \quad (2.84)$$

El *classification score* queda:

$$CS_i^{(k)} = x_i^T S_w^{-1} m^{(k)} - \frac{1}{2}m^{(k)T} S_w^{-1} m^{(k)} \quad (2.85)$$

Ésta es la denominada *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.3.4.2. SIMCA

Esta técnica supervisada de Reconocimiento de Patrones es un procedimiento de modelización blanda, ya que puede que algún caso no se clasifique dentro de alguna de las categorías existentes. Así, el método SIMCA [14, 26, 46-55] 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. En caso de pertenecer a otro tipo de distribución constituiría 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 Análisis en Componentes Principales por separado para cada una de las clases del conjunto de entrenamiento [56]:

$$\mathbf{X}^{(k)} = \mathbf{Y}^{(k)} \mathbf{U}^{\text{T}(k)} = y_1^{(k)} \mathbf{u}_1^{(k)} + y_2^{(k)} \mathbf{u}_2^{(k)} + \dots \quad (2.86)$$

Mediante el método de la validación cruzada y empleando el algoritmo NIPALS, explicado en el apartado II.3.2., se seleccionan f PC's explicativos de la mayor parte de la varianza de los datos para cada clase; así, se tiene:

$$\mathbf{X}^{(k)} = \sum_{i=1}^{f(k)} y_i^{(k)} \mathbf{u}_i^{\text{T}(k)} + \mathbf{E} \quad (2.87)$$

Donde \mathbf{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:

$$s_k^2 = \frac{SS}{(r_k - f^{(k)} - 1)(v - f^{(k)})} \quad (2.88)$$

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

$$SS = \sum_{i=1}^{r_k} \sum_{j=1}^f e_{ij}^2 \quad (2.89)$$

Para un elemento cualquiera, se tiene:

$$x_{kl}^{(k)} = \sum_{a=1}^{f^{(k)}} y_{ka}^{(k)} u_{al}^{(k)} + \varepsilon_{kl} \quad (2.90)$$

Con esta ecuación 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:

$$s_q^2 = \frac{\sum_{j=1}^v \varepsilon_{qj}^2}{v - f^{(k)}} \quad (2.91)$$

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:

$$F = \frac{s_q^2}{s_k^2} \quad (2.92)$$

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

II.4. Diseño de experimentos

En la sección II.1., cuando hablábamos del análisis de la varianza, se introdujo la idea de factor como cualquier aspecto de las condiciones experimentales que influye en el resultado de un experimento. Estos factores pueden dividirse en dos tipos, aquéllos que el experimentador puede alterar y variar a su voluntad, o factores controlados, y los

que no pueden ser controlados por el mismo, o factores incontrolados. Además, un factor puede ser cuantitativo o cualitativo, cuando sus posibles valores pueden o no ser ordenados numéricamente, respectivamente. Los diferentes valores que toma un factor se denominan niveles o tratamientos [2]. De este modo, el modelo de la superficie de respuesta puede escribirse como:

$$Y = \phi(x_1, x_2, \dots, x_i, \dots) + e \quad (2.93)$$

Donde x_i son los distintos factores que pueden afectar al experimento y e es el error experimental

El enfoque clásico de la planificación experimental se basaba en diseños de “uno a un tiempo”, es decir, se controlaba un solo factor en cada experimento. Este tipo de diseños requiere mucho tiempo y esfuerzo por parte del experimentador. Para mejorar el rendimiento de la experimentación y reducir el tiempo en el desarrollo del proceso se utiliza el diseño experimental [57].

El número de experimentos posibles, considerando todas las combinaciones de niveles de cada factor, de un diseño factorial completo, viene dado por la expresión:

$$N = n^f \quad (2.94)$$

Donde n es el número de niveles y f el número de factores. El diseño factorial completo más simple es aquél en el que se fijan dos niveles para cada factor: alto y bajo.

En general, el diseño experimental consta de tres etapas [2]:

1. Identificación de los factores que pueden influir en el experimento.
2. Diseño del experimento, minimizando el efecto de factores incontrolados.
3. Análisis estadístico de los datos para separar y evaluar los efectos de los factores implicados en el experimento.

A la hora de evaluar los efectos principales e interacciones entre factores, es muy común el uso del ANOVA [2, 58], aunque el empleo de métodos de regresión lineal múltiple, MLR, llevan al mismo resultado y pueden llegar a ser más sencillos [57].

II.4.1. Diseño factorial a dos niveles

Un diseño experimental a dos niveles requiere la realización de 2^f experimentos con cada factor a dos niveles. Primeramente hay que codificar los niveles según la siguiente regla: nivel alto = +1, nivel bajo = -1. La codificación de las variables es extremadamente importante para el análisis de datos porque nos proporciona un sistema de coordenadas adimensional de factores. En este espacio de factores, los niveles más altos y más bajo son +1 y -1, respectivamente, las coordenadas del centro del diseño son cero y coinciden con el origen de coordenadas. Codificar es equivalente a reemplazar cada factor por su *z-score* (valor z).

$$z_i = \frac{x_i - x_i^0}{\Delta x_i} \quad (2.95)$$

donde

$$x_i^0 = \frac{x_i^{alto} + x_i^{bajo}}{2} \quad (2.96)$$

y

$$\Delta x_i = \frac{x_i^{alto} - x_i^{bajo}}{2} \quad (2.97)$$

Otra ventaja de codificar es que la matriz del diseño consiste en vectores (columnas) ortogonales entre sí que simplifican en gran medida el análisis de la regresión. La matriz del diseño es la matriz $2^f \times f$ de los niveles codificados.

En el caso de tener tres factores ($f = 3$) codificados a dos niveles ($n = 2$) será necesario ejecutar el experimento $2^3 = 8$ veces para realizar el diseño completo. La matriz de diseño, que contiene 8×3 de niveles codificados, que se obtiene en este caso, se presenta en la Tabla II.3. Ésta contiene todas las posibles combinaciones para tres factores a dos niveles.

Tabla II.3. Matriz de diseño para tres factores, x_1 , x_2 , x_3 , con dos niveles y ocho experimentos.

| Nº exp. | Factor | | | Respuesta |
|---------|--------|-------|-------|-----------|
| | x_1 | x_2 | x_3 | Y |
| 1 | - | - | - | Y_1 |
| 2 | + | - | - | Y_2 |
| 3 | - | + | - | Y_3 |
| 4 | + | + | - | Y_4 |
| 5 | - | - | + | Y_5 |
| 6 | + | - | + | Y_6 |
| 7 | - | + | + | Y_7 |
| 8 | + | + | + | Y_8 |

El modelo estadístico de un diseño factorial a dos niveles es lineal. Estos modelos representan superficies más o menos curvadas debido a los términos de interacción entre factores, pero sin llegar a máximos o mínimos y se llaman modelos de primer orden [59]. La función de respuesta completa para tres factores según el modelo de MLR es:

$$\hat{Y} = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + b_{123}x_1x_2x_3 \quad (2.98)$$

Los coeficientes b_1 , b_2 y b_3 consideran los efectos principales de los factores, x_1 , x_2 y x_3 , respectivamente, b_{12} , b_{13} , b_{23} y b_{123} representan los términos de las tres interacciones de segundo y tercer orden, b_0 representa la respuesta en el nivel cero de cada factor, es decir, la respuesta del centro del diseño. Si los factores no tuvieran ningún efecto, los ocho rendimientos (señales o respuestas) se distribuirían alrededor de b_0 con un error experimental debido al ruido.

Los diseños factoriales a dos niveles se denominan diseños saturados, porque el número de ejecuciones requeridos (2^f) es igual al número de coeficientes a determinar (2^f). Así, a menos que se hicieran repeticiones o experimentos adicionales, no podrá estimarse el error, pues no hay grados de libertad, que corresponden al número de ensayos realizados menos el número de coeficientes a determinar, para la regresión [57].

A partir de las respuestas obtenidas ($Y_{a,b,c}$) para cada experimento, se puede estimar el valor de los coeficientes, pero, como ya hemos dicho, a falta de grados de libertad, no se podrá estimar los errores asociados a los mismos. La interpretación de estos valores deberá realizarse usando el sentido común, eliminando del modelo

aquellos coeficientes cuyo valor sea próximo a cero. Si tras esto, sólo consideráramos que 4 coeficientes son significativamente distintos de cero, tendríamos entonces 4 grados de libertad, y podríamos calcular el error asociado a cada coeficiente. En este caso, se realiza un ensayo de significación para los coeficientes de la regresión, basado en el test t de Student.

$$t_k = \frac{|b_k|}{s_{bk}} \quad (2.99)$$

Siendo b_k el coeficiente determinado y s_{bk} su desviación estándar asociada. Un coeficiente será significativo si el valor de t_k es mayor que el tabulado, $t_{\text{crit}}(\nu, \alpha)$, para ν grados de libertad, a un nivel de significación $\alpha=0.05$.

La única forma de realizar el análisis de los errores asociados a los coeficientes, sin obviar ninguno de ellos, es realizar replicados de los experimentos. Existen varias posibilidades, entre ellas, realizar duplicados de cada experimento o replicar en el centro del diseño, obteniendo 2×2^f y $2^f + r$ respuestas, respectivamente, o lo que es lo mismo, 2^f y r grados de libertad. En todos los casos se realizaría una prueba t, eliminando los coeficientes no significativos y recalculando el modelo.

II.4.2. Experimentos de bloque y diseño fraccional

Un requisito fundamental de la metodología de la superficie de respuesta es que todos los factores incontrolables produzcan como salida un ruido del fondo que varíe de forma aleatoria. Para asegurar esto, todas los experimentos del diseño factorial debe realizarse en las mismas condiciones ideales: tiempo, personal, equipo, aparato y lotes de reactivos, etc. Cuando el número de experimentos es demasiado grande, no se pueden llevar a cabo sin una subdivisión natural. En estos casos, los experimentos se deben agrupar en bloques. Un bloque se puede definir como un conjunto de experimentos escogidos en base a su homogeneidad (entre ellos) pero posiblemente diferentes, por término medio, de otros bloques [60].

Tabla II.4. Matriz de diseño para cuatro factores, x_1 , x_2 , x_3 y x_4 , con dos niveles y 8 experimentos, siendo $x_4 = x_1x_2x_3$ la variable de bloque.

| n° exp. | Factor | | | | Respuesta |
|---------|--------|-------|-------|-------------------|-----------|
| | x_1 | x_2 | x_3 | $x_4 = x_1x_2x_3$ | Y |
| 1 | - | - | - | - | Y_1 |
| 2 | + | - | - | + | Y_2 |
| 3 | - | + | - | + | Y_3 |
| 4 | + | + | - | - | Y_4 |
| 5 | - | - | + | + | Y_5 |
| 6 | + | - | + | - | Y_6 |
| 7 | - | + | + | - | Y_7 |
| 8 | + | + | + | + | Y_8 |

Es importante tener en cuenta que en el modelo de la superficie de respuesta la significación de los términos de interacción disminuyen al aumentar el orden de la misma. Así, para un modelo de tres factores, el término de la interacción de tercer orden es generalmente menos significativo que los de segundo orden y, en muchos casos, no es significativo. De acuerdo con esto, si se ignoran las interacciones de orden más alto, es posible desarrollar algunas reglas sencillas para formar bloques. Si consideramos de nuevo un diseño factorial a dos niveles para tres factores x_1 , x_2 y x_3 , los bloques del diseño factorial completo pueden escogerse para minimizar la pérdida de información, eligiendo uno o más de los factores de interacción mayores como "variables de bloque" [61-62]. En este caso el término de interacción de orden más alto involucra a los tres factores, x_1 , x_2 y x_3 , y el producto $x_1x_2x_3$ se tomaría como variable de bloque. En la Tabla II.4. se presenta la matriz de diseño, agregando los valores de esta variable de bloque como una nueva columna. Cuando $x_1x_2x_3 = 1$ se tiene el bloque I (ejecuciones 2, 3, 5 y 8). Por otra parte, para $x_1x_2x_3 = -1$, se tiene el bloque II (ejecuciones 1, 4, 6 y 7). Cada uno de estos dos bloques constituye una media fracción (2^{3-1}) del diseño completo (2^3). Si se admite que b_{123} es despreciable con respecto al resto de coeficientes, no importará el valor de la variable de bloque. Se pueden obtener algunas relaciones interesantes basadas en esto. En el bloque I $x_1x_2x_3 = 1$. Multiplicando a ambos miembros por x_3 , $x_1x_2x_3^2 = x_3$. Como $x_3^2 = 1$, $x_1x_2 = x_3$ y, de forma análoga, $x_1x_3 = x_2$ y $x_2x_3 = x_1$. Así, sustituyendo estas relaciones en el modelo de la respuesta factorial a dos niveles.

$$\hat{Y} = (b_0 + b_{123}) + (b_1 + b_{23})x_1 + (b_2 + b_{13})x_2 + (b_3 + b_{12})x_3 = B_0 + B_1x_1 + B_2x_2 + B_3x_3 \quad (2.100)$$

Aunque la interacción de tercer orden se considera despreciable queda incluida en el modelo. De acuerdo con esto, los coeficientes que corresponden a los efectos principales no pueden ser estimados separadamente realizando los experimentos del bloque I, y se dice que los efectos principales y las interacciones de segundo orden están confundidos (aliased) en los coeficientes B_i . Está claro que b_0 y el coeficiente de máxima interacción b_{123} también se confunden en B_0 .

Del mismo modo, para el bloque II

$$\hat{Y} = (b_0 - b_{123}) + (b_1 - b_{23})x_1 + (b_2 - b_{13})x_2 + (b_3 - b_{12})x_3 = B'_0 + B'_1x_1 + B'_2x_2 + B'_3x_3 \quad (2.101)$$

Así, un diseño de fracción mitad para tres factores (2^{3-1} experimentos) se caracteriza por una relación de contraste $x_1x_2x_3 = \pm 1$ o $x_3 = \pm x_1x_2$ que lleva a la siguiente estructura de alias: (b_1, b_{23}) , (b_2, b_{13}) y (b_3, b_{12}) . Los efectos principales e interacciones de segundo orden están confundidas.

Todos los diseños de fracción mitad tienen una confusión entre b_0 y $b_{123\dots f}$, considerado este término como no significativo. Desde un punto de vista práctico, si se consideran interacciones de tercer o mayor orden como no significativas, se puede concluir que para $f > 4$, el diseño de fracción mitad (2^{f-1}) produce estimaciones imparciales de los efectos principales y las interacciones de segundo orden.

Un concepto importante que surge de la posibilidad de separar los efectos principales y las interacciones es la resolución de un diseño. En un diseño factorial completo, se resuelven todas las interacciones y los efectos principales siendo la resolución completa. En un diseño de resolución V, se resuelven todas las interacciones binarias y efectos principales. En un diseño de resolución IV, se confunden entre sí las interacciones de segundo orden pero se separan de los efectos principales. Y en un diseño de resolución III se confunden los efectos principales con las interacciones de segundo orden.

Es posible realizar diseños de orden fraccional más alto, como un cuarto (2^{f-2}), un octavo (2^{f-3}) y en general, un k -avo (2^{f-k}). Un diseño factorial 2^{f-1} surge de agrupar los experimentos de un diseño 2^f ejecuciones en dos bloques. Un diseño 2^{f-k} es equivalente a agrupar 2^f ejecuciones en 2^k bloques seleccionando k variables de bloque. Así, si

realizamos un diseño 2^{5-2} necesitamos dos variables de bloque que involucren tres de los cinco factores, por ejemplo $x_1x_2x_4 = \pm 1$ y $x_1x_2x_5 = \pm 1$, que producen $2^2 = 4$ bloques. La resolución de este diseño de orden fraccional un cuarto es pequeña (III) puesto que todos los efectos principales se confunden con las interacciones de segundo orden. Para un número fijo de factores, la resolución del diseño fraccional disminuye al aumentar k. En la tabla II.5. se presentan las resoluciones y número de experimentos necesarios de varios diseños factoriales y fraccionales.

Cuando el número de experimentos es igual a $f + 1$ tenemos un diseño lineal ortogonal saturado de resolución III. Plackett y Burmann [63] desarrollaron diseños estudiando f factores con $N = f + 1$ experimentos, cuando N es cualquier múltiplo de cuatro, menor que 100 (salvo N=92). Si N es una potencia de 2, los diseños son idénticos a los estudiados. La clave para aplicar estos diseños es dar una secuencia de signos adecuada, como se muestra debajo para 12, 20, 24 y 36 experimentos:

N = 12: 1 1 -1 1 1 1 -1 -1 -1 1 -1

N = 20: 1 1 -1 -1 1 1 -1 1 -1 1 -1 1 -1 -1 -1 1 1 -1

N = 24: 1 1 1 1 1 -1 1 -1 1 1 -1 -1 1 1 -1 -1 1 1 -1 -1 -1

N = 36: -1 1 -1 1 1 1 -1 -1 -1 1 1 1 1 1 -1 1 1 1 -1 -1 1 -1 -1 -1 -1 1 -1 1 -1 1 1 -1 -1 -1

Tabla II.5. Resolución y número de experimentos necesarios para diseños completos y fraccionales 2^{f-k} .

| f | k | Diseño | Resolución | nº experimentos |
|---|---|-----------|------------|-----------------|
| 3 | 0 | 2^3 | Completa | 8 |
| 3 | 1 | 2^{3-1} | III | 4 |
| 4 | 0 | 2^4 | Completa | 16 |
| 4 | 1 | 2^{4-1} | IV | 8 |
| 5 | 0 | 2^5 | Completa | 32 |
| 5 | 1 | 2^{5-1} | V | 16 |
| 5 | 2 | 2^{5-2} | III | 8 |
| 6 | 0 | 2^6 | Completa | 64 |
| 6 | 1 | 2^{6-1} | V | 32 |
| 6 | 2 | 2^{6-2} | IV | 16 |
| 6 | 3 | 2^{6-3} | III | 8 |
| 7 | 0 | 2^7 | Completa | 128 |
| 7 | 1 | 2^{7-1} | V | 64 |
| 7 | 2 | 2^{7-2} | IV | 32 |
| 7 | 3 | 2^{7-3} | IV | 16 |
| 7 | 4 | 2^{7-4} | III | 8 |

Para construir la matriz de diseño completa de Plackett-Burmann, se escribe en la primera columna (x_1) la secuencia seleccionada (para 12, 20, 24 o 36 experimentos) La siguiente columna (x_2) se genera moviendo los elementos hacia abajo una fila, y poniendo el último elemento en la posición del primero. Se preparan las columnas siguientes de la misma forma. Finalmente, el diseño se completa agregando una fila rellena de -1. La matriz para $N=28$ se construye de distinta forma [64]. La estructura indistinguible (alias structure) es muy compleja en este tipo de diseño y hay que ser muy cuidadoso.

Los diseños fraccionales nos permiten agrupar los experimentos de un diseño factorial completo 2^f en 2^k bloques de 2^{f-k} ejecuciones cada uno. Sin embargo la resolución es peor cuando aumenta el orden fraccional. Los diseños lineales ortogonales saturados del tipo Plackett-Burman nos permiten investigar los efectos de f factores usando $f + 1$ experimentos, siendo una herramienta muy interesante, por ejemplo, en el estudio de la robustez de métodos analíticos. W. J. Youden [65], en su obra *Statistical Techniques for Collaborative Tests*, propuso una matriz de diseño con ocho combinaciones de siete factores para evaluar el efecto de los mismos en la robustez del método, similar al diseño 2^{7-4} de Plackett-Burman. En este, se bloquean las variables de modo que: $x_4 = x_1x_2$, $x_5 = x_1x_3$, $x_6 = x_2x_3$, $x_7 = x_1x_2x_3$. En la tabla II.6. se puede ver la matriz de diseño obtenida. Tras algunas manipulaciones algebraicas, el modelo de respuesta queda como sigue:

$$\hat{Y} = B_0 + B_1x_1 + B_2x_2 + B_3x_3 + B_4x_4 + B_5x_5 + B_6x_6 + B_7x_7 \quad (2.102)$$

donde

$$B_1 = b_1 + b_{24} + b_{35} + b_{67} \quad (2.103)$$

$$B_2 = b_2 + b_{14} + b_{36} + b_{57} \quad (2.104)$$

$$B_3 = b_3 + b_{15} + b_{26} + b_{47} \quad (2.105)$$

$$B_4 = b_4 + b_{12} + b_{56} + b_{37} \quad (2.106)$$

$$B_5 = b_5 + b_{13} + b_{46} + b_{27} \quad (2.107)$$

$$B_6 = b_6 + b_{23} + b_{45} + b_{17} \quad (2.108)$$

$$B_7 = b_7 + b_{34} + b_{25} + b_{16} \quad (2.109)$$

Si se bloquean las variables mediante relaciones de signo negativo, es decir, $x_4 = -x_1x_2$, $x_5 = -x_1x_3$, $x_6 = -x_2x_3$, $x_7 = -x_1x_2x_3$, el modelo de respuesta quedaría:

$$\hat{Y} = B'_0 + B'_1x_1 + B'_2x_2 + B'_3x_3 + B'_4x_4 + B'_5x_5 + B'_6x_6 + B'_7x_7 \quad (2.110)$$

con

$$B'_1 = b_1 - b_{24} - b_{35} - b_{67} \quad (2.111)$$

$$B'_2 = b_2 - b_{14} - b_{36} - b_{57} \quad (2.112)$$

$$B'_3 = b_3 - b_{15} - b_{26} - b_{47} \quad (2.113)$$

$$B'_4 = b_4 - b_{12} - b_{56} - b_{37} \quad (2.114)$$

$$B'_5 = b_5 - b_{13} - b_{46} - b_{27} \quad (2.115)$$

$$B'_6 = b_6 - b_{23} - b_{45} - b_{17} \quad (2.116)$$

$$B'_7 = b_7 - b_{34} - b_{25} - b_{16} \quad (2.117)$$

Cuando se llevan a cabo los experimentos de una de las dos matrices, por ejemplo la positiva, se obtendrán los coeficientes B_i y se estarán evaluando los efectos principales de los factores confundidos con las interacciones de segundo orden. Para poder evaluar los coeficientes de los efectos principales, b_i , será necesario realizar los experimentos de la matriz de diseño donde la relación entre las variables es negativa. De este modo dichos coeficientes se obtendrán, a partir de los valores de B_i y B'_i , como:

$$b_i = \frac{B_i + B'_i}{2} \quad (2.218)$$

Tabla II.6. Matriz de diseño 2^{7-4} de Plackett-Burman, donde las relaciones para obtener las variables de bloque son de signo positivo.

| n° exp. | Factor | | | | | | | Respuesta |
|---------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-----------|
| | x_1 | x_2 | x_3 | x_4 | x_5 | x_6 | x_7 | Y |
| 1 | + | + | + | + | + | + | + | Y_1 |
| 2 | + | + | - | + | - | - | - | Y_2 |
| 3 | + | - | + | - | + | - | - | Y_3 |
| 4 | + | - | - | - | - | + | + | Y_4 |
| 5 | - | + | + | - | - | + | - | Y_5 |
| 6 | - | + | - | - | + | - | + | Y_6 |
| 7 | - | - | + | + | - | - | + | Y_7 |
| 8 | - | - | - | + | + | + | - | Y_8 |

De esta forma, se necesita un total de 16 experimentos para determinar los coeficientes de los efectos principales. Existe la posibilidad de evaluar los efectos principales de los siete factores realizando solo los experimentos de una de las matrices de diseño [65, 66]. Si se considera el factor x_1 , la media de las respuestas de los experimentos en que el factor toma su valor máximo, \bar{Y}_{1+} , y mínimo, \bar{Y}_{1-} se calculan según las expresiones:

$$\bar{Y}_{1+} = \frac{Y_1 + Y_2 + Y_3 + Y_4}{4} \quad (2.219)$$

$$\bar{Y}_{1-} = \frac{Y_5 + Y_6 + Y_7 + Y_8}{4} \quad (2.220)$$

A continuación se calcula la diferencia entre las respuestas medias:

$$D_1 = \bar{Y}_{1+} - \bar{Y}_{1-} \quad (2.221)$$

De forma general, para un factor x_i se obtiene una diferencia D_i . Si el efecto de este factor no es significativo, es decir, si una variación pequeña del mismo no afecta a los resultados obtenidos en el experimento, la diferencia D_i debe valer cero. Se realiza

entonces un contraste de dos colas, basado en la prueba t de Student, para ver si D_i difiere significativamente de cero. El valor de t se calcula según la siguiente expresión:

$$t_i = \frac{\sqrt{2}|D_i|}{S_I} \quad (2.222)$$

Donde S_I es la desviación estándar obtenida en condiciones de precisión intermedia, es decir, a partir de replicados de una muestra de control en un periodo de tiempo corto, por ejemplo, varios días [66].

t_i se compara con el valor tabulado t_{crit} ($P = 0.05$, ν), donde ν son los grados de libertad usados en la estimación de S_I . Si t_i es mayor que t_{crit} , la diferencia D_i es significativamente distinta de cero, con lo cual, el factor x_i tiene un efecto significativo sobre la respuesta del experimento.

De esta forma, es posible evaluar el efecto de los siete factores realizando tan sólo ocho experimentos. Este mismo diseño puede emplearse para un número inferior de factores, simplemente, considerando los factores inexistentes como mudos. Por ejemplo, en el caso de tener cuatro factores, la matriz de diseño quedaría tal y como se presenta en la Tabla II.6., pero eliminando las columnas de x_5 , x_6 y x_7 .

II.5. Bibliografía

1. R. Compañó, A. Ríos. Garantía de la Calidad en los Laboratorios Analíticos. Editorial Síntesis. Madrid, 2002.
2. J.N. Miller and J.C. Miller, Statistics and chemometrics for analytical chemistry, 4^a ed., Prentice Hall, London, 2000.
3. A. Candolfi, D. L. Massart, S. Heuerding. Investigation of sources of variance which contribute to NIR-spectroscopic measurement of pharmaceutical formulations. *Analytica Chimica Acta*, **1997**, 345, 185-196.
4. R. R. Sokal, F. J. Rohlf. Biometry, 2nd edn., W. H. Freeman and Company. New York. 1981.
5. J. A. Rafter, M. L. Abell, J. P. Braselton. Multiple comparison methods for means. *SIAM Review*, **2002**, 44, 259-278.
6. H. L. Harter. Tables of range and studentized range. *Annals of Mathematical Statistics*, **1960**, 31, 1122-1147.
7. ISO 3534. Statistics. Vocabulary and Symbols. Part 1: Probability and general statistical terms, section 2.64. Geneva 1993.
8. S. Burke. Missing values, outliers, robust statistics & non-parametric methods. *LC-GC Europe Online Supplement*, **1999**, 19-24.
9. AOAC Official Methods Program Manual, Part 6: Guidelines for Collaborative Study. <http://www.aoac.org/vmeth/omamannual/omamannual.html>.
10. W. G. Cochran. The distribution of the largest of a set of estimated variances as a fraction of their total. *Annals of Eugenics*, **1941**, 11, 47-61.
11. F. Grubbs. Procedures for detecting outlying observations in samples. *Technometrics*, **1969**, 11, 1-21.
12. B. R. Kowalski, C .F. Bender. Pattern Recognition. A Powerful Approach to Interpreting Chemical Data. *Journal of the American Chemical Society*, **1972**, 94, 5632-5639.
13. C.M. Cuadras, Métodos de Análisis Multivariante, PPU, Barcelona, 1991.
14. 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.

15. K. Varmuza, Pattern Recognition in Chemistry, Springer-Verlag, Heidelberg, 1980, 25-29.
16. M. Meloun, J. Militky y M. Forina, Chemometrics for analytical chemistry, Vol.I: PC-aided statistical data analysis, Ellis Horwood Limited, Chimester, 1992, cap.5.
17. R.A. Fisher. The use of multiple measurments in taxonomic problems. *Annual Eugenics*, **1936**, 7, 179-188.
18. D. Coomans, M. Jonckheer, D. L. Massart, I. Broeckaert, P. Blockx. The application of linear discriminant analysis in the diagnosis of thyroid diseases. *Analytica Chimica Acta*, **1978**, 103, 409-415.
19. S. Wilks, Multidimensional Scatter in Olkin (Ed.), Contributions to Probability and Statistics, Stanford Press, 1960, 597-614.
20. G.P. McCabe. Computations for variable selection in discriminant analysis. *Technometrics*, **1975**, 17, 103-109.
21. B. K. Lavine. Clustering and Clasification of Analytical Data. Encyclopedia of Analytical Chemistry. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2000.
22. H. F. Kaiser. The application of electronic computers in factor analysis. *Educational and Psychological Measurement*, **1960**, 20, 141-151.
23. J. R. Piggott (Ed.). Statistical Procedures in Food Research. Elsevier Applied Science, Londres, 1986.
24. E. R. Malinowski. Determination of the number of factors and the experimental error in a data matrix. *Analytical Chemistry*, **1977**, 49, 612-617
25. E. R. Malinowski. Statistical F-tests for abstract factor analysis and target testing. *Journal of Chemometrics*, **1988**, 3, 49-60.
26. S. Wold. Cross-validatory estimation of the number of components in factor and principal components models. *Technometrics*, **1978**, 20, 397-404.
27. K. R. Gabriel. The biplot graphic display of matrices with application to principal component analysis. *Biometrika*, **1971**, 58, 453-467.
28. H.C. Romesburg, Cluster Analysis for Researchers, Lifetime Learning Publications, Belmont, California, 1984
29. D.L. Massart y L. Kaufmann, The interpretation of analytical chemical data by the use of Cluster Analysis, J. Wiley, Londres, 1983)

30. G. H. Lance, W. T. Williams. A general theory of classificatory sorting strategies I. Hierarchical systems. *Computer Journal*, **1967**, 9, 373-380.
31. K. J. Florek. Sur la liason et la division des points d'un ensemble fini. *Colloquium Math*, **1951**, 2, 282-285.
32. P. H. A. Sneath, R. R. Sokal. Numerical Taxonomy. W. H. Freeman, San Francisco, 1973.
33. R. R. Sokal y C. D. Michener. A statistical method for evaluating systematic relationships. *Kansas University Science Bulletin*. **1958**, 38, 1409-1438.
34. J.H. Ward. Hierarchical grouping to optimize an objective function. *Journal of the American Statistical Association*, **1963**, 58, 236-244.
35. R. Henrion, G. Henrion. Multivariate Datenanalyse. Springer-Verlag, Heidelberg, 1995.
36. E. H. Ruspini. Numerical Methods for Fuzzy Clustering. *Information Science*, **1970**, 2, 319-350.
37. L. A. Zadeh. Fuzzy sets. *Information and Control*, **1965**, 8, 338-353.
38. K. Varmuza. Pattern recognition in analytical chemistry. *Analytica Chimica Acta*, **1980**, 122, 227-240
39. L. Kryger. Interpretation of analytical chemical information by pattern recognition methods: a survey. *Talanta*, **1981**, 28, 871-887.
40. A. J. Stuper y P. C. Jurs. Structure-activity studies of barbiturates using pattern recognition techniques. *Journal of Pharmaceutical Science*, **1978**, 67, 745-751.
41. L. F. Escudero, Reconocimiento de Patrones, Paraninfo S.A., Madrid, 1977.
42. R.A. Fisher. The statistical utilization of multiples measurements. *Annals of Eugenics*, **1938**, 8, 376-378.
43. 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
44. C. R. Rao. Linear statistical inference and its applications. Wiley, New York, 1965.
45. D. Coomans, D. L. Massart, L. Kaufman. Optimization by statistical linear discriminant analysis in analytical chemistry. *Analytica Chimica Acta*, **1979**, 112, 97-122.
46. S. Wold. Pattern recognition by means of disjoint principal component models. *Pattern Recognition*, **1976**, 8, 127-139.

47. 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.
48. 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.
49. 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.
50. S. Wold y 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. p 243-282. **1997**.
51. 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.
52. B. E. H. Saxberg, D. L. Duewer, J. L. Booker, B. R. Kowalski. Pattern recognition and blind assay techniques applied to forensic separation of whiskies. *Analytica Chimica Acta*, **1978**, 103, 201-212.
53. M. Sjöström, U. Edlund. Analysis of carbon-13 NMR data by means of pattern recognition methodology. *Journal of Magnetic Resonance*, **1977**, 25, 285-297.
54. S. Wold, K. Anderson. Major components influencing retention indices in gas chromatography. *Journal of Chromatography*, **1973**, 80, 43-59.
55. S. Wold y 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, New York, 1978.
56. 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.
57. A. G. González. Two levels factorial designs based on multiple linear regression models: a tutorial digest illustrated by case studies. *Analytica Chimica Acta*, **1998**, 360, 227-241.

58. F. Yates. The design and analysis on factorial experiments, Farnham Royal: Commonwealth Agricultural Bureaux, **1959**.
59. A. Delacroix, C. Porte, Utilisation de plans d'expériences associés à des méthodes directes pour l'optimisation en chimiométrie. *Analisis*, **1996**, 24, M22-M25.
60. G.T. Wernimont, Use of statistics to develop and evaluate analytical methods, (ed.) William Spendley, AOAC, Arlington, Virginia, **1990**.
61. E. Morgan, K. W. Burton, P. A. Church. Practical exploratory experimental designs. *Chemometrics and Intelligent Laboratory System*, **1989**, 5, 283-302.
62. R. S. Strange. Introduction to experiment design for chemists. *Journal of Chemical Education*, **1990**, 67, 113-115.
63. R. L. Plackett, J. P. Burman. Design of Optimal Multifactorial Experiments. *Biometrika*, **1946**, 33, 305-325.
64. D. C. Montgomery. Design and analysis of experiments, 3rd ed., Wiley, NY, **1991**.
65. W. J. Youden. Statistical techniques for collaborative tests, The AOAC, Washington, **1967**.
66. V.J. Barwick, S.L.R. Ellison. VAM Project 3.2.1. Development and Harmonisation of measurement uncertainty principles. Part (d): Protocol for uncertainty evaluation from validation data. LGC Report, Reference LGC/VAM/1998/088, **2000**.

III. Parte experimental

III.1. Material y reactivos

III.1.1. Aparatos

- Espectrómetro de plasma inducido acoplado FISIONS-ARL 3410 (FISIONS Instruments, Valencia, CA) equipado con:

- Antorcha Minitorch.
- Nebulizador Meinhard.

- Espectrofotómetro de absorción atómica PERKIN-ELMER 1100B (Bodenseewerck Perkin-Elmer GmbH, Überlingen, Germany) equipado con:

- Corrector de fondo de lampara de deuterio.
- Atomizador electrotérmico de horno de grafito HGA-400.
- Muestreador automático AS-40.

- Cromatógrafo líquido (WATERS Corporation, Milford, Massachussets):

- Bomba binaria para HPLC WATERS 1525.
- Inyector Rheodyne con bucle de 20 μ l.
- Detector de fila de fotodiodos WATERS 2996.
- Columna cromatográfica de fase reversa, C18, 250 mm de longitud, 4.6 mm d.i., 5 μ m de tamaño de partícula.
- Horno para columna WATERS 1500
- Software: EmpowerTM Service Pack A.

- Horno Selecta (Rotaterm, Barcelona, España) equipado con un control de temperatura OMRON E5H2.

- Baño de arena Selecta.

III.1.2. Reactivos y disoluciones

Todos los reactivos utilizados en la realización de este trabajo fueron de calidad *para análisis*.

III.1.2.1. Reactivos

- Ácido bórico (Merck)
- Ácido clorhídrico (32%) (Merck)
- Ácido nítrico (65%) (Merck)
- Ácido nítrico (69%) (Merck)
- Ácido perclórico (60%) (Merck)
- Ácido sulfúrico (96%) (Merck)
- Alambre de hierro (Merck)
- Anetol (Fluka)
- Carbonato cálcico (Panreac)
- Cinta de magnesio (Merck)
- Cloruro potásico (Merck)
- Cloruro sódico (Panreac)
- Disolución estándar de cobre (1000 mg/l) (Merck)
- Disolución estándar de plomo (1000 mg/l) (Merck)
- Disolución estándar de silicio (1000 mg/l) (Merck)
- Disolución de nitrato de paladio (2% en Pd) (SCP SCIENCE)
- Etanol absoluto (Panreac)
- Metanol Gradient Quality (Romil)
- Nitrato de magnesio (Merck)
- Peróxido de hidrógeno (30%) (Merk)
- Zinc metálico (Merk)

III.1.2.2. Patrones

- Las disoluciones patrón (1000 mg/l) de B, Ca, Fe, Mg, Na y Zn, se prepararon de acuerdo con lo descrito en la guía de preparación de patrones de espectroscopia atómica de PERKIN-ELMER (Norwalk, CN) [1]. En el caso de silicio se usó un patrón comercial. Las disoluciones de trabajo se obtuvieron por dilución de las anteriores, empleando siempre agua tratada con un sistema Milli-Q. (Millipore, Bedford, MA).

- Disoluciones de trabajo de cobre y plomo preparadas a partir de las correspondientes disoluciones comerciales de 1000 mg/l .

- Disolución de trabajo de paladio, utilizado como modificador químico, preparada a partir de la disolución comercial con agua desionizada.

- Disolución de $Mg(NO_3)_2$ (25 g/l) utilizado como modificador químico, preparada a partir de nitrato de magnesio. Las disoluciones de trabajo se obtuvieron por dilución.

- Disolución de etanol/agua/ácido nítrico 40:58:2, preparada con etanol absoluto, agua tratada con un sistema Milli-Q y ácido nítrico del 69%, utilizada como diluyente en la determinación de cobre mediante ET-AAS.

- Patrón de anetol (5000 mg/l). Se toman 0.5 ml de reactivo puro (98% , 0.98 g/ml) enrasando con metanol hasta 100 ml. Las disoluciones de trabajo se obtuvieron por dilución, empleando siempre metanol de calidad para HPLC.

III.1.3. Muestras

III.1.3.1 Muestras analizadas mediante ICP-AES

Se han analizado 115 muestras de varias marcas comerciales que podemos encontrar en el mercado español. De las 36 muestras con denominación de origen reconocida [2], 22 son de Cazalla, 6 de Rute y 8 de Chinchón. El resto de las muestras tienen distinta procedencia geográfica. Las muestras fueron obtenidas en distintos puntos de venta al por menor. La Tabla III.1. presenta la procedencia de dichas muestras junto con el código asignado a cada una.

Tabla III.1. Muestras analizadas mediante ICP-AES.

| Localidad | Provincia | nº de muestras | Códigos |
|--------------|-----------|----------------|-------------|
| Cazalla | Sevilla | 22 | 1C-22C |
| Rute | Córdoba | 6 | 23R-28R |
| Chinchón | Madrid | 8 | 29Ch-36Ch |
| Constantina | Sevilla | 6 | 37Cs-42Cs |
| Estepa | Sevilla | 6 | 43E-48E |
| Carmona | Sevilla | 6 | 49Ca-54Ca |
| Utrera | Sevilla | 6 | 55U-61U |
| Doña Mencía | Córdoba | 6 | 62DM-67DM |
| Valverde | Huelva | 12 | 68V-79V |
| Cortegana | Huelva | 6 | 80Cr-85Cr |
| Zalamea | Huelva | 8 | 86Z-93Z |
| Algezares | Murcia | 6 | 94Ag-99Ag |
| Almendralejo | Badajoz | 8 | 100Al-107Al |
| Badalona | Barcelona | 8 | 108B-115B |

III.1.3.2. Muestras analizadas mediante ET-AAS

Se ha determinado el contenido en cobre y plomo en 26 muestras de distintas marcas comerciales de anís obtenidas en puntos de ventas al pormenor. La categoría y código asignado a cada muestra se presentan en la tabla III.2.

Tabla III.2. Muestras analizadas mediante HPLC-DAD.

| Localidad | Provincia | Código | Localidad | Provincia | Código |
|------------------|------------------|---------------|------------------|------------------|---------------|
| Cazalla | Sevilla | 1C | Utrera | Sevilla | 14U |
| Cazalla | Sevilla | 2C | Doña Mencía | Córdoba | 15DM |
| Cazalla | Sevilla | 3C | Valverde | Huelva | 16V |
| Rute | Córdoba | 4R | Valverde | Huelva | 17V |
| Rute | Córdoba | 5R | Cortegana | Huelva | 18Cr |
| Chinchón | Madrid | 6Ch | Zalamea | Huelva | 19Z |
| Chinchón | Madrid | 7Ch | Algezares | Murcia | 20Ag |
| Chinchón | Madrid | 8Ch | Almendralejo | Badajoz | 21Al |
| Constantina | Sevilla | 9Cs | Badalona | Barcelona | 22B |
| Estepa | Sevilla | 10E | Badalona | Barcelona | 23B |
| Estepa | Sevilla | 11E | Torreperogil | Jaén | 24T |
| Carmona | Sevilla | 12Ca | Segovia | Segovia | 25S |
| Carmona | Sevilla | 13Ca | Zizurkil | Guipúzcoa | 26Zi |

III.1.3.3. Muestras analizadas mediante HPLC-DAD

Las muestras analizadas se corresponden con las de la sección anterior. Los códigos a utilizar son similares a los que se muestran en la tabla III.2.

III.2. Procedimientos

III.2.1. Determinación de B, Ca, Fe, Mg, Na, Si y Zn mediante ICP-AES

Para la determinación de los elementos anteriormente citados es preciso llevar a cabo la mineralización de las muestras. Se aplicaron seis métodos de digestión distintos. Dos métodos fueron por vía seca o *dry ashing* (DA) y cuatro por vía húmeda o *wet ashing* (WA). Las características de cada uno de ellos se detallan a continuación.

III.2.1.1. Métodos de mineralización por vía seca

- Método 1 (DA1).

Este método es una modificación del recomendado por la legislación española vigente [3]. 25 ml de anís se depositan en una cápsula de porcelana, calentando en un baño de arena a 70-80°C, hasta obtener una reducción en volumen proporcional al contenido alcohólico de la muestra. Se añaden 2 ml de H₂SO₄ para carbonizar la muestra y se continúa calentando hasta la completa eliminación del ácido. Posteriormente se lleva la cápsula a un horno mufla equipado con un regulador de temperatura, donde se realiza a cabo la calcinación de la muestra, siguiendo el programa de temperatura mostrado en la Tabla III.3. Las cenizas obtenidas se lavan con 2 ml de agua evaporándola posteriormente en el baño de arena. Se vuelve a aplicar el programa de temperatura en el horno, tantas veces como sea necesario, hasta obtención de cenizas blancas. Estas cenizas se redisuelven en 1 ml de HNO₃ y 2 ml de agua, que se pasan a un matraz aforado de 25 ml y se enrasa con agua. La disolución resultante se pasa a través de un filtro de 0.45 µm antes de su análisis mediante ICP-AES.

- Método 2 (DA2)

Se depositan 25 ml de anís en una cápsula de porcelana, calentando en un baño de arena a 70-80°C, hasta obtener una reducción en volumen proporcional al contenido alcohólico de la muestra. Se añade 1 ml de H₂SO₄ y se continúa calentando hasta eliminar completamente el ácido. El programa de temperatura del horno es similar al que aparece en la Tabla III.3, pero se llega a una temperatura final de 525°C, empleando entre 12 y 15 min en alcanzarla y manteniéndola durante 3 h. Después de

este tratamiento se redisuelven las cenizas obtenidas con 2 ml de HCl 0.2 N. La disolución se trasvasa a un matraz aforado de 25 ml, enrasando con agua. Se procede al análisis de la muestra mediante ICP-AES, previa filtración (0.45 μ m) de la disolución.

Tabla III.3. Programa de temperatura para la etapa de calcinación del método DA1.

| Temperatura (T ₁ - T ₂) | Tiempo estimado de subida de la temperatura | Tiempo mantenido a T ₂ |
|---|--|--------------------------------------|
| T _{amb} -100°C | 7-10 min. | 15 min. |
| 100-200°C | 7-10 min. | 15 min. |
| 200-300°C | 7-10 min. | 15 min. |
| 300-400°C | 7-10 min. | 15 min. |
| 400-450°C | 4 min. | 2 h |

III.2.1.2. Mineralización húmeda

Para llevar a cabo la mineralización de las muestras por vía húmeda se emplearon cuatro mezclas distintas de ácidos. Las mezclas utilizadas y los procedimientos seguidos se especifican a continuación.

- Método 1 (WA1)

En este procedimiento se utiliza una mezcla HNO₃/H₂SO₄ (10:1) para llevar a cabo la digestión. Se colocan 25 ml de anís en un vaso de precipitados de teflón® y se calienta a 70-80°C en un baño de arena, hasta una reducción de volumen proporcional al contenido alcohólico de la muestra. Se añade 1 ml de H₂SO₄ y 10 de HNO₃, calentando (100 °C aprox.) hasta una mineralización completa de la muestra. Si es necesario se añaden pequeñas cantidades adicionales de HNO₃ para clarificar la muestra. Se calienta hasta casi sequedad. Se deja enfriar y, una vez que la muestra alcance la temperatura ambiente, se transfiere a un matraz aforado de 25 ml, enrasando con agua.

- Método 2 (WA2)

En este caso se utiliza una mezcla $\text{HNO}_3/\text{HClO}_4$ (10:1). Se toman 25 ml de una muestra de anís y se llevan a un vaso de teflón®. Para evitar proyecciones por una reacción brusca se añaden gota a gota 5 ml de HNO_3 . Se calienta durante unos 10 minutos y se añaden otros 5 ml de ácido, de la misma forma. Se calienta (100 °C aprox.) hasta que no se observe emisión de vapores rojos de NO. En este instante se añade 1 ml de HClO_4 y se continúa con el calentamiento (100 °C aprox.). Si es necesario, se añade poco a poco más ácido perclórico para completar la mineralización de la muestra. Se calienta para reducir el volumen de la muestra, hasta casi sequedad, trasvasándola finalmente a un matraz aforado de 25 ml y enrasando con agua.

- Método 3 (WA3)

Para la mineralización de la muestra se utiliza una mezcla de $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ (10:1). Se colocan 25 ml de una muestra de anís en un vaso de teflón®. Se añaden, gota a gota, 5 ml de HNO_3 , con el fin de evitar reacciones bruscas. Se calienta durante unos 10 minutos y se añaden otros 5 ml de nítrico, de la misma forma. Se calienta (100 °C aprox.) hasta que no se observe emisión de vapores rojos de NO. Se añade 1 ml de H_2O_2 , poco a poco, para evitar proyecciones.

- Método 4 (WA4)

Se depositan 25 ml de anís en un vaso de precipitados de teflón® calentando a 70-80°C en un baño de arena. Se elimina el alcohol de la muestra, reduciendo el volumen en una cantidad proporcional al contenido en alcohol de la muestra. Se añaden 10 ml de ácido sulfúrico calentando suavemente hasta observar que la muestra comienza a carbonizarse. En ese instante se añade 1 ml de peróxido de hidrogeno para clarificar la misma. Este proceso se repite tantas veces como sea necesario, con el fin de evitar la carbonización de la muestra. Una vez mineralizada la muestra, se deja enfriar a temperatura ambiente y se transfiere a un matraz aforado de 25 ml, enrasando con agua.

Todas las disoluciones resultantes de la aplicación de estos procedimientos de mineralización se filtran (0.45 μm). La determinación de los elementos anteriormente

citados se realiza mediante ICP- AES. Las condiciones instrumentales de las medidas se muestran en la Tabla III.4.

Tabla III.4. Condiciones instrumentales del ICP-AES

| Frecuencia de RF | 27.12 MHz |
|--------------------------------|----------------|
| Potencia incidente | 650 W |
| Flujo de Argón (Refrigerante) | 7.5 l/min |
| Flujo de Argón (Plasma) | 0.8 l/min |
| Tipo de antorcha | Minitorch |
| Tipo de nebulizador | Meinhard |
| Flujo de aspiración de muestra | 2.3 ml/min |
| Elemento | λ (nm) |
| B | 249.796 |
| Ca | 393.366 |
| Fe | 259.940 |
| Mg | 279.553 |
| Na | 589.592 |
| Si | 251.637 |
| Zn | 213.856 |

III.2.2. Determinación de cobre y plomo mediante ET-AAS

La determinación de estos dos elementos se realiza de manera directa en las muestras de anís diluidas con etanol/agua/ácido nítrico (40:58:2), previa adición del modificador o modificadores químicos correspondientes en cada caso. La concentración de los elementos se relaciona con el área de pico obtenido durante la lectura de la absorbancia en función del tiempo durante la atomización. Las diluciones se realizan de modo que el contenido en estos elementos queden dentro de la recta de calibrado. Posteriormente se analizaron las muestras mediante espectroscopía de absorción atómica con atomización electrotérmica, utilizando un tubo de grafito provisto de plataforma de L'vov. Las condiciones de medida se muestran en la tabla II.5 y II.6.

Tabla III.5. Condiciones experimentales de medida para cobre mediante ET-AAS

| Elemento | Cobre | | |
|--|---------------------|-----------|-----------------|
| Programa de T ^a | T ^a (°C) | Rampa (s) | Permanencia (s) |
| Secado1 | 80 | 5 | 15 |
| Secado 2 | 110 | 10 | 20 |
| Mineralización | 1300 | 10 | 15 |
| Atomización | 2300 | 0 | 3 |
| Limpieza | 2500 | 2 | 3 |
| Volumen inyectado (µl) | 20 | | |
| Intensidad de corriente de la lámpara (mA) | 8 | | |
| Longitud de onda (nm) | 324.8 | | |
| Flujo de argón ml/min * | 300 | | |
| Modificador de matriz | 30 mg/l Pd | | |

* Durante la atomización y lectura se detiene el flujo de argón

Tabla III.5. Condiciones experimentales de medida para plomo mediante ET-AAS

| Elemento | | Plomo | |
|--|---------------------|--|-----------------|
| Programa de T ^a | T ^a (°C) | Rampa (s) | Permanencia (s) |
| Secado1 | 80 | 5 | 15 |
| Secado 2 | 110 | 10 | 20 |
| Mineralización | 900 | 10 | 15 |
| Atomización | 1800 | 0 | 3 |
| Limpieza | 2500 | 2 | 3 |
| Volumen inyectado (µl) | | 20 | |
| Potencia de la lámpara de descarga (W) | | 8 | |
| Longitud de onda (nm) | | 283.3 | |
| Flujo de argón ml/min * | | 300 | |
| Modificador de matriz | | 10 mg/l Mg(NO ₃) ₂ / 30 mg/l Pd | |

* Durante la atomización y lectura se detiene el flujo de argón

III.2.3. Determinación de anetol mediante HPLC-DAD

Antes de realizar la determinación de anetol en muestras de anisados se preparan diluciones de las mismas en metanol. La dilución se llevó a cabo de forma adecuada para que el contenido en anetol quedase incluido en el rango lineal de calibración. Posteriormente, las muestras se analizaron mediante cromatografía líquida de alta resolución con detector de fila de diodos (HPLC-DAD). Las condiciones cromatográficas se presentan en la Tabla III.6.

Tabla III.6. Condiciones cromatográficas para la determinación de anetol en anisados.

| | |
|-------------------------------|----------------------|
| Fase móvil | Metanol/agua (80:20) |
| Fase estacionaria | Octadecilsilano |
| Flujo de fase móvil | 1 ml/min |
| Volumen de inyección | 20 µl |
| Temperatura de la columna | 30 °C |
| Longitud de onda de detección | 257 nm |

III.3. Bibliografía

1. Standard Conditions, *Analytical Methods for Atomic Absorption Spectrophotometry*, PERKIN-ELMER, **1982**, Norwalk, Connecticut, U.S.A.
2. Reglamento (CEE) núm. 1576/89, 29-5-1989 (DOCE 12-6-1989, núm. L 160, P. 0001-0017).
3. Orden 8-5-1987, Ministerio de Relaciones con las Cortes y de Secretaria del Gobierno (BOE 13-5-1987, núm. 114, pág. 13973)

IV. Resultados y discusión

IV.1. Determinación de B, Ca, Fe, Mg, Na, Si y Zn por ICP-AES

IV.1.1. Comparación de los métodos de mineralización

En la sección III.2.1. se propusieron seis métodos de mineralización distintos para la determinación de metales en bebidas alcohólicas anisadas. A continuación se lleva a cabo una comparación de los mismos, con el fin de seleccionar el más adecuado. Teniendo en cuenta que no existen materiales de referencia certificados de este tipo de muestras en el mercado, ni de otro tipo de bebidas similares en las que se certifique el contenido en los elementos a determinar, la comparación se realiza mediante el análisis de la recuperaciones obtenidas tras aplicar cada método de digestión a muestras fortificadas [1, 2].

En nuestro caso se fortificaron, con los elementos anteriormente citados, distintas alícuotas de una muestra de anís, obtenida al mezclar el contenido de varias botellas del mismo tipo. De esta forma se realiza el estudio sobre una muestra con un tipo de matriz medio. Se realizaron adiciones a cinco niveles de concentración (Tabla IV.1.), con el fin de cubrir los rangos encontrados en distintas muestras de anisados. Las muestras dopadas se dejaron reposar durante veinticuatro horas para permitir la interacción entre los analitos añadidos y la matriz de la muestra. Se realizaron seis replicados por cada nivel de adición.

Tabla IV.1. Cantidades añadidas (mg/l) en cada nivel de fortificación.

| Nivel de adición | B | Ca | Fe | Mg | Na | Si | Zn |
|------------------|------|----|------|------|----|-----|------|
| 1 | 0,1 | 1 | 0,1 | 0,1 | 1 | 0,4 | 0,1 |
| 2 | 0,25 | 2 | 0,25 | 0,25 | 2 | 0,6 | 0,25 |
| 3 | 0,5 | 3 | 0,5 | 0,5 | 5 | 0,8 | 0,5 |
| 4 | 0,75 | 4 | 0,75 | 0,75 | 7 | 1 | 0,75 |
| 5 | 1 | 5 | 1 | 1 | 10 | 1,2 | 1 |

El análisis de las recuperaciones se llevó a cabo siguiendo un esquema anidado [2] como el explicado en la Sección II.1.1. La muestra se mineralizó mediante el

método i , tras haber sido fortificada con una cantidad de analito j , y fue analizada mediante ICP-AES realizando k replicados. Siguiendo el esquema de la Figura II.1. R_{ijk} es la recuperación k -ésima obtenida para el método i en el nivel j . \bar{R}_{ij} es el valor medio de las recuperaciones R_{ijk} . \bar{R}_i es la recuperación media obtenida para el método i . $\bar{\bar{R}}$ es la media total de todas las recuperaciones.

La recuperación elemental del k replicado, en el nivel de adición j de la muestra mineralizada por el método i se calcula según la expresión:

$$R_{ijk} = \frac{C_{obs} - C_{nat}}{C_{ad}} \times 100 \quad (4.1)$$

donde C_{nat} es la concentración de analito en la muestra sin fortificar, C_{obs} la encontrada en la muestra fortificada y C_{ad} es la concentración añadida de analito.

Para cada uno de los analitos, a partir de los valores de recuperación R_{ijk} , se realizó un análisis de la varianza de dos factores anidados. El factor correspondiente al nivel de fortificación (B) se anidó en el factor método de mineralización (A). Los cálculos se realizaron usando el paquete informático STATISTICA'99 de Statsoft™ (Tulsa, OK, USA) [3].

Cada uno de los métodos debe ser validado para todo el rango de los niveles de adición estudiados [4]. Debe cumplirse entonces que las recuperaciones de cada método, para todos los niveles, sean estadísticamente iguales a la unidad. Por otra parte, si todos los métodos son igualmente válidos, no deben existir diferencias significativas entre los resultados encontrados para cada uno de ellos. Por todo esto, para un nivel de adición fijo b , los valores medios \bar{R}_{ib} obtenidos para cada método i deben ser estadísticamente iguales. Además, si las recuperaciones obtenidas tras aplicar cualquiera de los métodos sólo están afectadas por errores de tipo aleatorio, las varianzas obtenidas para un nivel de adición b , variando el método de mineralización utilizado, S_{ib}^2 , tampoco deben presentar diferencias significativas entre sí.

La identificación y eliminación de datos aberrantes, que pueden alterar los resultados obtenidos del ANOVA, se lleva a cabo utilizando el mismo esquema (Figura IV.1) aplicado al análisis de la varianza en los ensayos colaborativos [5].

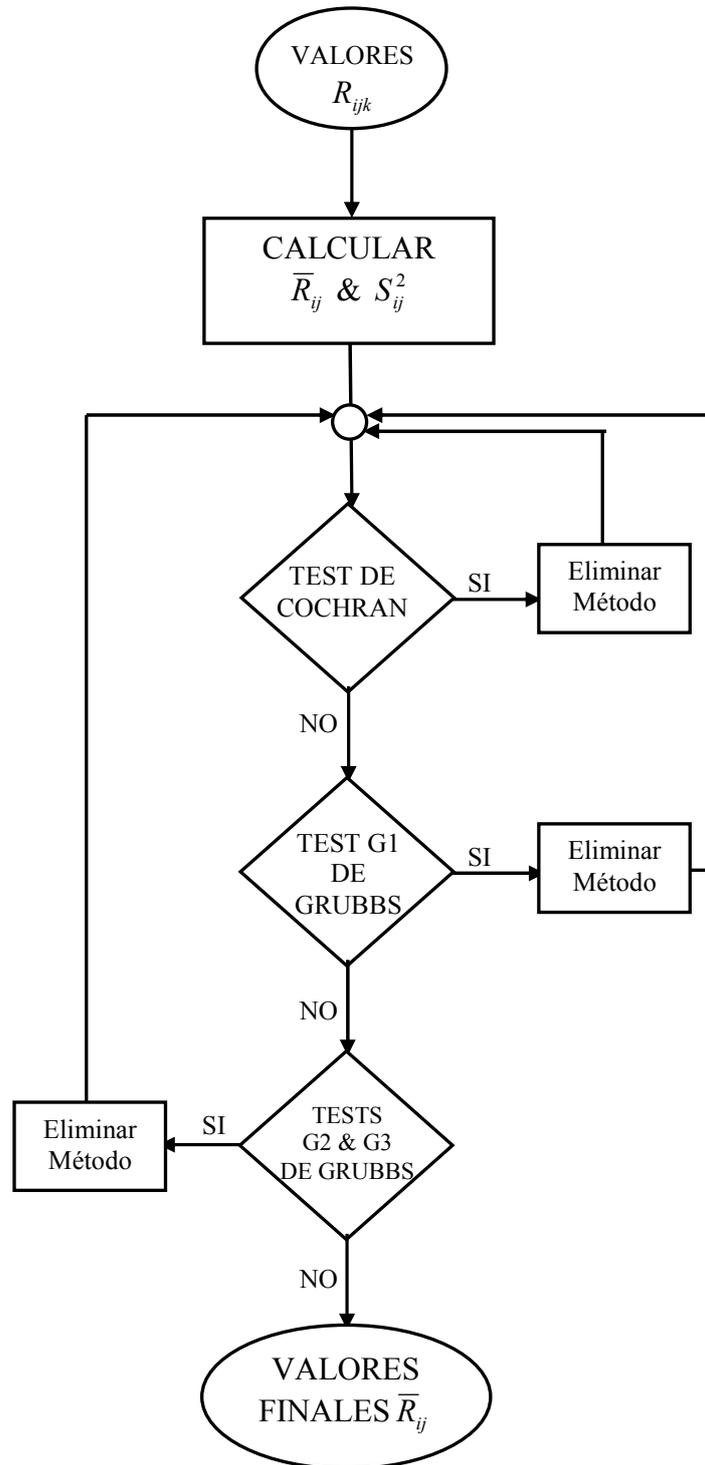


Figura IV.1. Diagrama de flujo para aplicar los distintos tests de *outliers* en cada nivel de adición

La prueba de Cochran [6] se utiliza para detectar métodos cuya varianza de replicación es significativamente mayor que las del resto, es decir *outliers* dispersivos. Las pruebas de Grubbs [7] se emplean para la detección de métodos que producen un valor de recuperación promedio aberrante, o lo que es lo mismo, *outliers*, centrales. Los métodos que producen valores anómalos, ya sean dispersivos o centrales, para cada uno de los niveles y analitos se presentan en la Tabla IV.2. Las Figuras IV.2 a IV.8 muestran los datos obtenidos mediante diagramas de caja.

Como se puede observar, los métodos por vía seca, DA1 y DA2, presentan valores anómalos para cada uno de los elementos, al menos a dos niveles de adición. El método por vía húmeda WA1 lleva a resultados aberrantes sólo en el caso de silicio. De acuerdo con esto, ya que no queda cubierto todo el rango de niveles de fortificación, los métodos por vía seca no se consideran en los cálculos de ANOVA. De este modo, los datos obtenidos por los métodos WA2, WA3 y WA4 se emplean para realizar dichos cálculos. El método WA1 se considera también, excepto en el caso del silicio.

Tabla IV.2. Métodos de mineralización eliminados para cada uno de los analitos en cada nivel de fortificación

| Nivel de fortificación | Analitos | | | | | | |
|------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------------|------------|
| | B | Ca | Fe | Mg | Na | Si | Zn |
| 1 | | DA1 DA2 | DA1 DA2 | DA1 DA2 | DA1 DA2 | DA1 | DA1 DA2 |
| 2 | | DA1 DA2 | DA1 DA2 | DA2 | | DA1 DA2 WA1 | DA2 |
| 3 | DA1 DA2 | DA1 DA2 | DA2 | DA2 | DA1 | DA1 DA2 | DA2 |
| 4 | DA2 | DA1 DA2 | DA2 | DA1 DA2 | DA1 DA2 | DA1 DA2 WA1 | DA1 DA2 |
| 5 | DA1 DA2 | | DA1 DA2 | | | DA1 DA2 WA1 | DA1 DA2 |

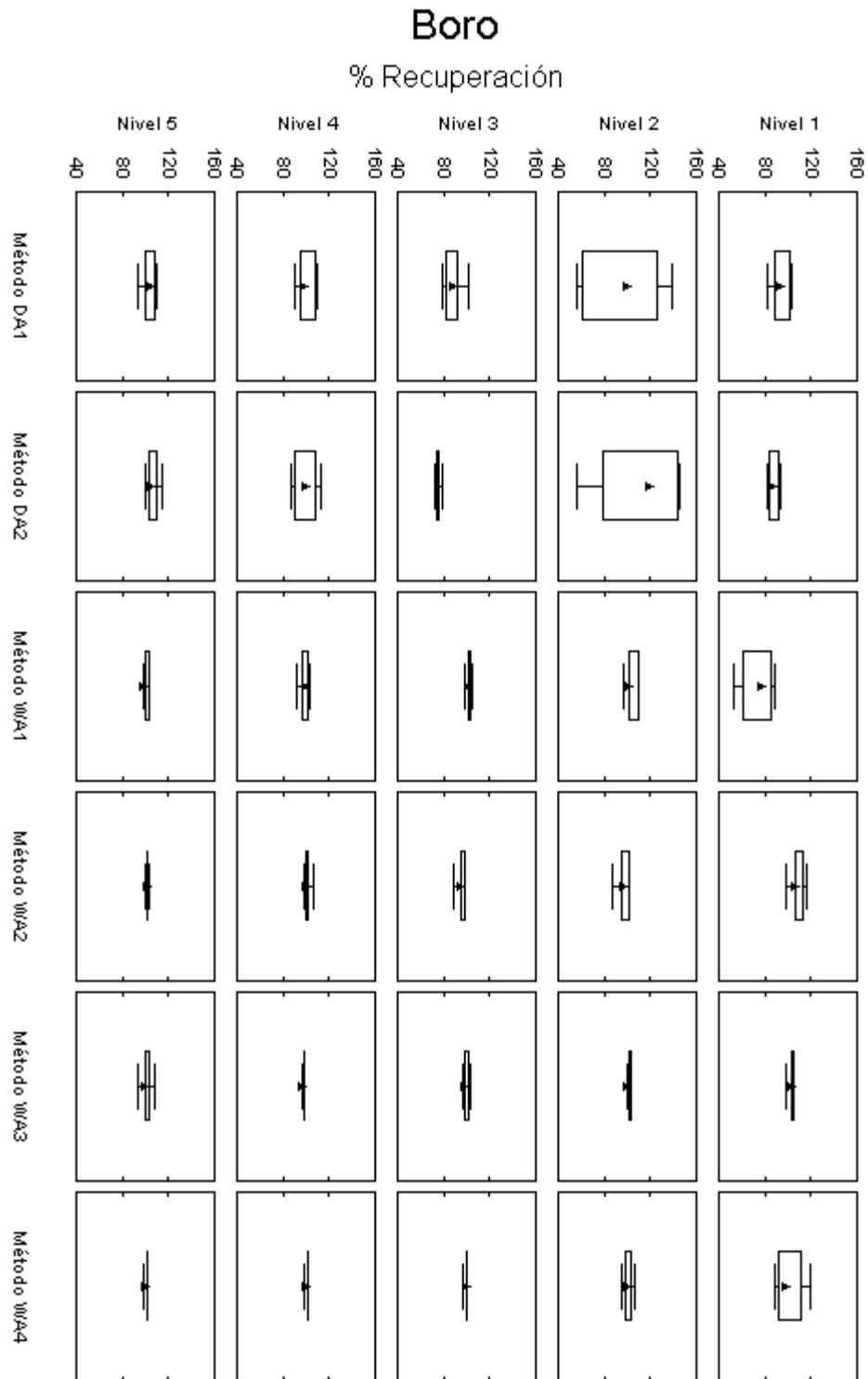


Figura IV.2. Recuperaciones de boro por nivel y método de mineralización

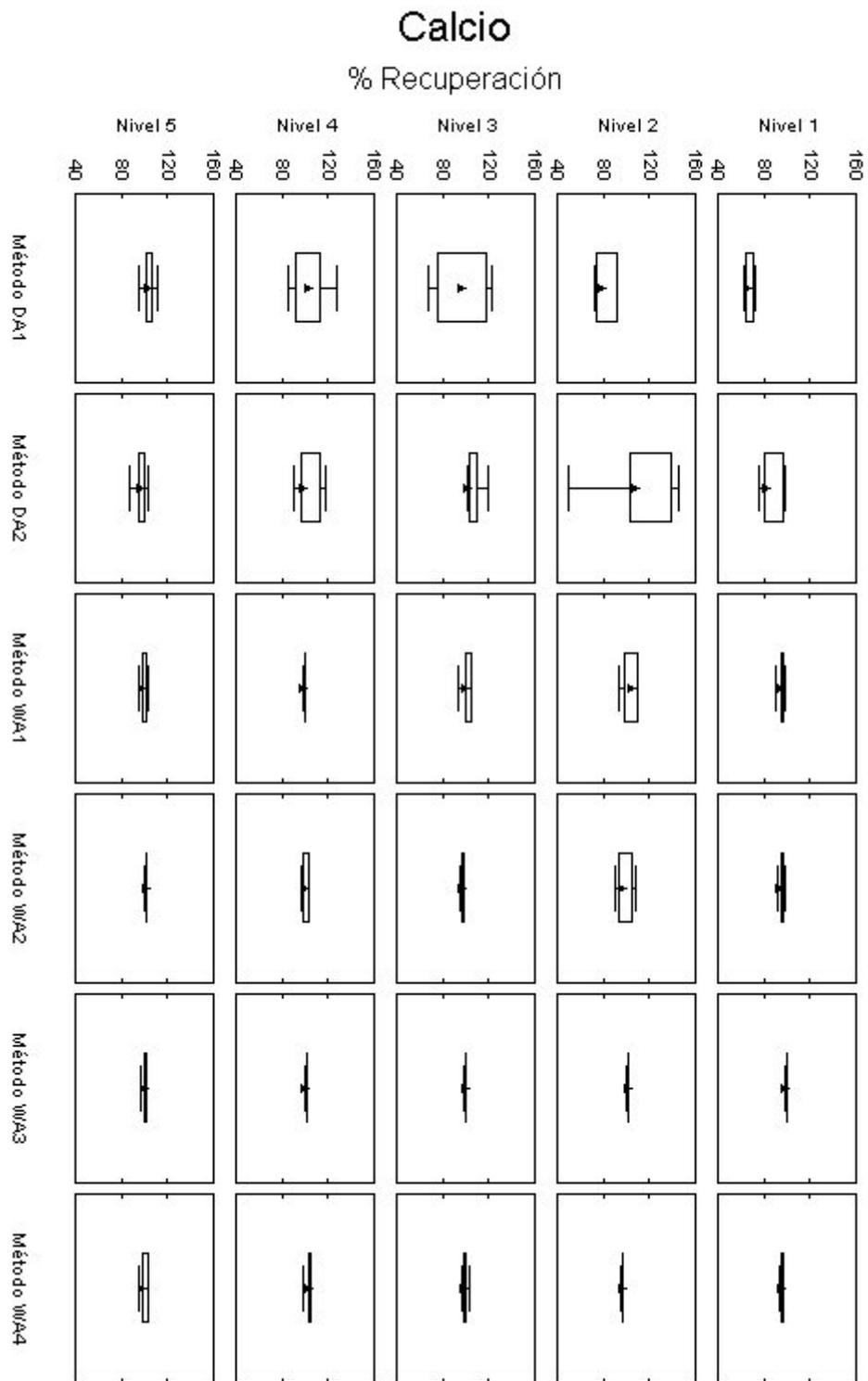


Figura IV.3. Recuperaciones de calcio por nivel y método de mineralización

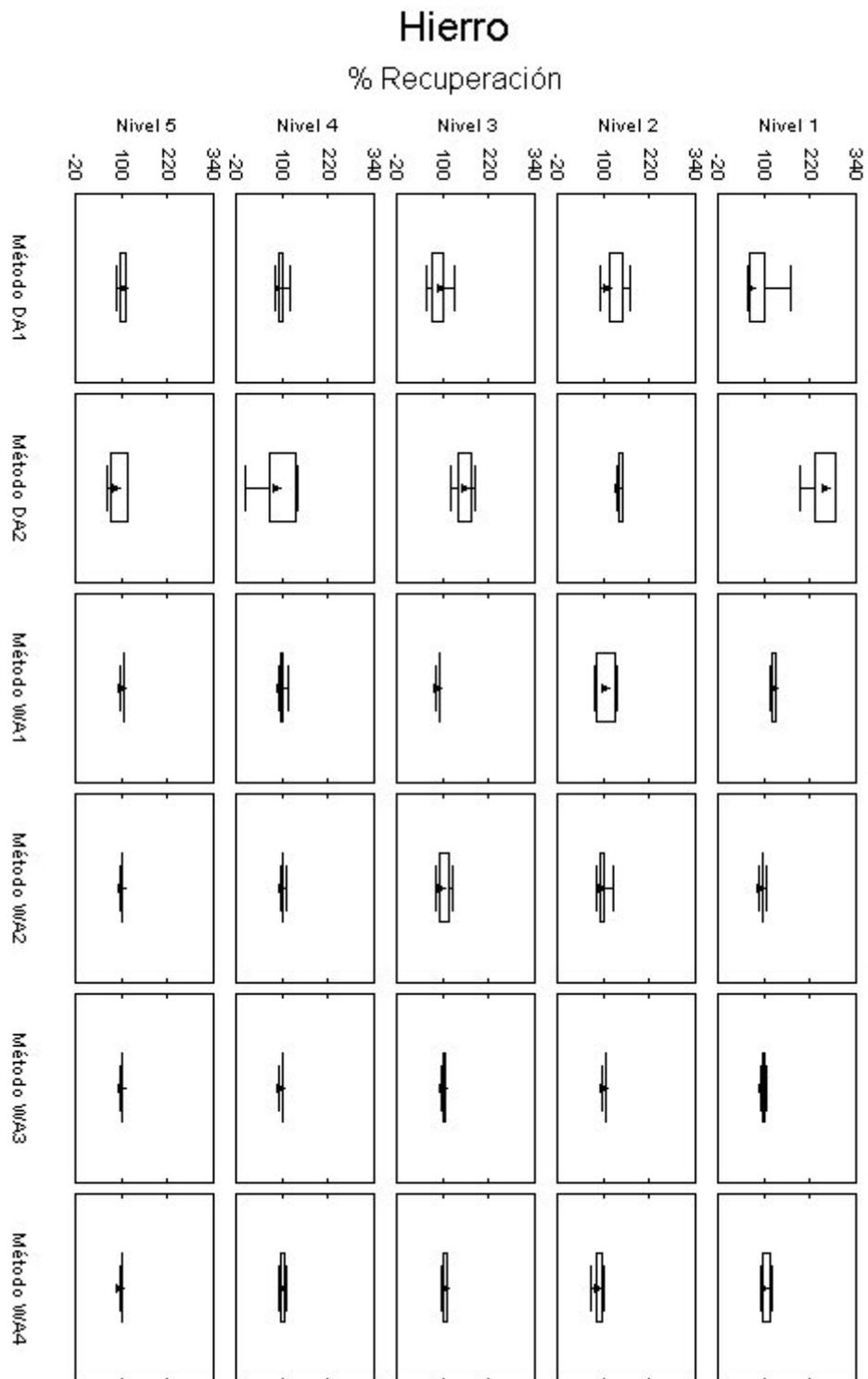


Figura IV.4. Recuperaciones de hierro por nivel y método de mineralización

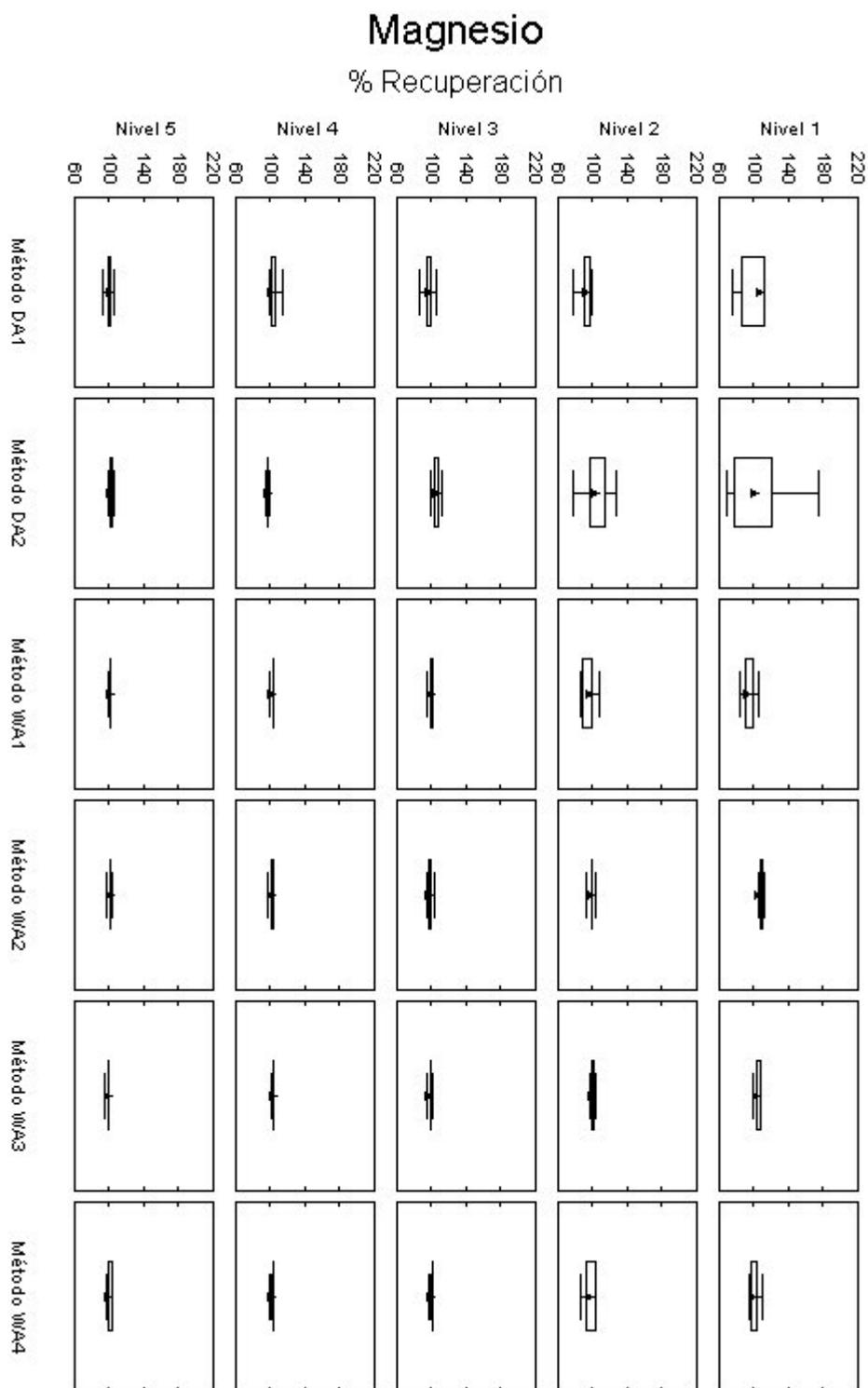


Figura IV.5. Recuperaciones de magnesio por nivel y método de mineralización

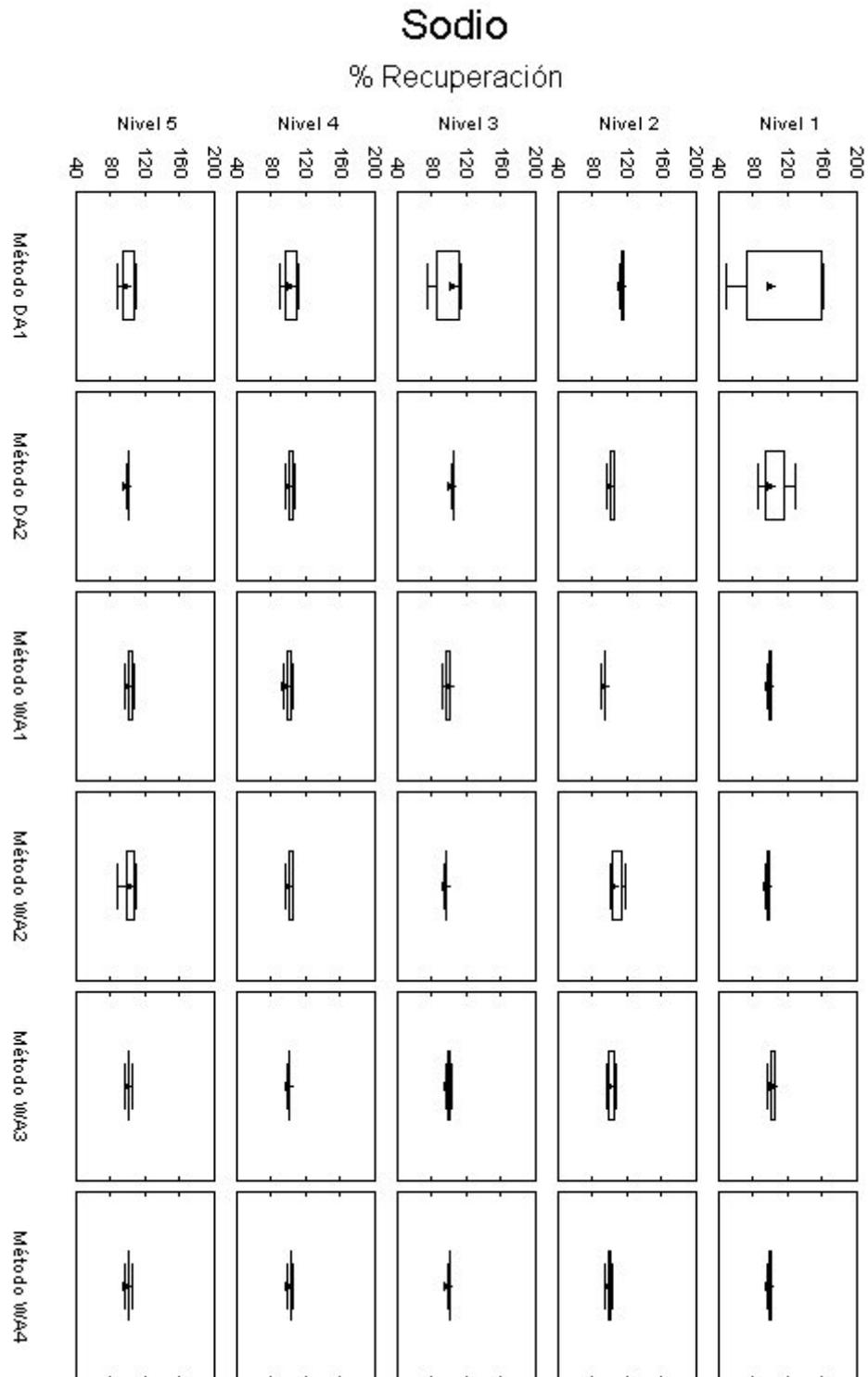


Figura IV.6. Recuperaciones de sodio por nivel y método de mineralización

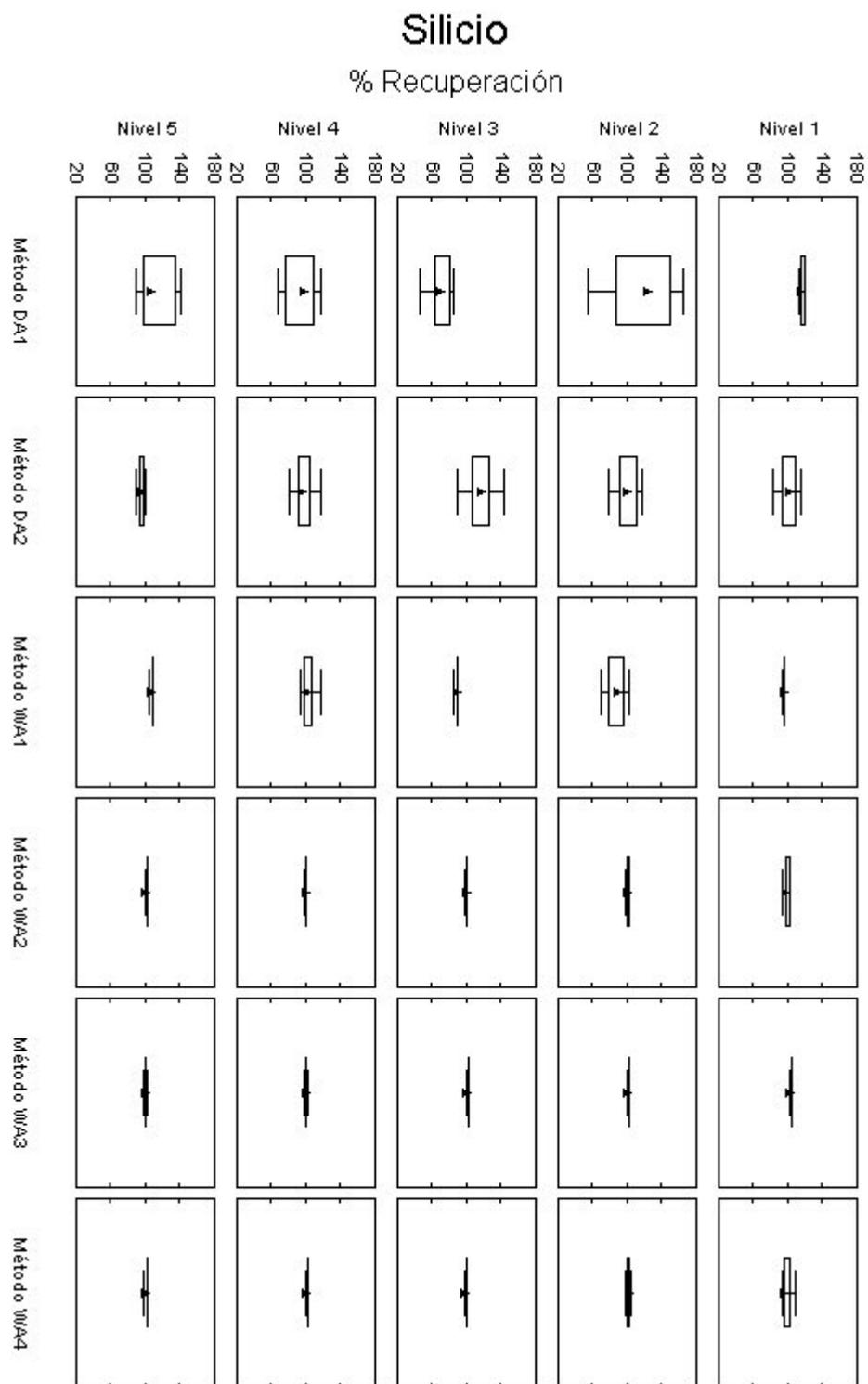


Figura IV.7. Recuperaciones de silicio por nivel y método de mineralización

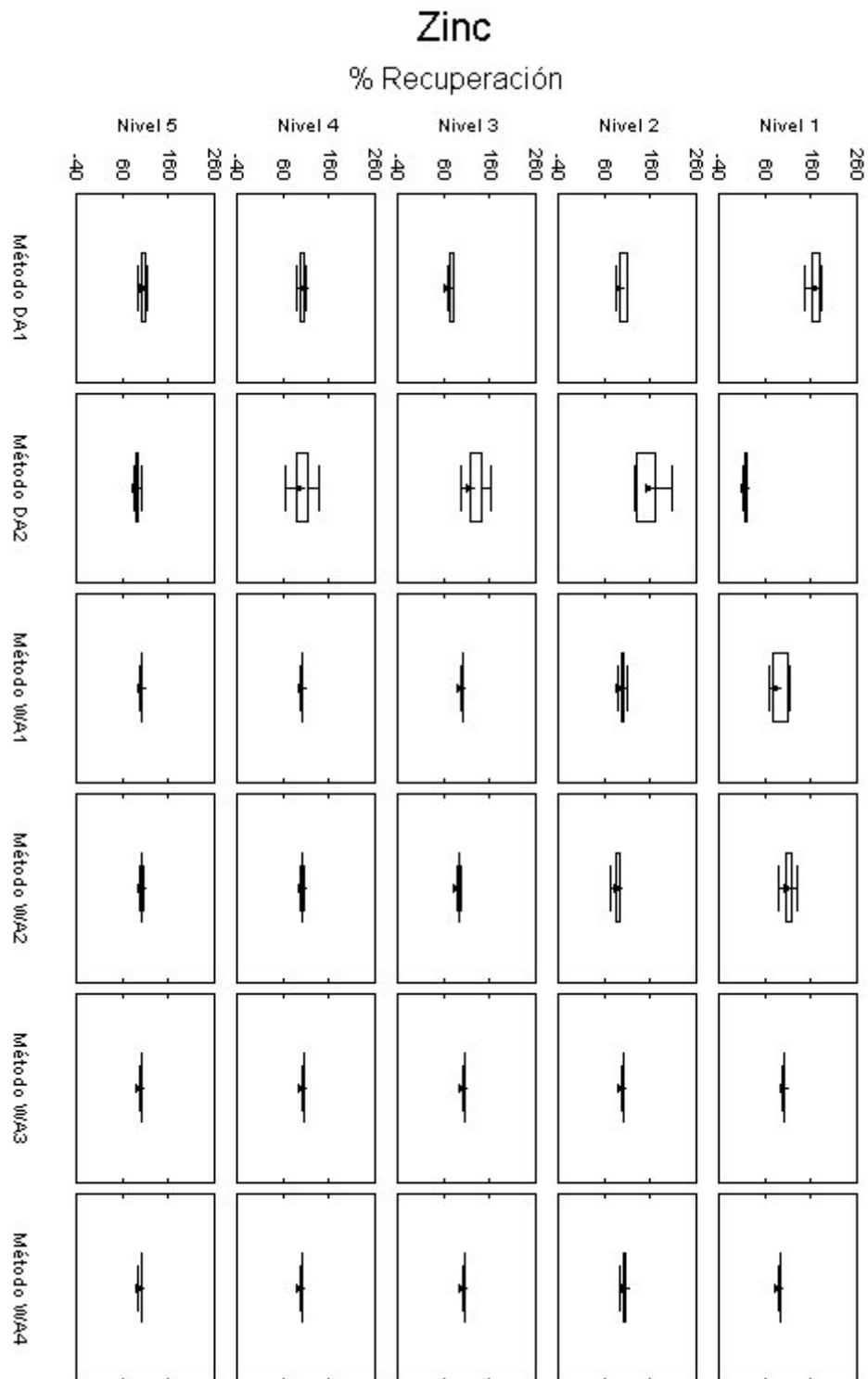


Figura IV.8. Recuperaciones de zinc por nivel y método de mineralización

Como el objetivo es comparar los métodos de mineralización, a partir de los cálculos de ANOVA, se compara la varianza entre métodos con la de error puro mediante una prueba F de dos colas, para detectar si alguno de ellos introduce un sesgo de los resultados.

A partir de las expresiones de la Tabla II.1. las varianzas entre métodos y de error puro son, respectivamente:

$$S_{metodo}^2 = \frac{rb \sum_{i=1}^a (\bar{R}_i - \bar{\bar{R}})^2}{a-1} \quad (4.2)$$

$$S_{rep}^2 = \frac{\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^r (R_{ijk} - \bar{R}_{ij})^2}{ab(r-1)} \quad (4.3)$$

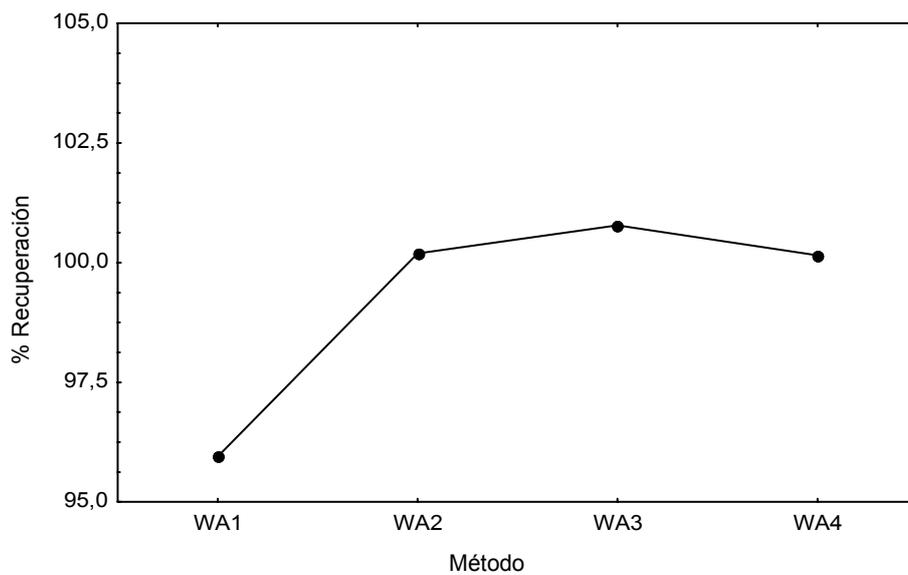
El valor de F experimental se calcula según la expresión:

$$F = \frac{S_{metodo}^2}{S_{rep}^2} \quad (4.4)$$

Si este valor es mayor que el tabulado $F(a-1, ab(r-1), 95\%)$, existe entonces un sesgo significativo introducido por los métodos. Esto implica que al menos una de las recuperaciones medias, \bar{R}_i , difiere del resto. En la Tabla IV.3 se tienen los resultados obtenidos en estas pruebas de significación. Como se puede observar, en el caso del análisis de boro, el estadístico indica la existencia de un sesgo significativo debido al método. Para detectar el método que produce este efecto se realiza la prueba de la genuina diferencia significativa (HSD) de Tukey [8], comparando las recuperaciones medias obtenidas por cada método. En este caso el test indica que el método WA1 introduce un sesgo significativo. El resto de los métodos, WA2, WA3 y WA4 se pueden considerar equivalentes, desde un punto de vista estadístico. Los valores medios de recuperación de cada método se presentan en las Figuras IV.9. a IV. 15.

Tabla IV.3. Resultados del estadístico F en el ANOVA.

| Elemento | S^2_{metodo} | S^2_{rep} | F_{exp} | F_{tab} |
|----------|-----------------------|--------------------|------------------|------------------|
| B | 149.2 | 33.4 | 4.466 | 3.250 |
| Ca | 17.8 | 12.1 | 1.473 | 3.250 |
| Fe | 173.2 | 97.3 | 1.811 | 3.250 |
| Mg | 44.4 | 18.3 | 2.428 | 3.250 |
| Na | 29.0 | 19.2 | 1.511 | 3.250 |
| Si | 6.4 | 5.2 | 1.226 | 3.828 |
| Zn | 45.1 | 56.7 | 0.795 | 3.250 |

**Figura IV.9.** Recuperaciones medias para boro.

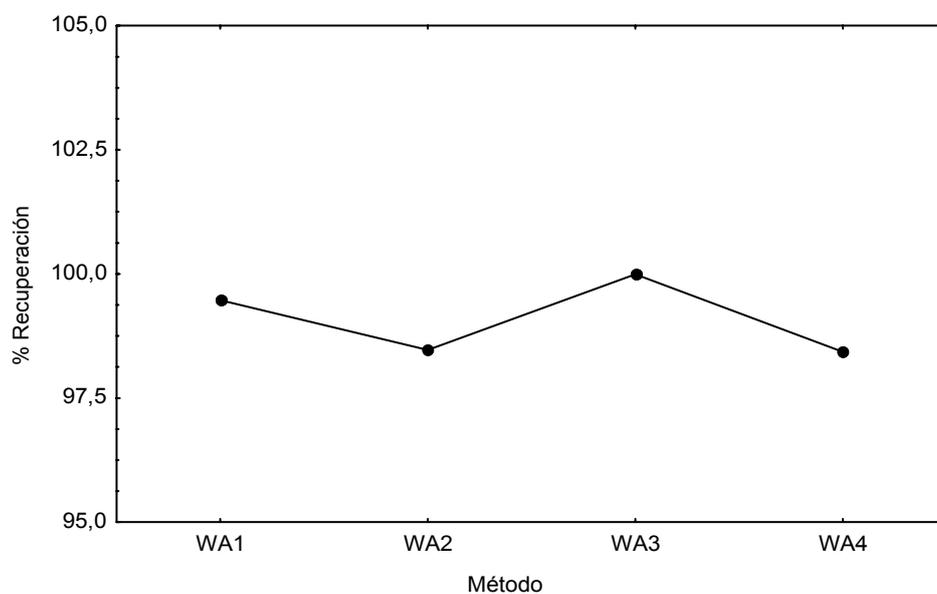


Figura IV.10. Recuperaciones medias para calcio.

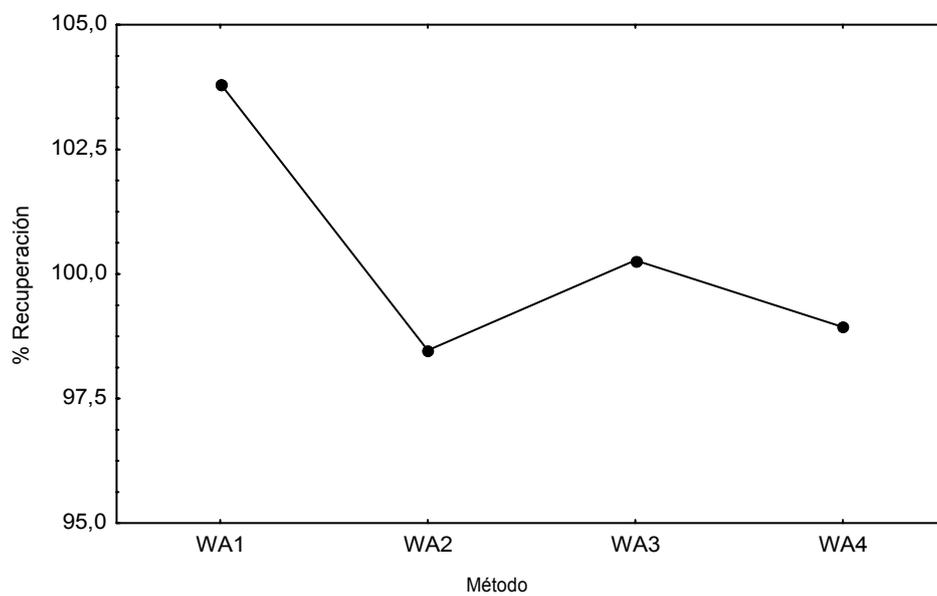


Figura IV.11. Recuperaciones medias para hierro.

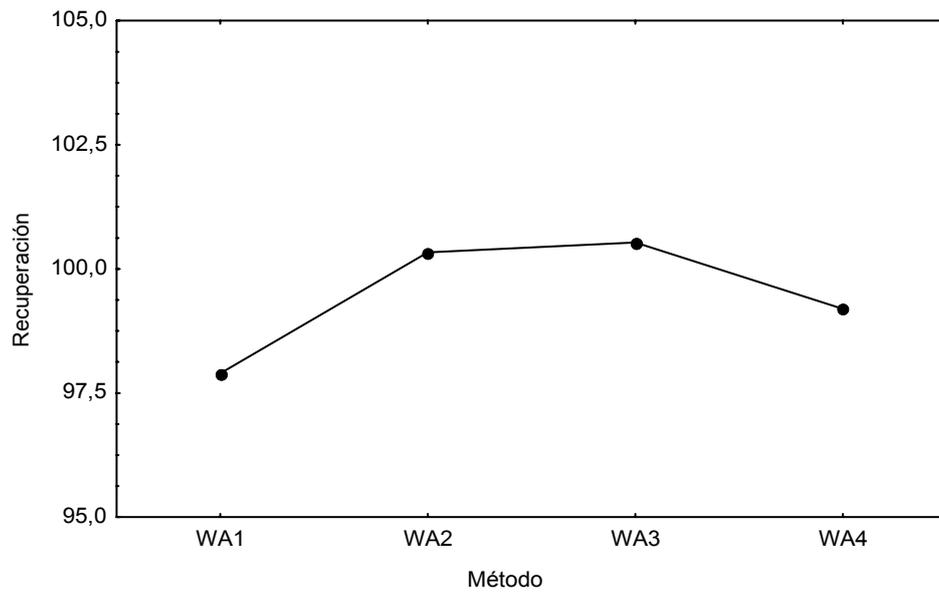


Figura IV.12. Recuperaciones medias para magnesio.

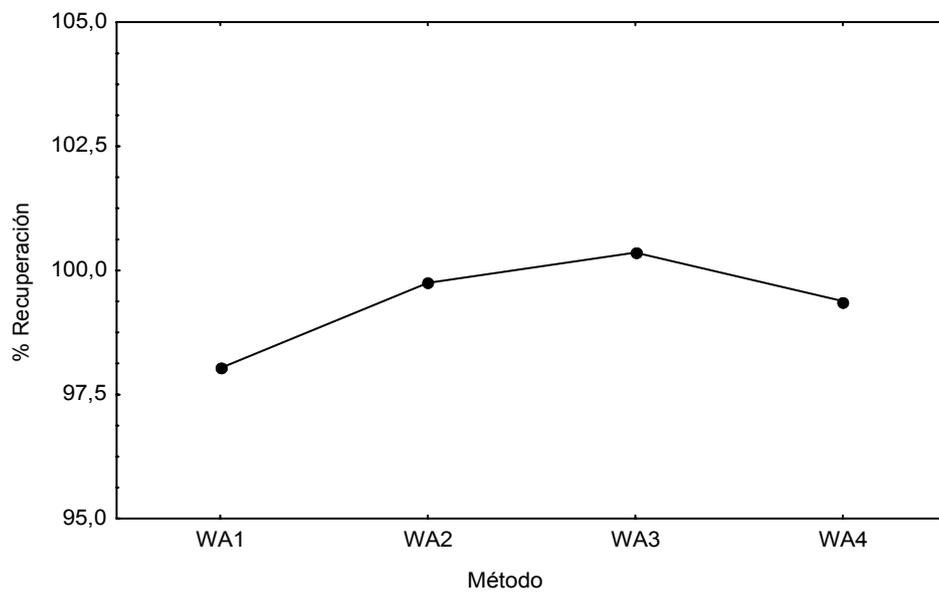


Figura IV.13. Recuperaciones medias para sodio.

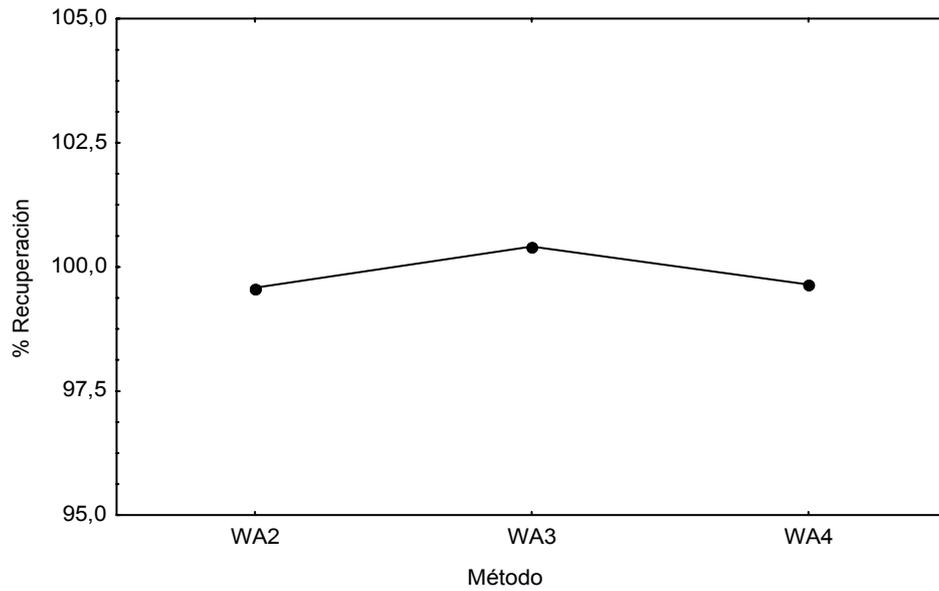


Figura IV.14. Recuperaciones medias para silicio.

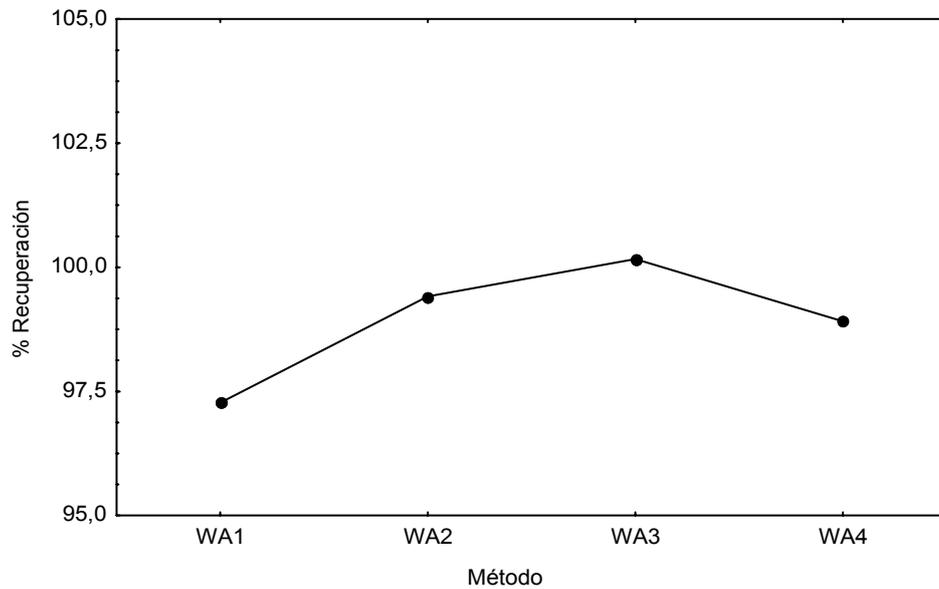


Figura IV.15. Recuperaciones medias para zinc.

Como se dijo anteriormente, los métodos WA2, WA3 y WA4 son equivalentes entre sí, es decir, llevan a valores similares. Solo falta comprobar si estos valores de recuperación son estadísticamente iguales a 100, es decir, que se recupera todo lo que se añade.

Para poder evaluar esto, es necesario conocer la incertidumbre asociada a cada método, $u(\bar{R}_i)$. En primer lugar, cada valor \bar{R}_{ij} tendrá asociada una incertidumbre $u(\bar{R}_{ij})$, que viene dada por la desviación estándar de las medidas repetidas en cada nivel ij . La incertidumbre correspondiente a los valores de \bar{R}_i se divide en dos términos. Uno es la incertidumbre combinada, $u_c(\bar{R}_i)$, que viene de propagar las incertidumbre de cada nivel ij a partir de la expresión de cálculo de \bar{R}_i (Ecuación 2.2). El otro es la desviación estándar de la media \bar{R}_i , que es una incertidumbre de repetición pura, $u_{rep}(\bar{R}_i)$. Las expresiones para calcular estos dos términos son las siguientes:

$$u_c^2(\bar{R}_i) = \frac{1}{b^2} \left[\sum_{j=1}^b u^2(\bar{R}_{ij}) \right] \quad (4.5)$$

$$u_{rep}^2(\bar{R}_i) = \frac{\sum_{j=1}^b (\bar{R}_{ij} - \bar{R}_i)^2}{b(b-1)} \quad (4.6)$$

La incertidumbre total para cada método se calcula según:

$$u(\bar{R}_i) = \sqrt{u_c^2(\bar{R}_i) + u_{rep}^2(\bar{R}_i)} \quad (4.7)$$

La incertidumbre de la media global de los tres métodos, $\bar{\bar{R}}$, también consiste en dos contribuciones, una de combinación y otra de repetición pura.

$$u_c^2(\bar{\bar{R}}) = \frac{1}{a^2} \left[\sum_{i=1}^a u^2(\bar{R}_i) \right] \quad (4.8)$$

$$u_{rep}^2(\bar{\bar{R}}) = \frac{\sum_{i=1}^a (\bar{R}_i - \bar{\bar{R}})^2}{a(a-1)} \quad (4.9)$$

Siendo el valor final:

$$u(\bar{R}) = \sqrt{u_c^2(\bar{R}) + u_{rep}^2(\bar{R})} \quad (4.10)$$

La incertidumbre (u) se convierte en incertidumbre expandida (U) multiplicando por un factor de cobertura k ($k = 2$ para el 95% de nivel de confianza) [9]. Los valores de recuperación media obtenida para los métodos WA2, WA3 y WA4 y la recuperación media global, junto con sus incertidumbres expandidas, para todos los elementos estudiados se pueden ver en la Tabla IV.4.

Tabla IV.4. Recuperación media de los métodos y recuperación global (con sus incertidumbres expandidas) para los elementos estudiados.

| Recuperación, % | B | Ca | Fe | Mg | Na | Si | Zn |
|--------------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| $\bar{R}_{WA2} \pm U(\bar{R}_{WA2})$ | 100 ± 4 | 99 ± 4 | 99 ± 10 | 100 ± 4 | 100 ± 6 | 100 ± 2 | 99 ± 10 |
| $\bar{R}_{WA3} \pm U(\bar{R}_{WA3})$ | 101 ± 3 | 100 ± 3 | 100 ± 3 | 101 ± 3 | 100 ± 3 | 100 ± 1 | 100 ± 1 |
| $\bar{R}_{WA4} \pm U(\bar{R}_{WA4})$ | 100 ± 5 | 98 ± 3 | 99 ± 9 | 99 ± 4 | 99 ± 3 | 100 ± 3 | 99 ± 4 |
| $\bar{R} \pm U(\bar{R})$ | 100 ± 3 | 99 ± 2 | 99 ± 5 | 100 ± 2 | 100 ± 2 | 100 ± 1 | 100 ± 4 |

Como se puede observar, tanto para los métodos como para la recuperación global, se cumple la desigualdad de la Ecuación 4.11. Esto implica que las recuperaciones obtenidas son estadísticamente iguales a 100 y, por lo tanto, los métodos se consideran exactos.

$$|R - 100| \leq U(R) \quad (4.11)$$

donde aquí R representa las recuperaciones medias de cada método o la recuperación media global, según corresponda.

Una vez comprobado que los tres procedimientos, WA2, WA3 y WA4, son equivalentes entre sí y que conducen a resultados exactos, podemos utilizar cualquiera de ellos para la mineralización de las muestras. No obstante, hay que remarcar que los valores de incertidumbre obtenidos para el método WA3 suelen ser menores que para WA2 y WA4.

Para llevar a cabo la comparación entre métodos de mineralización, además de utilizar criterios puramente estadísticos, se deben considerar otros factores, relacionados con la adecuación práctica del mismo [10].

Por un lado, teniendo en cuenta que la presencia de ácidos en la disolución final puede producir interferencias en la determinación, la evaporación de estos se hace necesaria. Este paso es mucho más fácil de realizar en los métodos WA2 y WA3, en los que se emplea ácido nítrico, que en el WA4, donde se emplea ácido sulfúrico, que necesita una mayor temperatura para su eliminación. Por otro lado, el uso de ácido perclórico, en el método WA2, puede producir explosiones, existiendo el riesgo de pérdida de la muestra. Esto último hace el procedimiento más tedioso por las precauciones que implica.

Por lo tanto, desde ambos puntos de vista, estadístico y práctico, parece ser más aconsejable el uso del método WA3 para la mineralización y análisis de muestras de anisados, siendo por ello el empleado en la determinación de los siete elementos en estudio.

IV.1.2. Efecto matriz

Una vez realizada la digestión de las muestras, se lleva a cabo la determinación del contenido en zinc, boro, hierro, magnesio, sodio, silicio y calcio mediante espectroscopía de emisión atómica de plasma acoplado inducido. Para ello, debe realizarse previamente una calibración con disoluciones patrón de cada uno de los elementos a determinar. En este punto, pueden plantearse dos posibilidades, realizar un calibrado externo con patrones e interpolar las señales de la muestra, para cada elemento, en la curva de calibrado y obtener así su concentración; o bien, determinar dicha concentración por el método de adición patrón. Este último evita errores debidos al efecto matriz y de interferencias presentes en la muestra, pero es mucho más laborioso y lento que el calibrado externo. Por ello, es conveniente comprobar si existen diferencias significativas entre los datos obtenidos mediante ambos procedimientos de calibración. De esta manera se comprueba si existe influencia de la matriz de la muestra.

A la hora de comparar dos rectas de calibrado, de acuerdo con lo descrito por Thompson [11], éstas pueden presentar cuatro disposiciones distintas:

- Una superposición de rectas indica que los calibrados son idénticos.
- Una recta desplazada paralelamente respecto a la otra da cuenta de la existencia de un error sistemático constante.
- Cuando existe diferencia entre las pendientes, pero con la misma ordenada en el origen, se considera la presencia de un error sistemático proporcional.
- Si ambas rectas se cortan en un punto distinto del origen, se debe a una combinación de ambos tipos de errores, constante y proporcional.

En nuestro caso, la existencia de una variación constante entre las ordenadas de ambos métodos queda implícita al usar el método de adición patrón. Por lo tanto, realizamos la comparación estadística de las pendientes, para ver si existen diferencias significativas entre éstas. En primer lugar realizamos el cociente entre ambas pendientes y calculamos la desviación estándar asociada al mismo:

$$R = \frac{b_{CE}}{b_{AP}} \quad (4.12)$$

$$S_R = R \sqrt{\left(\frac{s_{b_{CE}}^2}{b_{CE}^2} + \frac{s_{b_{AP}}^2}{b_{AP}^2} \right)} \quad (4.13)$$

donde b_{CE} y b_{AP} son las pendientes de las rectas de calibrado externo y adición patrón, respectivamente, $s_{b_{CE}}$ y $s_{b_{AP}}$ son sus desviaciones estándar correspondientes. Si ambas pendientes son prácticamente iguales, su cociente, R , no debe ser significativamente distinto de 1. Calculando la t de Student como:

$$t_{cal} = \frac{|R-1|}{S_R} \quad (4.14)$$

El valor calculado se compara con el obtenido en las tablas [12] para $n_{CE}+n_{AP}-4$ grados de libertad (ν) y un 95% de nivel de confianza. Siendo n_{CE} y n_{AP} el número de puntos utilizados en el cálculo de las rectas de calibrado externo y adición patrón,

respectivamente. Los resultados de esta comparación se presentan en la Tabla IV.5. En todos los casos el valor t_{cal} es menor que $t_{tab}(v, 95\%)$.

Tabla IV.5. Aplicación del test de Student para comparar las pendientes de las curvas de calibración externa y adición patrón.

| Elemento | b_{AP} | $s_{b_{AP}}$ | b_{CE} | $s_{b_{CE}}$ | t_{cal} | $t_{tab(95\%)}$ |
|----------|----------|--------------|----------|--------------|-----------|-----------------|
| Zn | 8.07 | 0.06 | 7.98 | 0.03 | 1.453 | 2.037 |
| B | 5.83 | 0.06 | 5.96 | 0.02 | 1.900 | 2.069 |
| Fe | 3.45 | 0.04 | 3.43 | 0.02 | 0.197 | 0.367 |
| Mg | 87.37 | 1.17 | 89.01 | 0.33 | 1.321 | 2.045 |
| Ca | 120.24 | 2.38 | 121.91 | 0.46 | 0.678 | 2.045 |
| Na | 3.83 | 0.05 | 3.94 | 0.02 | 2.002 | 2.045 |
| Si | 6.76 | 0.07 | 6.96 | 0.08 | 1.972 | 2.056 |

Para plasmar estos resultados de una forma más visual, se representan gráficamente las curvas de calibración externa junto a las de adición patrón para cada uno de los elementos determinados (Figuras IV.16. a IV.22.). En ellas, se aprecia que en todos los casos las rectas de calibrado externo y de adición patrón son paralelas.

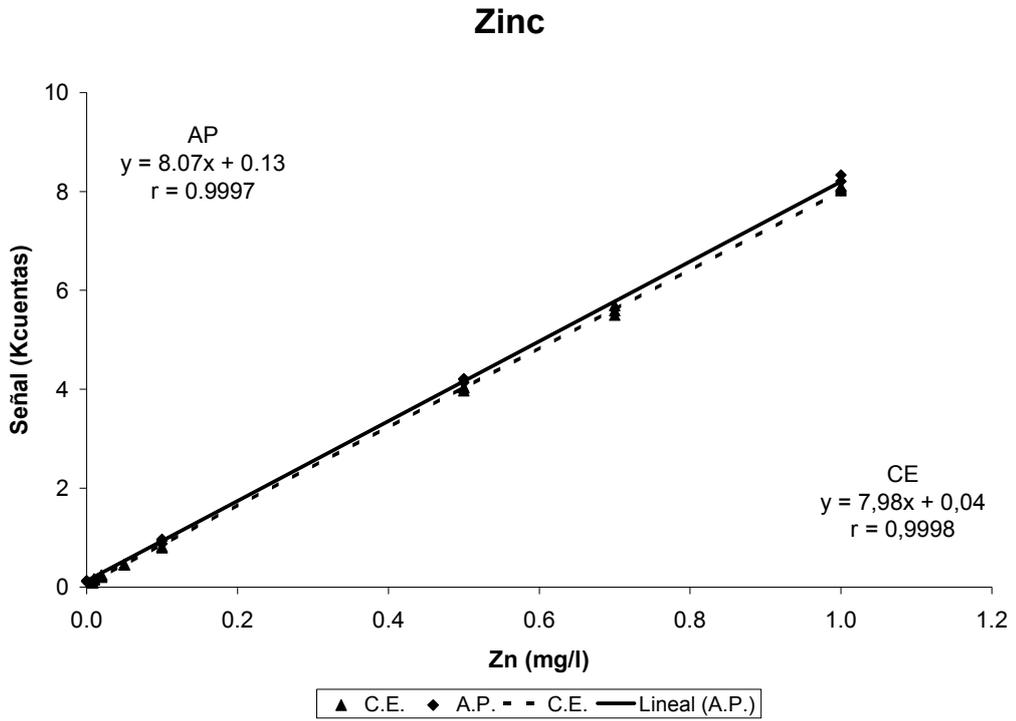


Figura IV.16. Rectas de calibrado externo y adición patrón para zinc.

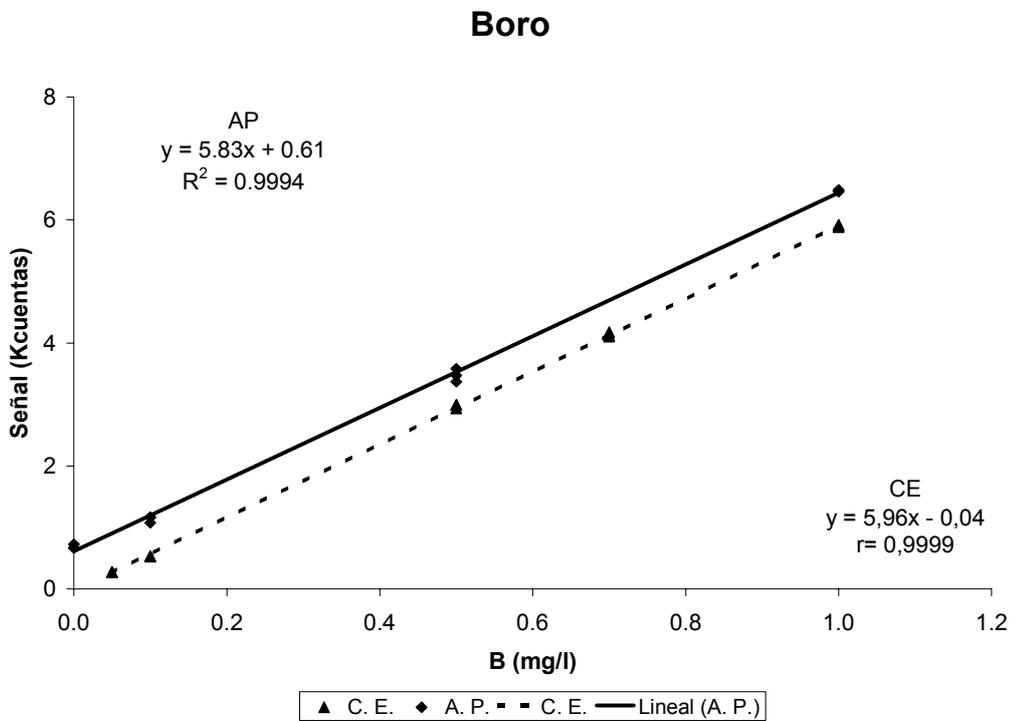


Figura IV.17. Rectas de calibrado externo y adición patrón para boro.

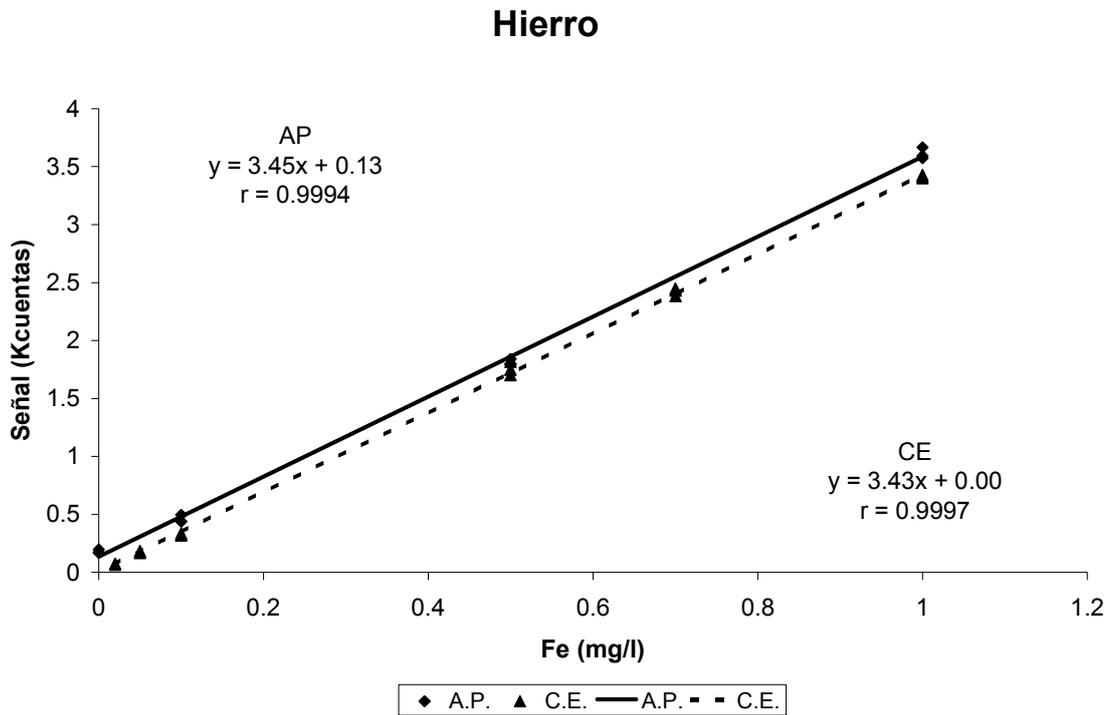


Figura IV.18. Rectas de calibrado externo y adición patrón para hierro.

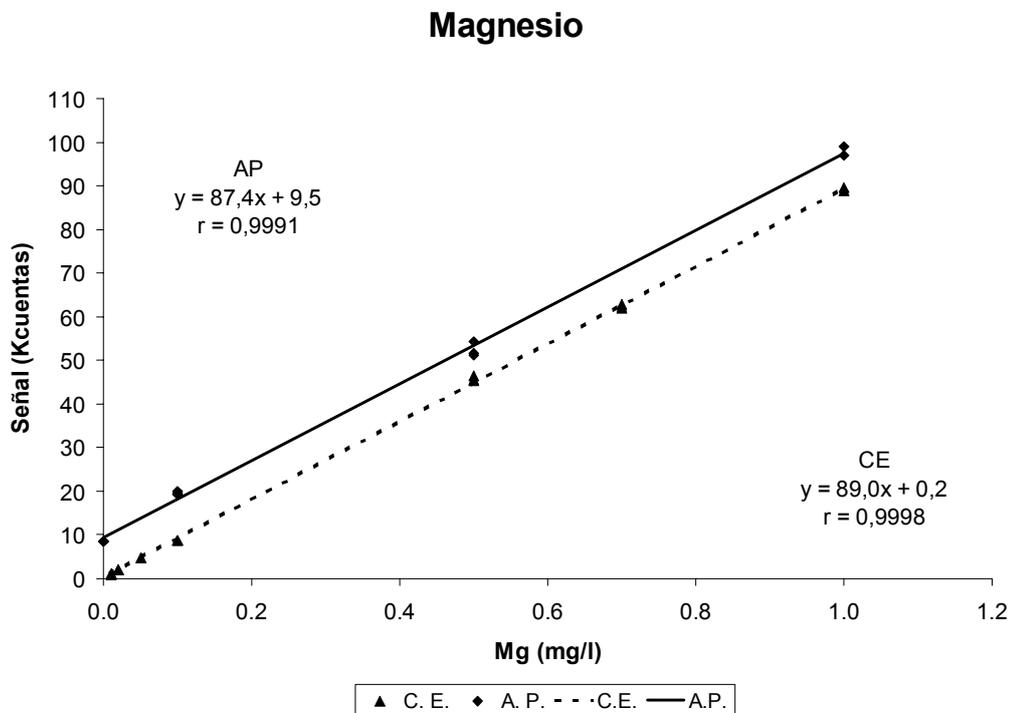


Figura IV.19. Rectas de calibrado externo y adición patrón para magnesio.

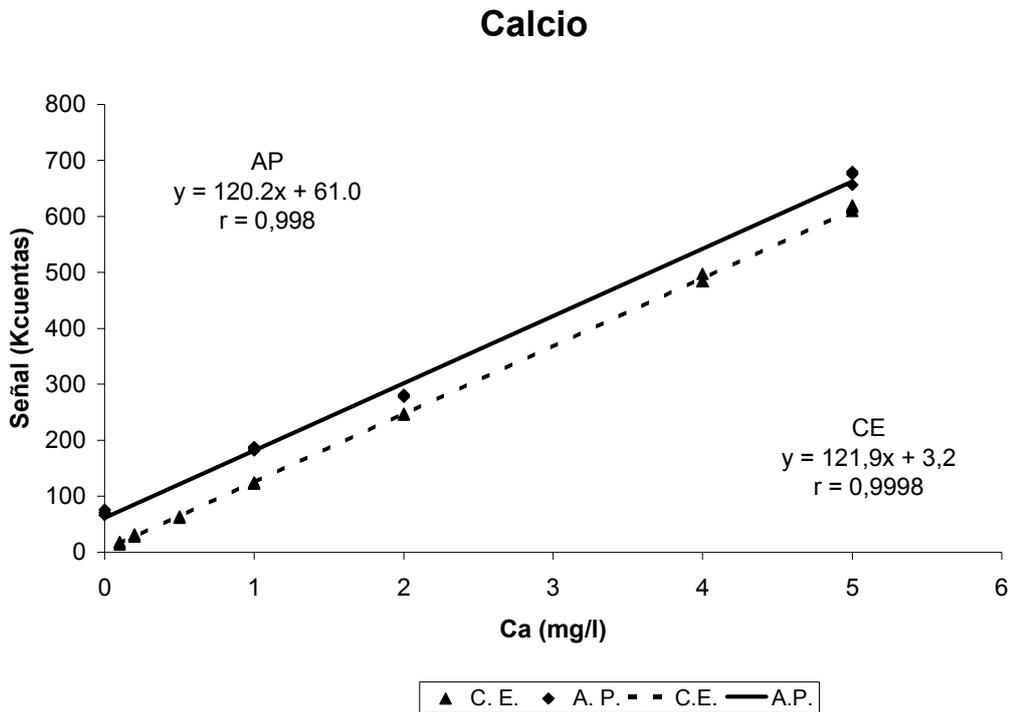


Figura IV.20. Rectas de calibrado externo y adición patrón para calcio.

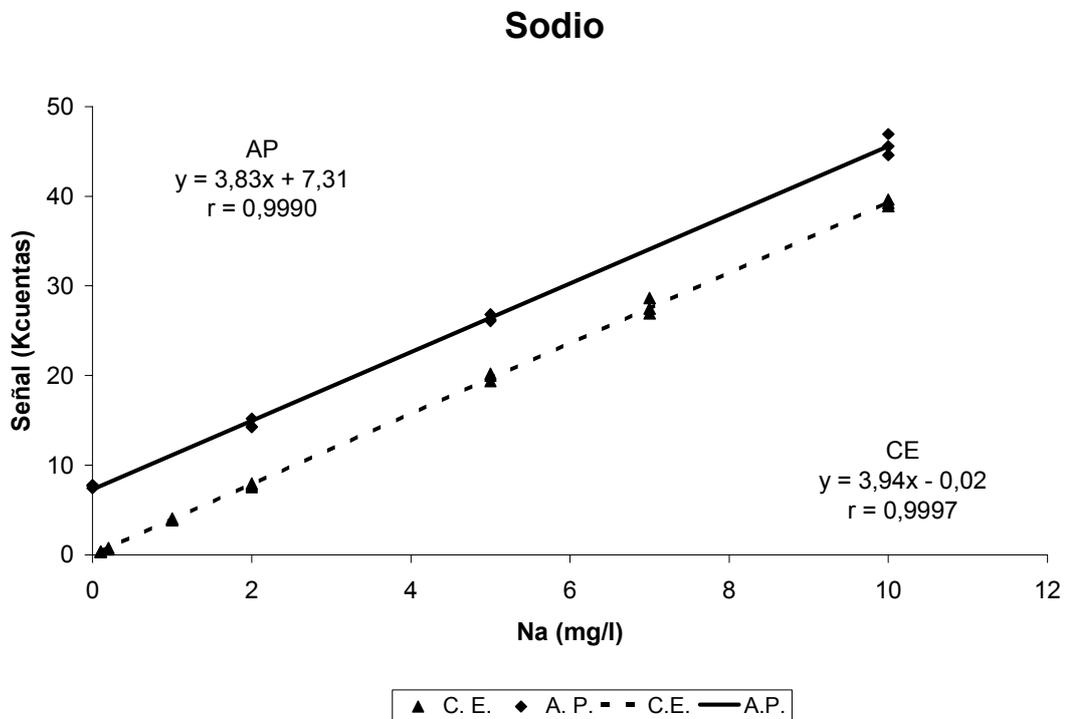


Figura IV.21. Rectas de calibrado externo y adición patrón para sodio.

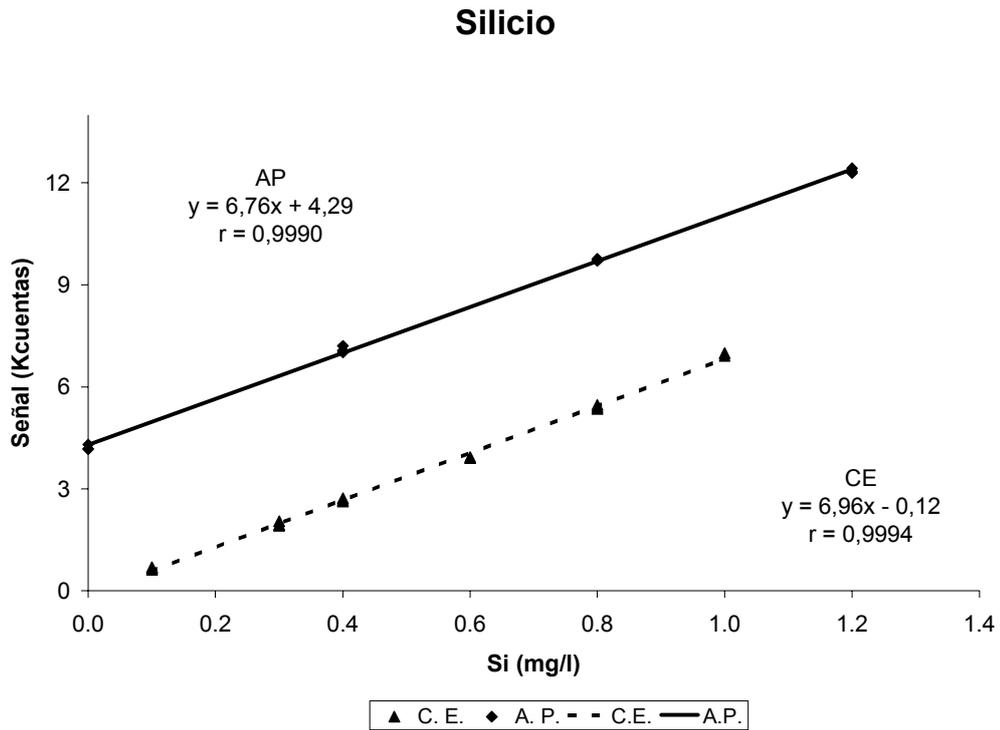


Figura IV.22. Rectas de calibrado externo y adición patrón para silicio.

IV.1.3. Parámetros de calidad del método

IV.1.3.1. Exactitud

La exactitud del método para la determinación de boro, calcio, hierro, magnesio, sodio, silicio y zinc se ha estudiado mediante ensayos de recuperación. Se analizaron muestras dopadas en cinco niveles de adición, realizando cinco réplicas en cada nivel. Los resultados obtenidos aparecen en la Tabla IV.4. Como se puede ver, los intervalos de los valores de recuperación obtenidos contienen el 100% en todos los elementos analizados, confirmándose que el método es exacto.

IV.1.3.2. Precisión

La precisión del método se estudió observando la repetitividad del mismo, así como su reproducibilidad. Para el cálculo de la repetitividad, se analizó una misma muestra diez veces, obteniendo su desviación estándar relativa. Para la reproducibilidad se hizo un seguimiento de una muestra de control durante cinco días, lo suficientemente separados en el tiempo como para trabajar en condiciones de precisión intermedia. Los

análisis también se realizaron por decuplicado. Los resultados obtenidos para cada elemento analizado se muestran en la tabla IV.6. Se puede observar que todos los valores se encuentran por debajo del 5%.

Tabla IV.6. Repetitividad y reproducibilidad, dados como desviación estándar relativa, para la determinación de B, Ca, Fe, Mg, Na, Si y Zn en anisados mediante ICP-AES.

| Elemento | B | Ca | Fe | Mg | Na | Si | Zn |
|------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Repetitividad | 1,8 | 1,3 | 3,9 | 2,3 | 1,8 | 0,6 | 0,8 |
| Reproducibilidad | 3,8 | 2,7 | 4,4 | 3,5 | 3,3 | 1,7 | 1,5 |

IV.1.3.3. Calibración, linealidad y límites de detección y cuantificación

Tal y como se concluye en el apartado anterior, para la cuantificación de los elementos en las muestras se realizaron los correspondientes calibrados externos. Las muestras que presentaron valores superiores a los rangos establecidos se cuantificaron realizando una dilución previa de las mismas.

Los parámetros de las rectas de calibración, obtenidos según el método de mínimos cuadrados, se presentan en la Tabla IV.7.

Tabla IV.7. Parámetros de calibración para la determinación de zinc, boro, hierro, magnesio, sodio, calcio y silicio por ICP-AES.

| Elemento | Rango de concentración (mg/l) | B | s_b | a | s_a | $s_{y/x}$ | r |
|----------|-------------------------------|-------|-------|--------|-------|-----------|--------|
| Zn | 0.008-0.5 | 7.92 | 0.04 | 0.05 | 0.01 | 0.03 | 0.9998 |
| B | 0.02-0.5 | 6.06 | 0.04 | -0.08 | 0.01 | 0.03 | 0.9997 |
| Fe | 0.01-0.5 | 3.51 | 0.02 | -0.008 | 0.004 | 0.01 | 0.9998 |
| Mg | 0.01-1 | 89.0 | 0.3 | 0.2 | 0.2 | 0.6 | 0.9999 |
| Ca | 0.1-5 | 121.9 | 0.5 | 3 | 1 | 4 | 0.9999 |
| Na | 0.1-10 | 3.94 | 0.02 | 0.0 | 0.1 | 0.4 | 0.9997 |
| Si | 0.1-1 | 6.96 | 0.08 | -0.12 | 0.05 | 0.1 | 0.9990 |

b : pendiente de la recta de calibrado. s_b : desviación estándar de la pendiente. a : ordenada en el origen de la recta de calibrado. s_a : desviación estándar de la ordenada en el origen. $s_{y/x}$: error típico de la recta de calibrado. r : coeficiente de correlación.

Otros parámetros de calidad son la linealidad y los límites de cuantificación (LOQ) y detección (LOD). La linealidad se establece a partir de la pendiente de la recta de calibrado y su desviación estándar, e indica la dispersión de los datos alrededor de dicha recta de calibrado [13]. La expresión para el cálculo de este parámetro es la siguiente:

$$\text{Linealidad}(\%) = (1 - S_b / b) \cdot 100 \quad (4.15),$$

donde b es la pendiente de la recta de calibrado y s_b la desviación estándar de la misma. En la Tabla IV.8 se presentan los valores de linealidad encontrados para los elementos a determinar.

El límite de detección (LOD) y el de cuantificación (LOQ) se calculan a partir de los datos obtenidos al medir diez blancos de la recta de calibrado [14], como la concentración correspondiente a una señal tres y diez veces, respectivamente, la desviación estándar asociada a la señal del blanco. Las expresiones matemáticas para el cálculo de ambos límites son las siguientes:

$$LOD = \frac{3 \cdot s_{bl}}{b} \quad (4.16)$$

$$LOQ = \frac{10 \cdot s_{bl}}{b} \quad (4.17)$$

Siendo b la pendiente de la recta de calibrado y s_{bl} la desviación estándar de las medidas del blanco. Los valores de LOD y LOQ así calculados se presentan en la Tabla IV.8.

Tabla IV.8. Linealidad, límite de detección (LOD) y cuantificación (LOQ).

| Elemento | Linealidad (%) | LOD (mg/l) | LOQ (mg/l) |
|----------|----------------|------------|------------|
| Zn | 99.5 | 0.006 | 0.020 |
| B | 99.4 | 0.019 | 0.063 |
| Fe | 99.4 | 0.006 | 0.021 |
| Mg | 99.6 | 0.005 | 0.017 |
| Na | 99.6 | 0.115 | 0.383 |
| Ca | 99.4 | 0.021 | 0.070 |
| Si | 98.9 | 0.009 | 0.029 |

Como puede observarse, todos los elementos presentan valores de linealidad cercanos al 100%. Sodio y magnesio son los elementos que presentan mayor linealidad. Salvo en el caso del silicio, todas superan el 99%.

El magnesio presenta un límite de cuantificación de 0.017 mg/l. El mayor límite de cuantificación encontrado es el del sodio, que es 0.383 mg/l. El resto de los elementos presentan límites de cuantificación que oscilan, desde 0.020 mg/l, como es el caso del zinc, hasta 0.070 mg/l para el calcio.

En cuanto a los límites de detección, están comprendidos entre 0.005 y 0.115 mg/l, para los elementos magnesio y sodio, respectivamente. Salvo el caso del sodio, que presenta un valor superior a 0.100 mg/l, todos los demás elementos determinados presentan valores de LOD que son, aproximadamente, cinco veces inferiores al del sodio.

IV.1.4. Determinación de Zn, B, Fe, Mg, Ca, Na y Si en anisados

Se han determinado los contenidos en zinc, boro, hierro, magnesio, calcio, sodio y silicio siguiendo el procedimiento descrito, en muestras de anises secos españoles de distinta procedencia. Los resultados obtenidos en dicha determinación se presentan en la Tabla IV.9.

Tabla IV.9. Concentración (mg/l) de Zn, B, Fe, Mg, Ca, Na y Si, en muestras de anís.

| Muestra | Zn | B | Fe | Mg | Ca | Na | Si |
|---------|-----------|------------|------------|----------|---------|---------|---------|
| 1C | 0,024(4) | 0,112(5) | 0,048(6) | 0,411(8) | 1,52(3) | 34,4(3) | 2,27(8) |
| 2C | 0,043(3) | 0,107(5) | 0,048(6) | 0,418(8) | 1,75(3) | 35,2(3) | 2,34(8) |
| 3C | 0,058(4) | 0,084(5) | 0,045(6) | 0,413(8) | 1,66(3) | 35,4(3) | 2,36(8) |
| 4C | 0,019(4) | 0,040 (5) | 0,032(6) | 0,492(8) | 1,39(3) | 35,9(3) | 2,38(8) |
| 5C | 0,003(4)* | 0,050 (5) | 0,026(6) | 0,480(8) | 1,31(3) | 34,6(3) | 2,40(8) |
| 6C | 0,013(4) | 0,024 (5) | 0,046(6) | 0,328(8) | 0,97(3) | 27,9(2) | 1,57(8) |
| 7C | 0,010(4) | 0,023 (5) | 0,012(6) | 0,275(8) | 0,82(3) | 23,4(2) | 1,22(9) |
| 8C | 0,008 (4) | 0,031 (5) | 0,045(6) | 0,487(8) | 1,25(3) | 33,2(2) | 2,08(8) |
| 9C | 0,026(4) | 0,092(5) | 0,027(6) | 0,183(8) | 1,04(3) | 64,5(5) | 3,35(8) |
| 10C | 0,018 (4) | 0,095(5) | 0,026(6) | 0,177(8) | 0,99(3) | 60,9(4) | 2,44(8) |
| 11C | 0,024(4) | 0,092(5) | 0,053(6) | 0,188(8) | 1,00(3) | 61,1(4) | 3,35(8) |
| 12C | 0,009 (4) | 0,009 (5)* | 0,007 (6) | 0,119(8) | 0,56(2) | 33,2(2) | 1,51(8) |
| 13C | 0,007 (4) | 0,012 (5)* | 0,010 (6) | 0,147(8) | 0,64(2) | 47,7(3) | 2,02(8) |
| 14C | 0,024(4) | 0,031 (5) | 0,087(6) | 0,262(8) | 1,08(3) | 61,7(4) | 3,17(8) |
| 15C | 0,027(4) | 0,074(5) | 0,034(6) | 0,210(8) | 1,14(3) | 61,3(4) | 3,35(8) |
| 16C | 0,007 (4) | 0,021 (5) | 0,007 (6) | 0,501(8) | 0,57(2) | 35,4(3) | 2,28(8) |
| 17C | 0,008 (4) | 0,024 (5) | 0,009 (6) | 0,550(8) | 0,61(2) | 36,0(3) | 2,42(8) |
| 18C | 0,011 (4) | 0,025 (5) | 0,004 (6)* | 0,551(8) | 0,74(2) | 35,1(3) | 2,45(8) |
| 19C | 0,021 (5) | 0,015 (5)* | 0,011 (6) | 0,494(8) | 0,64(2) | 27,9(2) | 1,71(8) |
| 20C | 0,022(4) | 0,023 (5) | 0,018(6) | 0,658(8) | 0,72(2) | 32,1(2) | 2,25(8) |
| 21C | 0,006 (4) | 0,030 (5) | 0,023(6) | 0,670(8) | 0,64(2) | 32,3(2) | 2,40(8) |
| 22C | 0,020 (4) | 0,022 (5) | 0,017(6) | 0,637(8) | 0,71(2) | 31,5(2) | 2,31(8) |
| 23R | 0,058(4) | 0,027 (5) | 0,035(6) | 2,18(8) | 2,78(3) | 16,5(2) | 0,18(2) |
| 24R | 0,044(3) | 0,024 (5) | 0,028(6) | 2,25(8) | 2,79(3) | 17,8(2) | 0,19(2) |

Tabla IV.9. Continuación.

| Muestra | Zn | B | Fe | Mg | Ca | Na | Si |
|---------|-----------|------------|------------|----------|----------|---------|---------|
| 25R | 0,057(3) | 0,024 (5) | 0,032(6) | 2,45(8) | 2,98(3) | 18,5(2) | 0,19(2) |
| 26R | 0,103(4) | 0,024 (5) | 0,039(6) | 2,16(8) | 2,96(3) | 16,4(2) | 0,17(2) |
| 27R | 0,042(5) | 0,024 (5) | 0,026(4) | 2,25(8) | 3,03(3) | 17,2(2) | 0,21(2) |
| 28R | 0,041(3) | 0,015 (5)* | 0,017(6) | 2,18(8) | 2,63(3) | 16,0(2) | 0,19(2) |
| 29Ch | 0,023(4) | 0,033 (5) | 0,035(6) | 0,029(2) | 0,52(2) | 1,7(1) | 0,33(2) |
| 30Ch | 0,019 (4) | 0,032 (5) | 0,054(6) | 0,026(2) | 0,50(2) | 1,6(1) | 0,33(2) |
| 31Ch | 0,027(4) | 0,034 (5) | 0,115(6) | 0,045(2) | 0,74(2) | 1,8(1) | 0,34(2) |
| 32Ch | 0,020 (4) | 0,018 (5)* | 0,025(6) | 0,022(2) | 0,37(2) | 1,5(1) | 0,23(2) |
| 33Ch | 0,022(4) | 0,012 (5)* | 0,043(6) | 0,012(2) | 0,30(2) | 1,3(1) | 0,18(2) |
| 34Ch | 0,135(4) | 0,022 (5) | 0,037(6) | 0,026(2) | 0,86(3) | 1,7(1) | 0,27(2) |
| 35Ch | 0,030(4) | 0,031 (5) | 0,113(6) | 0,045(2) | 0,75(2) | 1,7(1) | 0,33(2) |
| 36Ch | 0,032(4) | 0,028 (5) | 0,052(6) | 0,026(2) | 0,50(2) | 1,6(1) | 0,33(2) |
| 37Cs | 0,026(4) | 0,017 (5)* | 0,178(6) | 3,13(8) | 9,52(5) | 11,7(1) | 2,43(8) |
| 38Cs | 0,023(4) | 0,016 (5)* | 0,111(6) | 3,24(8) | 9,28(5) | 12,0(1) | 2,87(8) |
| 39Cs | 0,021 (4) | 0,029 (5) | 0,116(6) | 4,82(8) | 13,93(5) | 14,1(1) | 3,20(8) |
| 40Cs | 0,020 (4) | 0,016 (5)* | 0,019(6) | 2,36(8) | 7,35(4) | 9,9(1) | 2,23(8) |
| 41Cs | 0,009 (4) | 0,016 (5)* | 0,030(6) | 3,58(8) | 8,95(5) | 13,2(1) | 2,52(8) |
| 42Cs | 0,022(4) | 0,016 (5)* | 0,029(6) | 3,88(8) | 8,64(4) | 13,0(1) | 3,25(8) |
| 43E | 0,043(3) | 0,059 (5) | 0,048(6) | 0,137(8) | 1,85(3) | 3,6(1) | 0,27(2) |
| 44E | 0,042(3) | 0,058 (5) | 0,030(6) | 0,131(8) | 2,04(3) | 3,3(1) | 0,23(2) |
| 45E | 0,037(4) | 0,051 (5) | 0,050(6) | 0,144(8) | 1,96(3) | 3,5(1) | 0,23(2) |
| 46E | 0,019 (4) | 0,028 (5) | 0,005 (6) | 0,107(8) | 1,29(3) | 3,0(1) | 0,16(2) |
| 47E | 0,024(4) | 0,017 (5)* | 0,036(6) | 0,119(8) | 1,36(3) | 3,0(1) | 0,17(2) |
| 48E | 0,027(4) | 0,021 (5) | 0,053(6) | 0,123(8) | 1,45(3) | 3,1(1) | 0,16(2) |
| 49Ca | 0,011 (4) | 0,048 (5) | 0,006 (6) | 2,48(8) | 6,15(4) | 29,8(2) | 2,09(8) |
| 50Ca | 0,005(4)* | 0,053 (5) | 0,004 (6)* | 2,78(8) | 6,50(4) | 30,9(2) | 2,37(8) |
| 51Ca | 0,021(4) | 0,055 (5) | 0,005 (6)* | 2,67(8) | 6,51(4) | 30,9(2) | 2,55(8) |
| 52Ca | 0,012 (4) | 0,049 (5) | 0,188(6) | 3,24(8) | 7,22(4) | 31,6(2) | 2,54(8) |

Tabla IV.9. Continuación.

| Muestra | Zn | B | Fe | Mg | Ca | Na | Si |
|---------|------------|------------|------------|----------|---------|---------|---------|
| 53Ca | 0,009 (4) | 0,045 (5) | 0,057(6) | 3,23(8) | 7,26(4) | 33,2(2) | 2,59(8) |
| 54Ca | 0,006 (4) | 0,046 (5) | 0,222(6) | 3,29(8) | 7,41(4) | 32,7(2) | 2,61(8) |
| 55U | 0,036(4) | 0,031 (5) | 0,022(6) | 0,147(8) | 0,72(2) | 47,8(3) | 2,59(8) |
| 56U | 0,014 (4) | 0,020 (5) | 0,008 (6) | 0,115(8) | 0,46(2) | 44,2(3) | 2,07(8) |
| 57U | 0,023(4) | 0,023 (5) | 0,007 (6) | 0,116(8) | 0,43(2) | 43,8(3) | 2,07(8) |
| 58U | 0,025(4) | 0,020 (5) | 0,067(6) | 0,155(8) | 0,77(2) | 46,8(3) | 2,53(8) |
| 59U | 0,011 (4) | 0,026 (5) | 0,017(6) | 0,162(8) | 0,77(2) | 47,2(3) | 2,64(8) |
| 60U | 0,012 (4) | 0,023 (5) | 0,044(6) | 0,157(8) | 0,75(2) | 46,2(3) | 2,66(8) |
| 61U | 0,015 (4) | 0,019 (5) | 0,025(6) | 0,155(8) | 0,80(2) | 47,2(3) | 2,60(8) |
| 62DM | 0,036(4) | 0,055 (5) | 0,043(6) | 5,09(8) | 5,68(4) | 13,3(1) | 2,21(8) |
| 63DM | 0,036(4) | 0,065(5) | 0,038(6) | 4,77(8) | 5,38(4) | 13,1(1) | 2,22(8) |
| 64DM | 0,038(4) | 0,052 (5) | 0,045(6) | 4,87(8) | 5,30(4) | 13,9(1) | 2,20(8) |
| 65DM | 0,016 (4) | 0,029 (5) | 0,009 (6) | 4,65(8) | 5,05(4) | 9,8(1) | 1,89(8) |
| 66DM | 0,070(4) | 0,047 (5) | 0,010 (6) | 6,57(8) | 6,03(4) | 12,3(1) | 2,55(8) |
| 67DM | 0,012 (4) | 0,032 (5) | 0,004 (6)* | 4,61(8) | 5,03(4) | 10,1(1) | 1,88(8) |
| 68V | 0,001 (4)* | 0,015 (5)* | 0,071(6) | 0,024(2) | 1,37(3) | 8,8(1) | 2,55(8) |
| 69V | 0,024(4) | 0,017 (5)* | 0,057(6) | 0,030(2) | 1,58(3) | 8,8(1) | 2,71(8) |
| 70V | 0,013 (4) | 0,014 (5)* | 0,063(6) | 0,024(2) | 1,37(3) | 8,8(1) | 2,52(8) |
| 71V | 0,028(4) | 0,013 (5)* | 0,062(6) | 0,039(2) | 1,35(3) | 8,0(1) | 2,25(8) |
| 72V | 0,030(4) | 0,019 (5) | 0,063(6) | 0,045(2) | 1,90(3) | 9,2(1) | 2,70(8) |
| 73V | 0,030(4) | 0,017 (5)* | 0,025(6) | 0,037(2) | 1,69(3) | 8,5(1) | 2,90(8) |
| 74V | 0,033(4) | 0,017 (5)* | 0,043(6) | 0,950(8) | 2,25(3) | 4,1(1) | 0,19(2) |
| 75V | 0,021(4) | 0,016 (5)* | 0,036(6) | 0,975(8) | 3,04(3) | 4,3(1) | 0,21(2) |
| 76V | 0,018 (4) | 0,013 (5)* | 0,023(6) | 0,983(8) | 2,29(3) | 4,1(1) | 0,20(2) |
| 77V | 0,022(4) | 0,019 (5) | 0,028(6) | 1,27(8) | 2,69(3) | 3,6(1) | 0,21(2) |
| 78V | 0,032(4) | 0,034 (5) | 0,101(6) | 1,28(8) | 2,83(3) | 3,8(1) | 0,22(2) |
| 79V | 0,033(3) | 0,032 (5) | 0,161(6) | 1,25(8) | 2,82(3) | 4,09(1) | 0,25(2) |
| 80Cr | 0,042(3) | 0,037 (5) | 0,133(6) | 3,60(8) | 3,12(3) | 10,1(1) | 1,83(8) |

Tabla IV.9. Continuación.

| Muestra | Zn | B | Fe | Mg | Ca | Na | Si |
|---------|------------|------------|-----------|-----------|---------|---------|---------|
| 81Cr | 0,045(3) | 0,042 (5) | 0,028(6) | 4,16(8) | 3,35(3) | 10,6(1) | 2,12(8) |
| 82Cr | 0,035(4) | 0,039 (5) | 0,117(6) | 4,60(8) | 3,46(3) | 11,4(1) | 1,63(8) |
| 83Cr | 0,083(4) | 0,056 (5) | 0,032(6) | 4,77(8) | 3,66(3) | 10,9(1) | 1,51(8) |
| 84Cr | 0,021(4) | 0,038 (5) | 0,027(6) | 4,17(8) | 3,16(3) | 10,0(1) | 2,05(8) |
| 85Cr | 0,012 (4) | 0,027 (5) | 0,013(6) | 2,74(8) | 2,40(3) | 8,2(1) | 1,48(8) |
| 86Z | 0,042(3) | 0,104(5) | 0,040(6) | 7,28(8) | 6,24(4) | 9,5(1) | 0,72(2) |
| 87Z | 0,060(4) | 0,095(5) | 0,069(6) | 6,92(8) | 6,10(4) | 9,3(1) | 0,71(2) |
| 88Z | 0,072(4) | 0,074(5) | 0,041(6) | 7,19(8) | 6,27(4) | 9,9(1) | 0,70(2) |
| 89Z | 0,018 (4) | 0,021 (5) | 0,010 (6) | 8,44(8) | 6,64(4) | 9,2(1) | 0,71(2) |
| 90Z | 0,028(4) | 0,023 (5) | 0,022(6) | 9,13(8) | 6,55(4) | 9,5(1) | 0,72(2) |
| 91Z | 0,107(4) | 0,018 (5)* | 0,044(6) | 8,51(8) | 6,51(4) | 8,4(1) | 0,64(2) |
| 92Z | 0,042(3) | 0,069(5) | 0,043(6) | 7,00(8) | 6,06(4) | 9,3(1) | 0,70(2) |
| 93Z | 0,075(4) | 0,052 (5) | 0,038(6) | 6,82(8) | 6,08(4) | 9,8(1) | 0,69(2) |
| 94Ag | 0,021(4) | 0,103(5) | 0,111(6) | 0,258(8) | 0,57(2) | 215(2) | 2,47(8) |
| 95Ag | 0,003 (4)* | 0,093(5) | 0,080(6) | 0,214(8) | 0,45(2) | 205(2) | 4,92(9) |
| 96Ag | 0,029(4) | 0,094(5) | 0,105(6) | 0,222(8) | 0,51(2) | 207(2) | 4,81(9) |
| 97Ag | 0,021(4) | 0,095(5) | 0,018(6) | 0,202(8) | 0,33(2) | 205(2) | 5,01(9) |
| 98Ag | 0,014 (4) | 0,077(5) | 0,011(6) | 0,133 (8) | 0,19(2) | 194(1) | 3,71(8) |
| 99Ag | 0,023(4) | 0,107(5) | 0,024(6) | 0,209(8) | 0,30(2) | 205(2) | 5,10(9) |
| 100Al | 0,032(4) | 0,116(5) | 0,041(6) | 11,64(8) | 3,33(3) | 37,4(3) | 2,84(8) |
| 101Al | 0,057(3) | 0,114(5) | 0,049(6) | 11,63(8) | 3,72(3) | 37,1(3) | 2,83(8) |
| 102Al | 0,084(4) | 0,108(5) | 0,127(6) | 11,50(8) | 3,58(3) | 36,8(3) | 2,81(8) |
| 103Al | 0,014 (4) | 0,074(5) | 0,038(6) | 11,91(8) | 3,07(3) | 43,0(3) | 2,69(8) |
| 104Al | 0,014 (4) | 0,075(5) | 0,032(6) | 11,54(8) | 2,94(3) | 41,7(3) | 3,57(8) |
| 105Al | 0,014 (4) | 0,043 (5) | 0,012(6) | 7,45(8) | 1,96(3) | 25,9(2) | 2,18(8) |
| 106Al | 0,028(4) | 0,053 (5) | 0,011(6) | 9,25(8) | 2,36(3) | 31,7(2) | 2,66(8) |
| 107Al | 0,008 (4) | 0,051 (5) | 0,009 (6) | 7,19(8) | 2,08(3) | 30,5(2) | 2,33(8) |
| 108B | 0,019 (4) | 0,109(5) | 0,055(6) | 0,060(2) | 0,78(2) | 1,8(1) | 0,41(1) |

Tabla IV.9. Continuación.

| Muestra | Zn | B | Fe | Mg | Ca | Na | Si |
|---------|------------|----------|----------|----------|---------|--------|---------|
| 109B | 0,082(4) | 0,119(5) | 0,043(6) | 0,080(2) | 0,88(3) | 2,8(1) | 0,48(1) |
| 110B | 0,007 (4) | 0,144(5) | 0,030(6) | 0,056(2) | 0,58(2) | 1,9(1) | 0,41(1) |
| 111B | 0,040(3) | 0,130(5) | 0,076(6) | 0,057(2) | 0,70(2) | 1,7(1) | 0,40(1) |
| 112B | 0,004 (4)* | 0,121(5) | 0,022(6) | 0,050(2) | 0,51(2) | 1,6(1) | 0,39(2) |
| 113B | 0,089(4) | 0,081(5) | 0,052(6) | 0,073(2) | 0,75(2) | 2,1(1) | 0,44(1) |
| 114B | 0,022(4) | 0,070(5) | 0,052(5) | 0,059(2) | 0,61(2) | 1,7(1) | 0,41(1) |
| 115B | 0,084(4) | 0,068(5) | 0,056(6) | 0,055(2) | 0,69(2) | 1,7(1) | 0,37(2) |

Valor entre paréntesis: error asociado a la última cifra significativa.

*Valores inferiores a LOD.

Como se puede observar los elementos minoritarios son zinc, hierro y boro. Los contenidos medios de estos elementos son 0.03, 0.045 y 0.047 mg/l respectivamente. Los elementos que pueden considerarse mayoritarios son magnesio, sodio, calcio y silicio. Las muestras que presentan un menor contenido en magnesio son las de Chinchón (0.029 mg/l). Las que presentan un mayor contenido en este elemento son las de Almendralejo, con un valor promedio de 10.26 mg/l. Las muestras de Constantina (Sevilla) tienen los niveles de calcio más elevados, con un valor promedio de 9.61 mg/l; mientras que las de Algezares (Murcia), con una concentración media de 0.39 mg/l, son las que presentan menor contenido en el mismo. Además, las muestras de esta localidad son las más ricas en sodio, con valores por encima de los 200 mg/l. En el caso de este elemento, los anises de Chinchón se sitúan entre los que menor concentración presentan, junto con los de Badalona, con contenidos cercanos a 2 mg/l. En cuanto al silicio, los contenidos son próximos a 0.20 mg/l, como es el caso de los anisados de Rute, aunque hay muestras con valores superiores a los 4 mg/l, como es el caso de Algezares. Los valores que se encuentran por debajo del límite de cuantificación no han sido eliminados de la tabla, de acuerdo con las recomendaciones de la IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) [15].

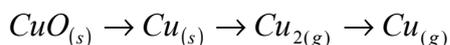
IV.2. Determinación de cobre y plomo mediante ETAAS

La presencia de cobre y plomo en los anisados se debe, fundamentalmente, al proceso de elaboración, en el que se utilizan dispositivos de destilación, que pueden liberar pequeñas cantidades de estos elementos. Debido a su toxicidad los niveles de concentración deben ser muy bajos y, preferiblemente, estar ausentes en las muestras. Las concentraciones que pueden encontrarse son del orden de los $\mu\text{g/l}$ y, por tanto, se necesitan técnicas analíticas muy sensibles como la espectroscopía de absorción atómica con cámara de grafito. Teniendo en cuenta la bibliografía existente [16-18], y para evitar posibles contaminaciones, que podrían ocurrir durante la etapa de mineralización previa, las determinaciones se han realizado directamente en la muestra.

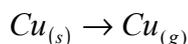
IV.2.1. Determinación de cobre

IV.2.1.1. Mecanismo de atomización del cobre

El mecanismo de atomización del cobre puede transcurrir mediante dos procesos [19], dependiendo de la temperatura de mineralización. Si ésta es baja, se produce a partir de la descomposición térmica del óxido cúprico, pasando a través de un dímero gaseoso:



Si la temperatura de mineralización es elevada, el óxido cúprico se reduce a cobre elemental sobre la superficie de grafito de la plataforma de L'vov y se sublima:



El carácter refractario de este elemento es bastante marcado, con lo que no parece necesario el empleo de modificadores de matriz que reduzcan su pérdida por volatilización. No obstante, algunos autores han empleado modificadores como el ácido nítrico [17], nitrato de paladio [20], nitrato de magnesio [21] y mezcla de estos dos últimos [22-23]. La mezcla paladio-magnesio se considera un modificador químico universal [22].

IV.2.1.2. Diseño y optimización del método

IV.2.1.2.1. Programa de temperatura

- Secado

Las muestras se diluyen con una mezcla de agua, etanol y ácido nítrico. Por este motivo, el secado de la muestra, previo a la etapa de mineralización en la cámara de grafito, debe realizarse en dos etapas. En la primera de ellas se establece una temperatura de 80 °C para evaporar suavemente el alcohol de la muestra. En la segunda, la temperatura es de 110 °C, adecuada para la eliminación del agua. Los tiempos de secado se optimizaron mediante la observación directa de la gota inyectada, comprobando que ésta estuviera completamente seca antes de la mineralización. La rampa y tiempo de mantenimiento de la temperatura de secado fueron de 5 y 15 segundos, respectivamente, para la eliminación de etanol y de 10 y 20 segundos para la eliminación del agua.

- Mineralización

Para optimizar la temperatura de mineralización se utilizaron 100 µl de muestra, diluyendo 10 veces en la mezcla ácida de etanol/agua, fijando la temperatura de atomización en 2300 °C, que es la recomendada por el fabricante del equipo [24]. De este modo se varió la temperatura de mineralización entre 700 y 1800 °C y se registró la absorbancia de la muestra durante la atomización (A·s). El tiempo de lectura se fijó en 3 segundos, suficiente para registrar el pico completo.

Representando el área del pico obtenido frente a la temperatura de mineralización se obtiene la curva de mineralización. Se registraron cuatro curvas de mineralización, correspondientes a las determinaciones sin modificador de matriz y con nitrato de magnesio, paladio y una mezcla de ambos (Figura IV.23). Además se registraron estas mismas curvas para una disolución acuosa de cobre, preparada en las mismas condiciones que la muestra, con una concentración final de 10 µg/l (Figura IV.24). Los tiempos de rampa y mantenimiento fueron de 10 y 15 segundos, respectivamente. Estos tiempos fueron suficientes para eliminar el fondo que pudiera producir la matriz de la muestra.

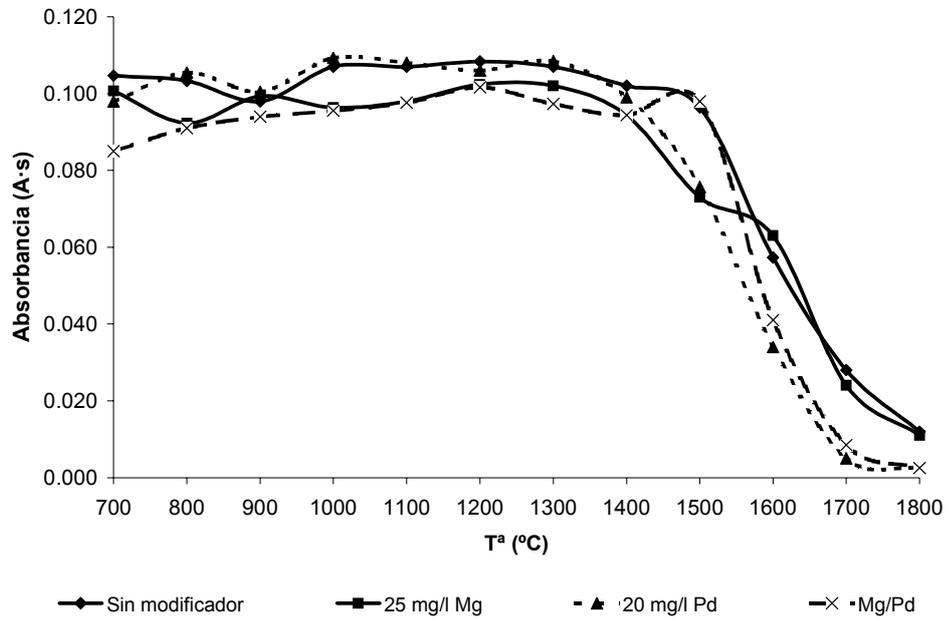


Figura IV.23. Curvas de mineralización para cobre en muestra

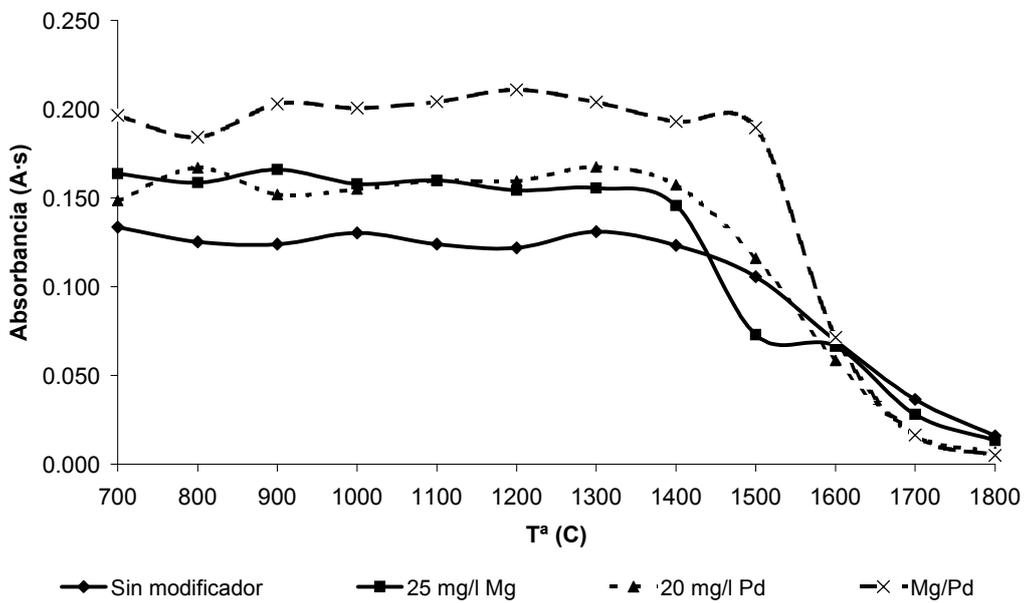


Figura IV.24. Curvas de mineralización para cobre en disolución acuosa (10 µg/l).

Como se puede observar existe un decaimiento de la señal analítica a partir de los 1400 °C, ajustándose, por tanto, la temperatura de mineralización en 1300 °C. No se observan diferencias entre las curvas obtenidas para la muestra sin modificador y con los distintos modificadores utilizados. Tampoco existen diferencias apreciables entre las curvas obtenidas para patrones acuosos y para las muestras, de lo que se concluye que no existe un efecto importante de la matriz de la muestra en el proceso de mineralización. Al considerar la curva de mineralización en disolución acuosa con la mezcla paladio-magnesio se puede llegar a mineralizar a 1400-1500 °C.

- Atomización

Para obtener las curvas de atomización la temperatura de mineralización se fijó en 1300 °C, y se varió la de atomización entre 2000 y 2400 °C. También se comprobó el efecto de los distintos modificadores de matriz en las determinaciones de cobre en muestra y en disolución acuosa (Figuras IV.25 y IV.26).

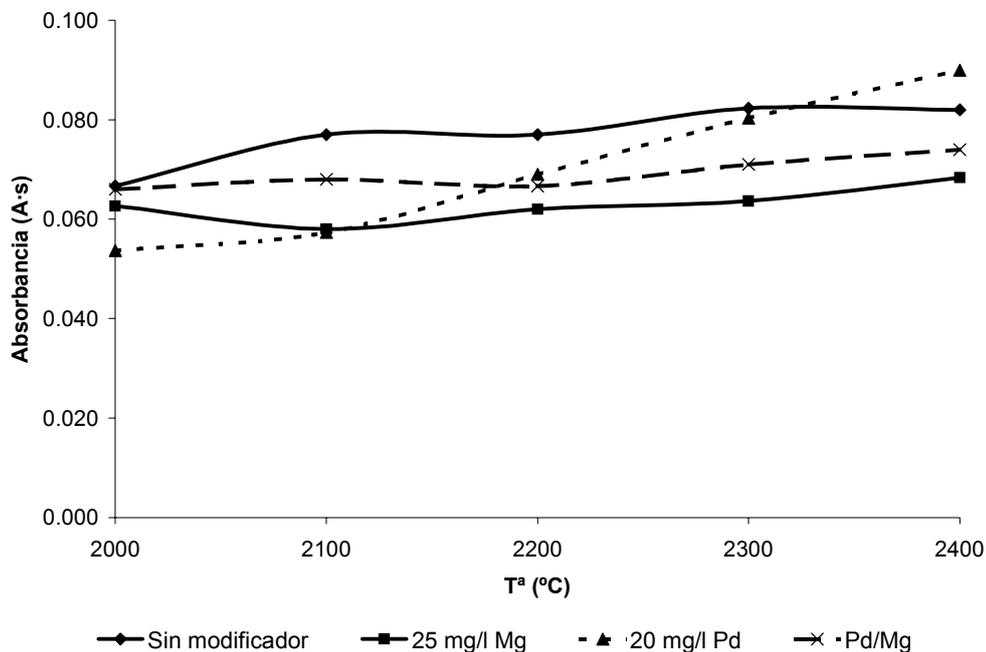


Figura IV.25. Curvas de atomización para cobre en muestra.

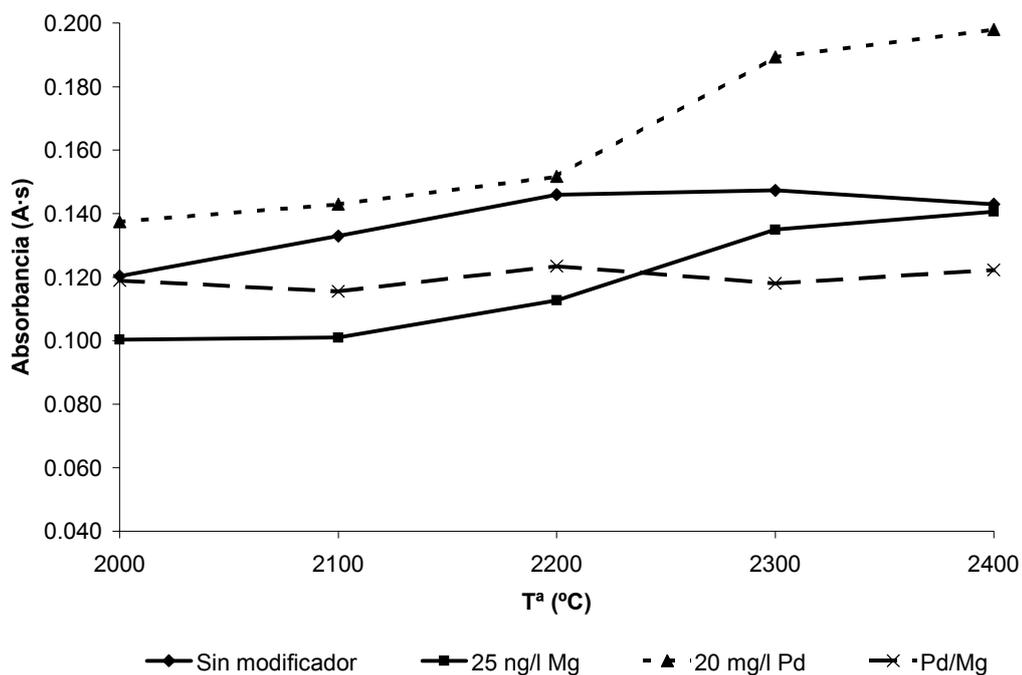


Figura IV.26. Curvas de atomización para cobre en disolución acuosa (10 µg/l).

Como se puede observar, la señal aumenta con la temperatura de atomización hasta llegar a los 2300 °C. A partir de esta temperatura aumenta levemente. De este modo, es posible establecer una temperatura de atomización comprendida entre 2300 ó 2400 °C. Atendiendo a la forma del pico de absorción (Figs. IV-27 y IV-28) se aprecia que el que se obtiene a 2300 °C es más estrecho que el obtenido a 2400 °C. Por este motivo, se fija la temperatura de atomización a 2300 °C.

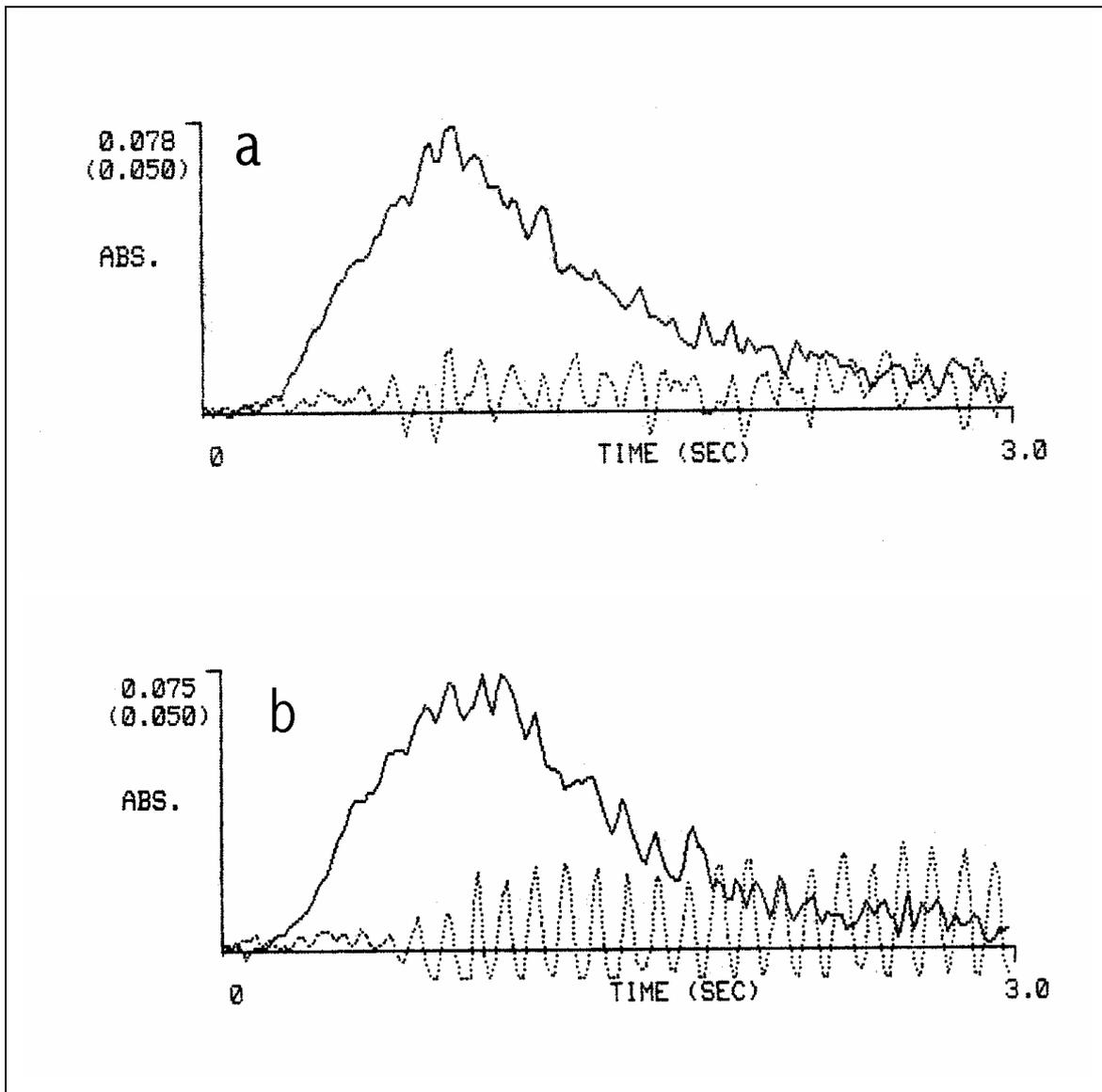


Figura IV.27. Forma de los picos de absorción para cobre a las temperaturas de atomización 2300 °C (a) y 2400 °C (b).

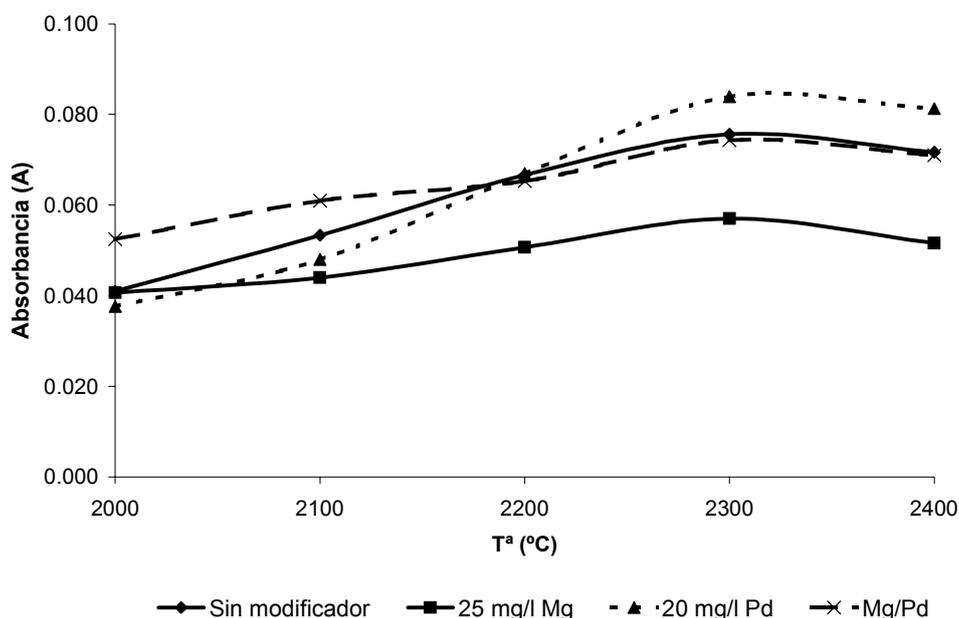


Figura IV.28. Curva de atomización, representando la altura de pico frente a temperatura, para cobre en muestra.

IV.2.1.2.2. Modificador de matriz

Ya se dijo anteriormente que, debido a que la mezcla de nitrato de magnesio y de paladio actúa como un modificador universal [22], se optimizó la cantidad a emplear de estas dos sustancias. Para ello, se llevaron a cabo medidas con distintas cantidades de ambos modificadores. El estudio se llevó a cabo para muestras de ánodos diluidas al 10 %, y representando la absorbancia frente a las concentraciones de los modificadores.

Como se puede observar en la Figura IV.29, la absorbancia aumenta con la concentración de paladio, manteniéndose prácticamente constante a partir de 30 mg/l. Al ir aumentando la cantidad de magnesio, la señal decae, apreciándose un aumento poco acentuado a partir de los 40 mg/l. El máximo de absorbancia se obtiene para 30 mg/l de paladio, por lo tanto, sólo se usará esta especie como modificador de la matriz.

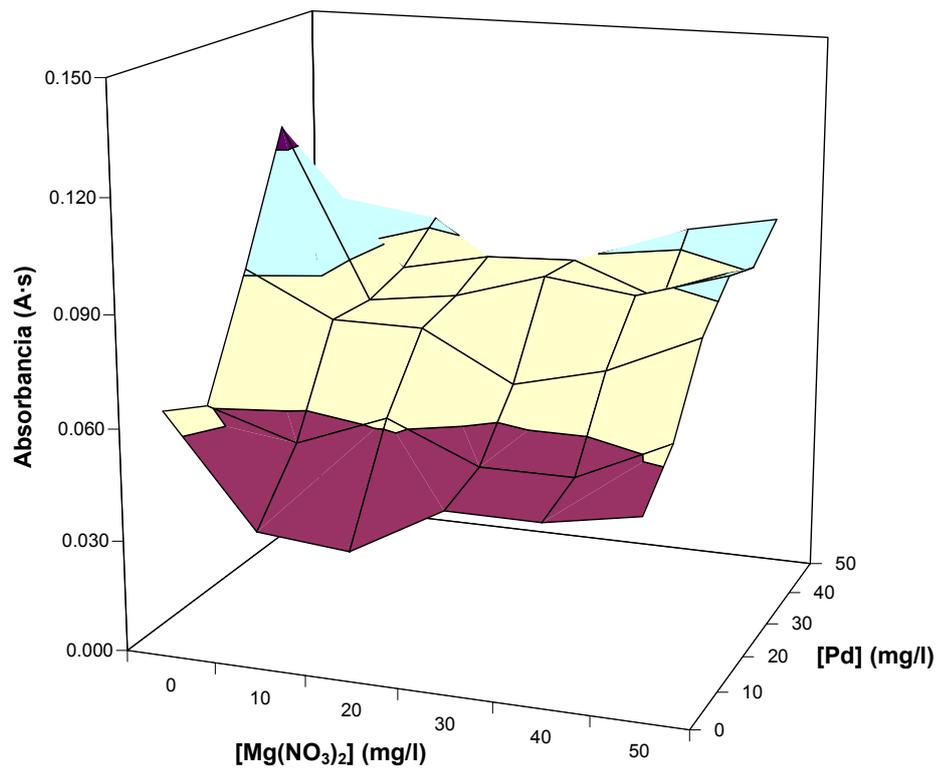


Figura IV.29. Influencia de las concentraciones $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ y Pd sobre la absorbancia en muestras de anís.

IV.2.1.3. Efecto matriz

Para comprobar si existe efecto de la matriz de la muestra, se realizaron en varios días distintas rectas de calibrado externo, utilizando patrones acuosos, y de adición patrón. A partir de las pendientes obtenidas en ambos casos se calculó las medias de las mismas y su desviación estándar. Para comprobar si existen diferencias significativas entre las pendientes promediadas de ambas rectas se utilizaron el test t de Student y el F de Fischer [14]. En la Tabla IV.10 se presentan los resultados obtenidos. Como se puede observar, no se aprecian diferencias significativas entre ambas pendientes, de lo que se deduce que es posible realizar la determinación de cobre en las muestras de anisados mediante calibrado externo, pues el efecto de la matriz de las muestras no es significativo.

Tabla IV. 10. Pruebas de significación para la comparación de las pendientes del calibrado externo y adición patrón

| Calibrado | \bar{b} | $s_{\bar{b}}$ | N | |
|--------------------------|------------------|---------------|---------------|-------|
| AP | 0.0125 | 0.0029 | 6 | |
| CE | 0.0121 | 0.0036 | 6 | |
| Pruebas de significación | | | | |
| Prueba F | F_{exp} | 1.154 | F(0.05, 5, 5) | 7.146 |
| Prueba t | t_{exp} | 0.25 | t(0.05, 10) | 2.23 |

\bar{b} : pendiente calibrado adición patrón (AP), de calibrado externo (CE), $s_{\bar{b}}$: desviación estándar de la pendiente, N: número de datos

Para comprobar la presencia de efecto matriz, cuando se llevan a cabo determinaciones con cantidades diferentes de muestra, se realizaron calibraciones por el método de la adición estándar con 50, 100 y 200 μl de anís, comprobándose que las pendientes de las mismas están dentro del intervalo de confianza, calculado a partir de los datos de la Tabla IV.10, de la pendiente de calibrado externo (0.121 ± 0.0036). Los valores de las pendientes de las distintas curvas se pueden ver en la Figura IV.30.

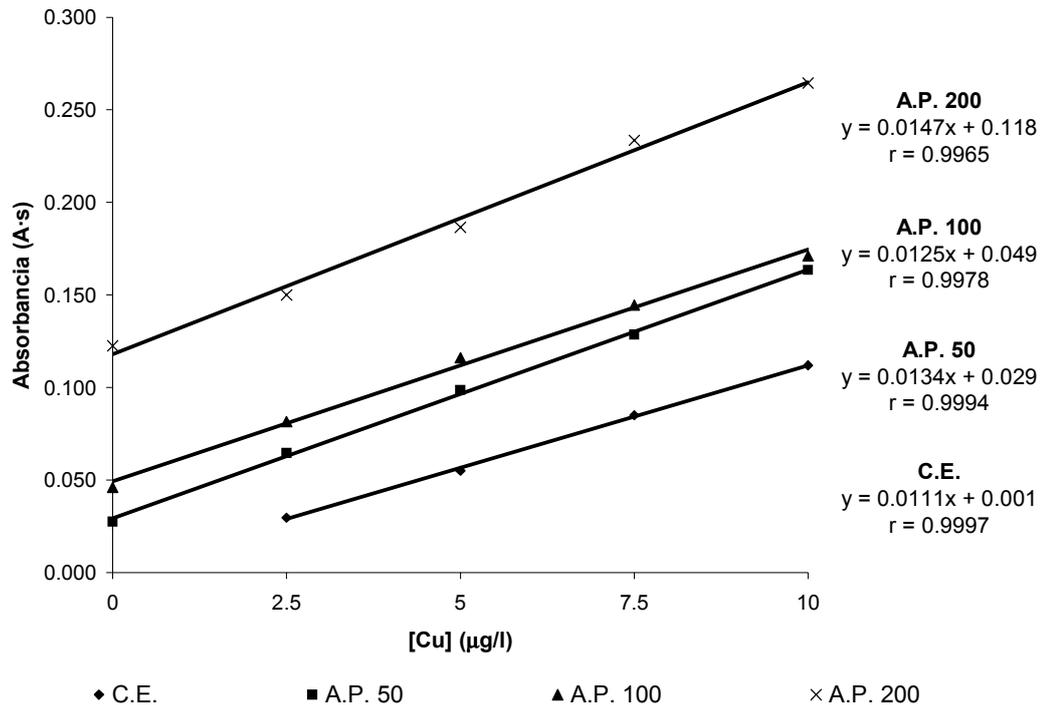


Figura IV.30. Rectas de calibrado externo y adición patrón para 50, 100 y 200 µl de muestra

IV.2.1.4. Parámetros de calidad del método

IV.2.1.4.1. Exactitud

La exactitud del método para la determinación de cobre en anisados se ha estudiado mediante ensayos de recuperación. Se analizaron muestras dopadas en cinco niveles de adición ($a = 1-5$), realizando cinco replicas en cada nivel ($r = 1-5$). Se ha llevado a cabo un análisis de la varianza de un factor (nivel de adición) para ver si existe un sesgo significativo en los resultados debido al cambio de nivel. En este caso la varianza entre niveles y de error puro se calculan con las siguientes expresiones:

$$S_{nivel}^2 = \frac{r \sum_{i=1}^a (\bar{R}_i - \bar{\bar{R}})^2}{a-1} \quad (4.18)$$

$$S_{rep}^2 = \frac{\sum_{i=1}^a \sum_{k=1}^r (R_{ik} - \bar{R}_i)^2}{a(r-1)} \quad (4.19)$$

donde R_{ik} son los valores de recuperación individuales para el nivel i y la réplica k , \bar{R}_i es la media de las recuperaciones por nivel y \bar{R} la media global de todas las recuperaciones.

Para comprobar que no existen errores sistemáticos debidos al cambio de nivel se realiza una prueba F de dos colas donde, el valor de F experimental, calculado como se indica en la Ecuación 4.20, se compara con el valor crítico $F(a-1, a(r-1)95\%)$.

$$F = \frac{S_{nivel}^2}{S_{rep}^2} \quad (4.20)$$

En la Tabla IV.11 se muestran los cinco niveles de adición estudiados. En la Figura IV.31 se pueden observar los rangos de recuperaciones individuales encontrados a cada nivel de adición. Los resultados del ANOVA se presentan en la Tabla IV.12. Como se puede ver en el resultado del análisis, el valor de F experimental es menor que el crítico, de lo que se concluye que el nivel de adición no introduce un sesgo significativo en el resultado global de las recuperaciones.

Tabla IV.11. Niveles de adición estudiados en el método de determinación de cobre

| | | | | | |
|------------------|----|----|----|----|----|
| Nivel de adición | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Cu (µg/l) | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 |

Tabla IV. 12. Resultado del ANOVA de las recuperaciones de cobre

| | S ² g. l. | | | |
|------------|----------------------|----|-------------------|-------|
| Nivel | 49.0 | 4 | F | 2.029 |
| Error puro | 24.2 | 20 | F _{crit} | 3.515 |

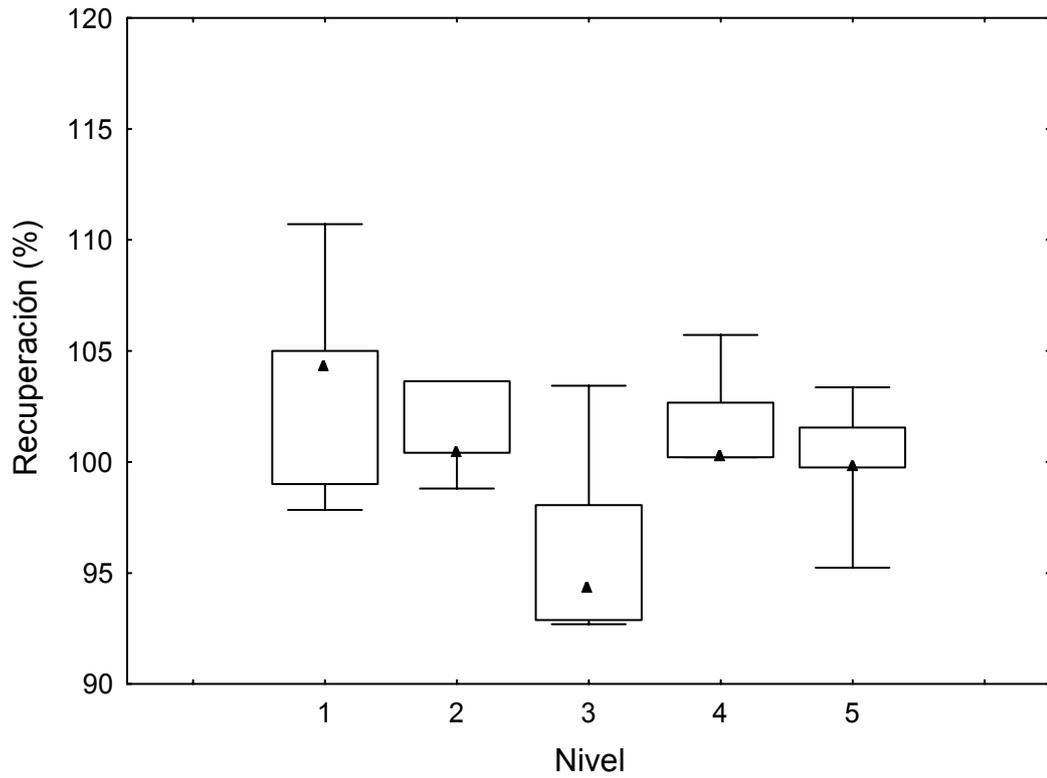


Figura IV.31. Recuperaciones de cobre en cada nivel de adición

Cada nivel de adición tiene una incertidumbre asociada, $u(\bar{R}_i)$, que corresponde con la desviación estándar de las medidas repetidas:

$$u(\bar{R}_i) = \frac{\sum_{k=1}^r (R_{ik} - \bar{R}_i)}{r-1} \quad (4.21)$$

La recuperación global tendrá entonces una incertidumbre, $u(\bar{\bar{R}})$, que consiste en dos contribuciones, una de combinación, $u_c(\bar{\bar{R}})$, y otra de repetición pura, $u_{rep}(\bar{\bar{R}})$.

$$u_c^2(\bar{\bar{R}}) = \frac{1}{a^2} \left[\sum_{i=1}^a u^2(\bar{R}_i) \right] \quad (4.22)$$

$$u_{rep}^2(\bar{R}) = \frac{\sum_{i=1}^a (\bar{R}_i - \bar{\bar{R}})^2}{a(a-1)} \quad (4.23)$$

Siendo entonces el valor final:

$$u(\bar{R}) = \sqrt{u_c^2(\bar{R}) + u_{rep}^2(\bar{R})} \quad (4.24)$$

Como ya se dijo anteriormente, las incertidumbres (u) se pueden convertir en incertidumbre expandida (U) multiplicando por un factor de cobertura k ($k = 2$, para el 95% de nivel de confianza) [9]. Los valores de recuperación obtenidos a cada nivel de adición y la recuperación global, junto con sus incertidumbres expandidas, se muestran en la Tabla IV.13. Como se puede observar, en todos los niveles de adición y globalmente, el intervalo de confianza contiene al valor 100 %.

Tabla IV.13. Recuperaciones de cobre en cada nivel de adición y recuperación global con sus incertidumbres expandidas

| Nivel de Adición | Recuperación (%) (R ± U) |
|------------------|-----------------------------|
| 1 | 104 ± 13 |
| 2 | 104 ± 14 |
| 3 | 96 ± 9 |
| 4 | 102 ± 5 |
| 5 | 100 ± 6 |
| Global | 101 ± 5 |

IV.2.1.4.2. Precisión

La precisión del método se evaluó mediante el estudio de la repetitividad y reproducibilidad del mismo. Se analizó una muestra de control diez veces, calculando la desviación estándar relativa. El valor de repetitividad obtenido fue del 2.85 %.

Para llevar a cabo el estudio de reproducibilidad se analizó la misma muestra de control en días distintos, en condiciones de precisión intermedia. El valor de precisión intermedia obtenido, expresado como desviación estándar relativa, fue del 5.96 %.

IV.2.1.4.3. Calibración, linealidad y sensibilidad

Tal y como se ha mencionado antes, la cuantificación de las muestras se lleva a cabo mediante calibrado externo, utilizando patrones de concentración comprendida entre 2.5 µg/l y 10 µg/l. En la Tabla IV.14. se presenta los parámetros de calibración, obtenidos a partir de seis experimentos. La linealidad se calculó a partir de la Ecuación 4.15, para cada una de las rectas de calibrado, obteniéndose un valor promedio de la misma.

Los límites de detección y cuantificación se calculan tal y como se indicó en la Sección IV.1.3.3 (Ecuaciones 4.16 y 4.17). En este caso, se utiliza el valor promedio de la pendiente de calibrado externo, \bar{b} , con lo que las expresiones quedan:

$$LOD = \frac{3 \cdot s_{bl}}{\bar{b}} \quad (4.25)$$

$$LOQ = \frac{10 \cdot s_{bl}}{\bar{b}} \quad (4.26)$$

La sensibilidad en ET-AAS se suele expresar en términos de masa característica. La masa característica se define como la masa de analito que produce una señal neta (en absorbancia integrada en función del tiempo) de 0.0044 [25]. Este parámetro se calcula, según la expresión:

$$m_0 = \frac{0.0044 C_i V_i}{Q_{AC} - Q_{AB}} \quad (4.27)$$

Donde C_i es la concentración de patrón utilizada en la recta de calibrado, V_i el volumen inyectado, Q_{AC} es la señal obtenida para el patrón y Q_{AB} es la señal del blanco. De este modo, es posible calcular una masa característica en cada nivel de la recta de calibrado. Finalmente se calcula un valor de m_0 promediado que será característico del método.

Tabla IV.14. Parámetros de la recta de calibrado, linealidad, límites de detección y cuantificación y masa característica para la determinación de cobre por ETAAS

| Parámetro | Valor |
|-------------------------|--------------------|
| $b \pm s_b$ | 0.012 ± 0.004 |
| $a \pm s_a$ | -0.001 ± 0.003 |
| r | 0.9993 |
| Linealidad | 97.7% |
| LOD ($\mu\text{g/l}$) | 0.6 |
| LOQ ($\mu\text{g/l}$) | 2.1 |
| m_0 (pg) | 8.4 ± 0.2 |

Los límites de detección y cuantificación que se presentan en la Tabla IV.14 se refieren a la muestra diluida. Teniendo en cuenta la dilución efectuada, se pueden calcular estos límites referidos a la muestra sin diluir. En la Sección IV.2.1.3 se comprobó que no existía efecto matriz al aumentar la cantidad de muestra. La mayor cantidad de muestra utilizada fue de 200 μl , diluida con la mezcla ácida de etanol y agua hasta 1 ml. Teniendo en cuenta esta dilución, se calculan los límites de detección y cuantificación, referidos a la muestra sin diluir. De este modo, se ha obtenido un valor para el LOD de 3.2 $\mu\text{g/l}$ y para el LOQ de 10.6 $\mu\text{g/l}$.

El valor de m_0 para patrones acuosos, obtenidos de las especificaciones del espectrómetro, es de 4.0 pg. La masa característica del método desarrollado para la determinación directa de cobre en anisados es el doble. La masa característica depende de las condiciones experimentales y los reactivos utilizados. La disminución de sensibilidad puede deberse a la presencia de etanol, pero, en cualquier caso la

sensibilidad es suficiente para la aplicación que se pretende realizar. Además, la rapidez del método desarrollado compensa la pérdida de sensibilidad detectada y, ya que no se introducen etapas de digestión de muestra, se evitan posibles fuentes de contaminación.

IV.2.1.5. Determinación de cobre en anisados

Se ha determinado el contenido en cobre de una serie de muestras comerciales de anís. Las muestras se diluyeron en etanol/agua/ácido nítrico (40:58:2) de modo que las concentraciones de cobre estuvieran dentro del rango de la recta de calibrado. En la Tabla IV.15 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla IV.15. Contenido en cobre ($\mu\text{g/l}$) de las muestras de anisados analizadas

| Muestra | Cu | Muestra | Cu |
|---------|----------|---------|----------|
| 1C | < 3.2 | 14U | < 3.2 |
| 2C | 27.4 (9) | 15DM | < 3.2 |
| 3C | 13 (2) | 16V | 81 (2) |
| 4R | 147 (7) | 17V | 37.4 (9) |
| 5R | 56 (1) | 18Cr | 30 (6) |
| 6Ch | 16 (1) | 19Z | 22 (1) |
| 7Ch | 108 (3) | 20Ag | 6 (1) |
| 8Ch | 52 (2) | 21Al | < 3.2 |
| 9Cs | 8.8 (8) | 22B | 9.9 (5) |
| 10E | 437 (6) | 23B | 32 (2) |
| 11E | 380 (8) | 24T | 12 (2) |
| 12Ca | 36.6 (7) | 25S | 58 (1) |
| 13Ca | 173 (4) | 26Zi | 45.1 (7) |

Valor entre paréntesis: error asociado a la última cifra significativa

Determinaciones por triplicado

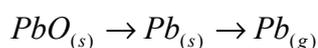
Los datos indican que hay variabilidad en los contenidos de cobre. La mayoría de las muestras presentan concentraciones inferiores a $50 \mu\text{g/l}$, aunque las muestras 10E, 11E, 13Ca y 7Ch tienen concentraciones superiores a $100 \mu\text{g/l}$. Teniendo en cuenta

las recomendaciones de la IUPAC [15] los datos correspondientes a las muestras que presentan contenidos inferiores al límite de cuantificación también se han incluido. Las muestras con una mayor concentración en cobre son las que provienen de Estepa, con valores de 437 y 380 µg/l, respectivamente.

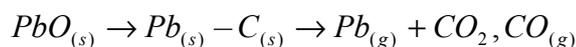
IV.2.2. Determinación de plomo

IV.2.2.1. Mecanismo de atomización del plomo

L'vov y Ryabchuck [26] propusieron un mecanismo, en ausencia de modificadores químicos, donde la atomización ocurre a través de la disociación térmica del óxido y la subsiguiente vaporización del metal.



Más adelante se estableció el mecanismo a través de la reducción del óxido sobre la superficie de grafito [27, 28].



En presencia de paladio se forman enlaces Pb-Pd, que se rompen generando el vapor atómico. De este modo se retrasa la atomización del plomo, pues se necesita más energía de activación, lo que se traduce en mayores temperaturas de mineralización, para romper el enlace Pb-Pd y atomizar el plomo [29]. El empleo de paladio y nitrato de magnesio como modificador puede aumentar la temperatura de atomización [30, 31]. En estas condiciones se pueden obtener temperaturas de mineralización de 900 o 1000 °C y temperaturas de atomización de 1900 °C.

IV.2.2.2. Diseño y optimización del método

IV.2.2.2.1. Programa de temperatura

- Secado

Tal y como se comentó en el apartado IV.2.1.2.1, el secado para la determinación de plomo también se realiza en dos etapas. Una primera, para la eliminación de alcohol en la que se calienta a 80 °C, y otra a 110 °C, para evaporar el agua.

- Mineralización

El estudio para optimizar la temperatura de mineralización de las muestras se llevó a cabo tomando volúmenes de 100 μ l de anís y diluyendo 10 veces en la mezcla ácida de etanol/agua. En este caso y debido al bajo contenido en plomo de las muestras, se añadió plomo, de manera que la concentración de este metal en la muestra diluida fuera 5 μ g/l. Para realizar estas medidas se utilizó la temperatura de atomización recomendada por el fabricante del equipo [24], 1800 °C, y se fue variando la temperatura de mineralización entre 500 y 1300 °C. Se midieron las absorbancias en el paso de atomización con un tiempo de lectura de 3 segundos.

Se obtuvieron cuatro curvas de mineralización, utilizando distintos modificadores de matriz (Figura IV.32). También se registraron las curvas de mineralización para un patrón acuoso de plomo con 10 μ g/l (Figura IV.33). Como se observa en ambas figuras, cuando no se utiliza paladio como modificador, la mineralización no puede llevarse a cabo por encima de los 600-700 °C. En cambio, con 20 mg/l de paladio, es posible llegar a temperaturas de hasta 1100 °C. Cuando se emplea como modificador la mezcla de nitrato de magnesio y de paladio, la temperatura de mineralización se debe fijar a 900 °C, como se puede ver en la Figura IV.32.

- Atomización

Se obtuvieron las curvas de atomización fijando la temperatura de mineralización a 600 °C, en los casos en que no se añade paladio, a 1100 °C, cuando sólo se usa este modificador, y a 900 °C, si se emplea la mezcla paladio/magnesio. En las Figuras IV.34 y IV.35 se pueden ver las curvas obtenidas para muestra de anís con plomo añadido y para una disolución acuosa con 10 μ g/l de plomo, respectivamente.

En el primer caso, cuando no se usa paladio, la señal analítica permanece prácticamente constante entre 1100 y 1500 °C. En el caso de la disolución acuosa este intervalo parece más estrecho (1300-1500 °C). Si se añade paladio, la temperatura de atomización podría fijarse a 1600 ó 1700 °C. Al emplear la mezcla de paladio y magnesio como modificador, la absorbancia es máxima a 1700 °C. No obstante, si se observan los picos obtenidos a 1700 y 1800 °C (Figura IV.36), se puede ver que la calidad del pico es mejor a 1800 °C. Por ese motivo, se fija la temperatura de atomización a 1800 °C.

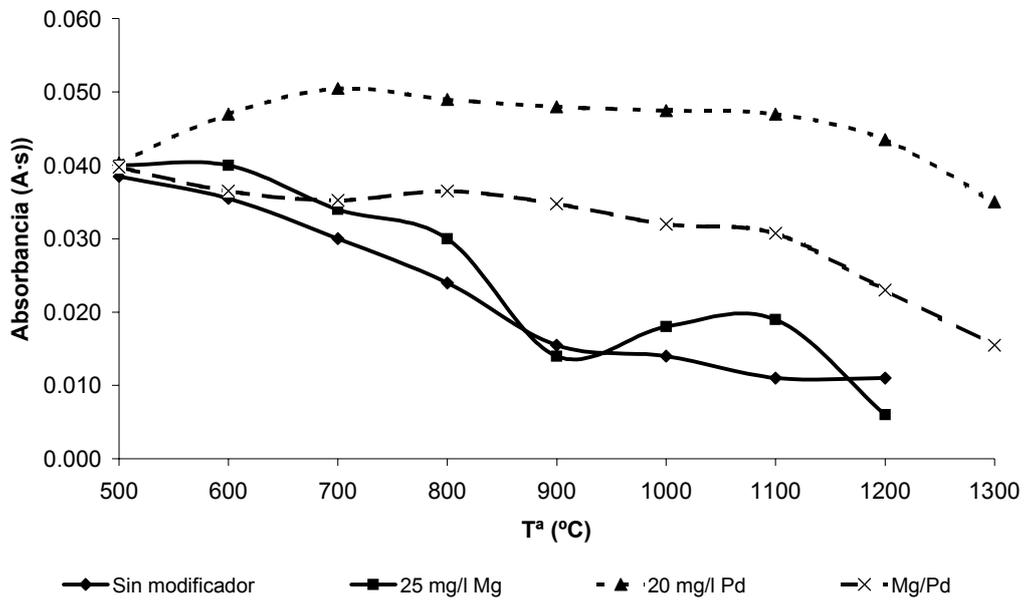


Figura IV.32. Curvas de mineralización para plomo en muestra con adición de 5 µg/l de Pb

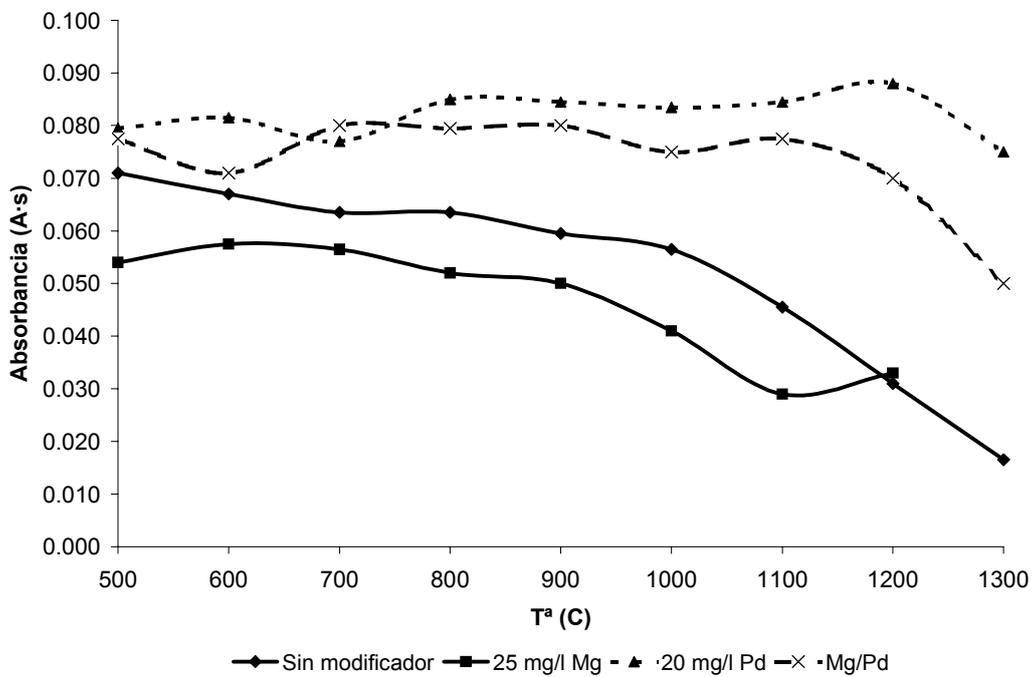


Figura IV.33. Curvas de mineralización para plomo en disolución acuosa (10 µg/l).

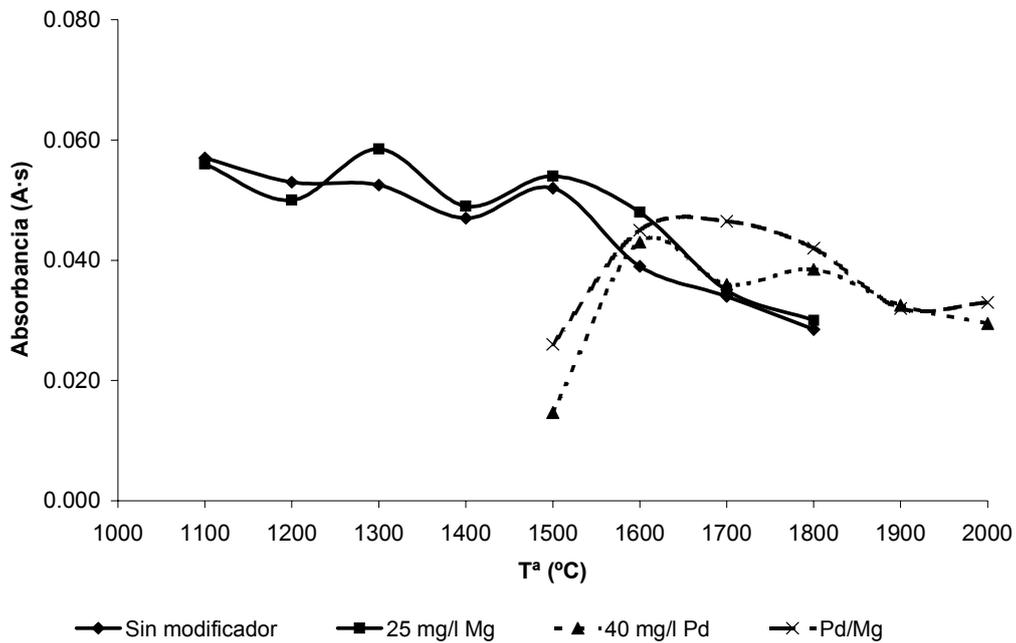


Figura IV.34. Curvas de atomización para plomo en muestra de anís con 5 µg/l de Pb.

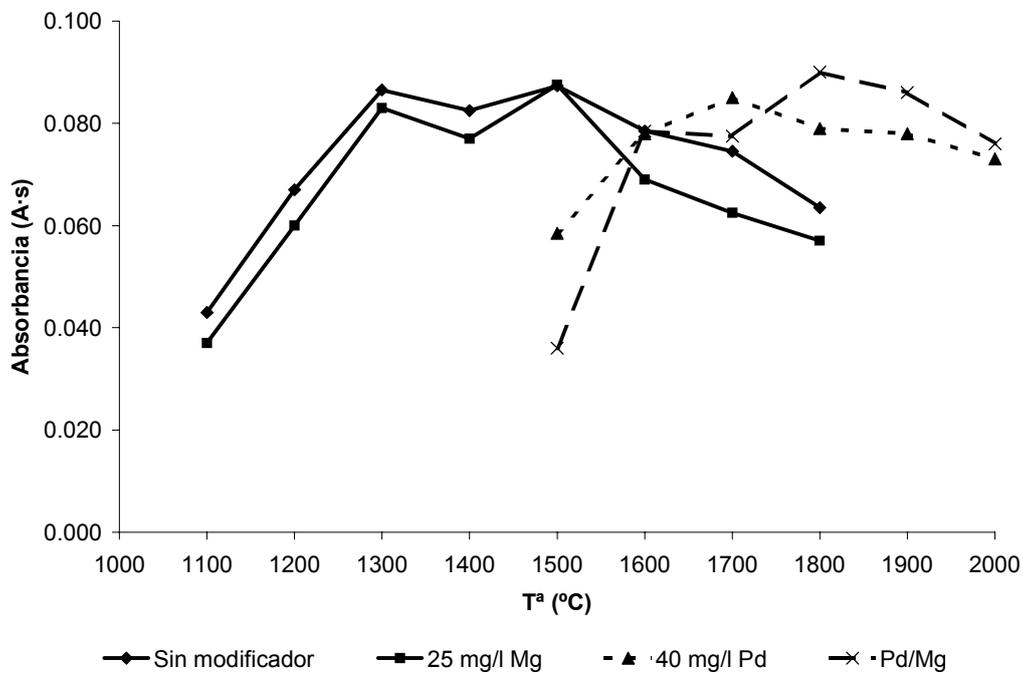


Figura IV.35. Curvas de atomización para plomo en disolución acuosa (10 µg/l).

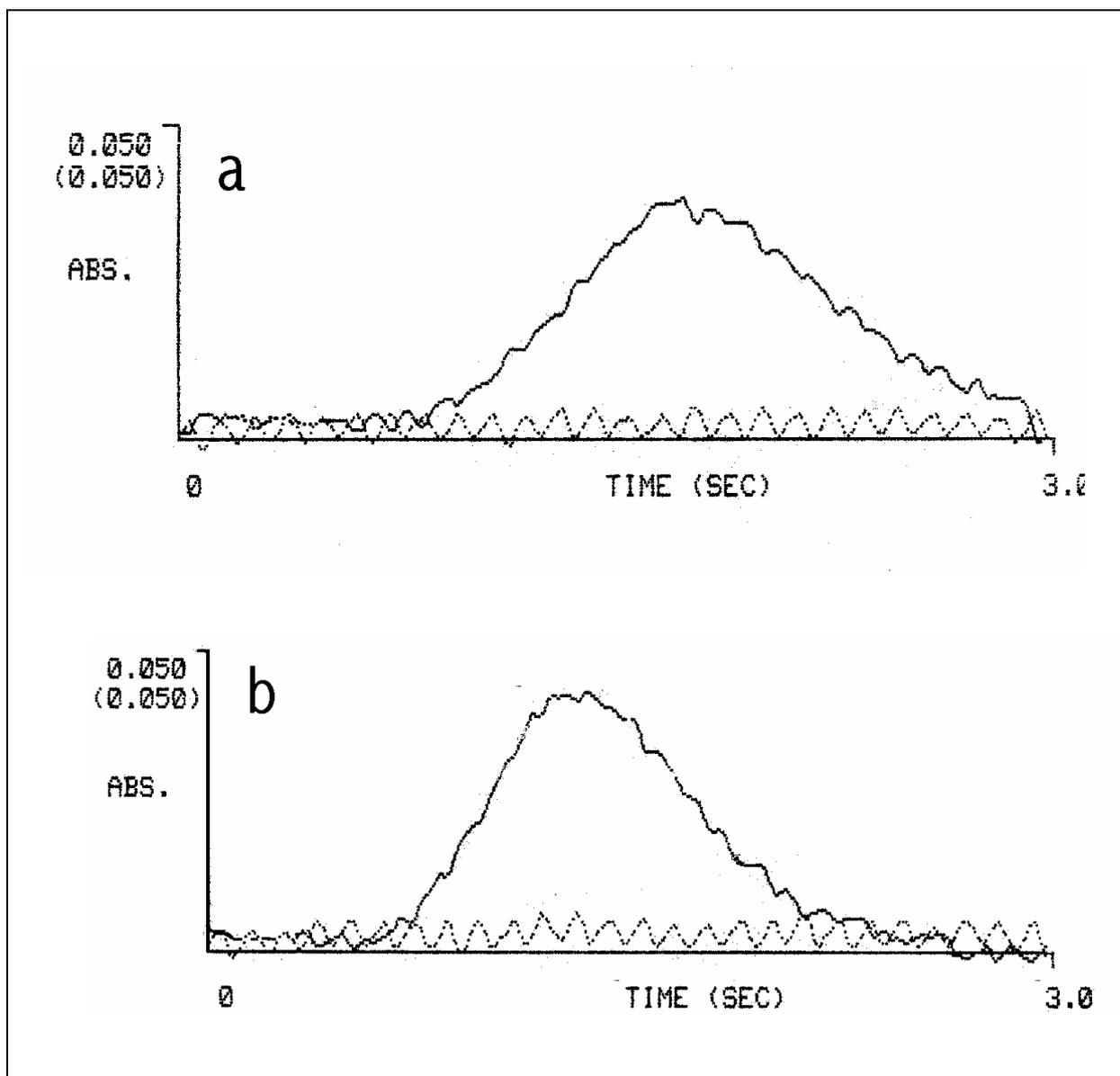


Figura IV.36. Forma de los picos de absorción para las temperaturas de atomización plomo, 1700 °C (a) y 1800 °C (b)

IV.2.2.2.2. Modificador de matriz

Para obtener las concentraciones óptimas de nitrato de magnesio y de paladio se han medido las absorbancias de muestras de anís diluidas 10 veces, a las que se añadieron 5 $\mu\text{g/l}$ de plomo. Como se puede observar en la Figura IV.37, la absorbancia es muy baja cuando no hay paladio en el medio y se mantiene prácticamente constante al aumentar la concentración de esta especie. El aumento de la cantidad de magnesio, a bajas concentraciones de paladio, parece tener un efecto negativo en la señal. Para una

concentración de paladio de 30 mg/l se observa que la señal es máxima cuando se tienen 10 mg/l de nitrato de magnesio. La cantidad de ambas especies se fijan entonces en 10 y 30 mg/l de nitrato de magnesio y paladio, respectivamente.

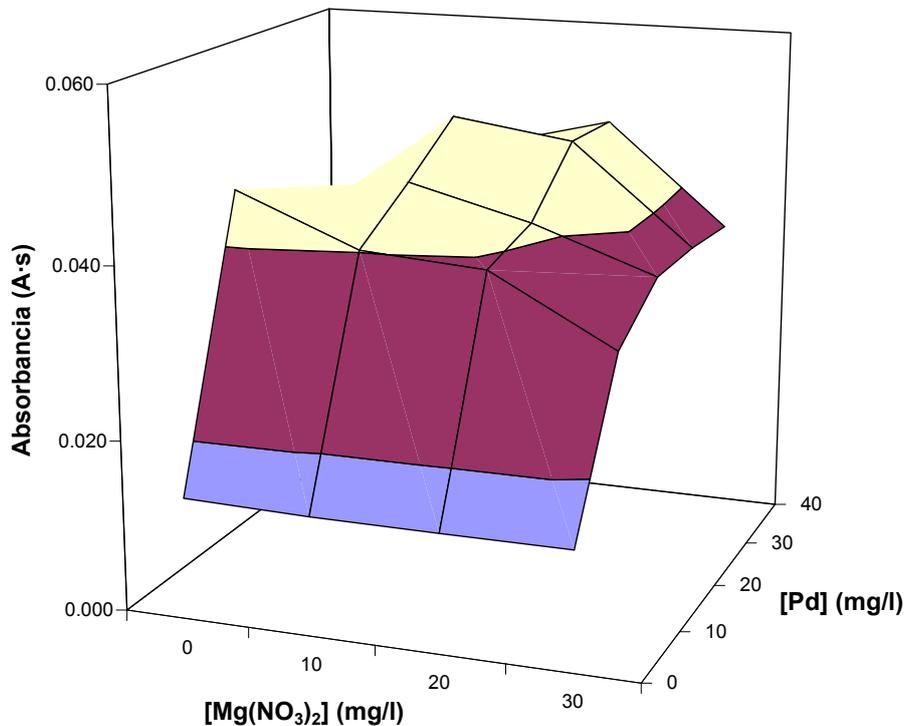


Figura IV.37. Efecto de las cantidades de Mg y Pd sobre la absorbancia para Pb en muestras de anís

IV.2.2.3. Efecto matriz

Para evaluar la existencia de efecto matriz en la determinación de plomo en anís se han comparado las pendientes de rectas de calibrado obtenidas mediante en método de la adición estándar y mediante calibrado externo. Se han aplicado los test t de Student y F para comprobar si existe diferencia significativa entre los valores de las pendientes. En la Tabla IV.16 se presentan los resultados de dicha comparación. Como se puede observar el efecto de la matriz de las muestras no es significativo, pudiéndose realizar la determinación de plomo en anisados mediante calibrado externo.

Tabla IV. 16. Pruebas de significación para la comparación de las pendientes del calibrado externo y adición patrón en la determinación de plomo en anisados.

| Calibrado | \bar{b} | $s_{\bar{b}}$ | n | |
|--------------------------|------------------|---------------|---------------|-------|
| AP | 0.0068 | 0.0008 | 6 | |
| CE | 0.0068 | 0.0012 | 6 | |
| Pruebas de significación | | | | |
| Prueba F | F_{exp} | 2.317 | F(0.05, 5, 5) | 7.146 |
| Prueba t | t_{exp} | 0.05 | t(0.05, 10) | 2.23 |

\bar{b} : pendiente promedio de adición patrón (AP), calibrado externo (CE), $s_{\bar{b}}$: desviación estándar de la pendiente, n: número de datos

El intervalo de confianza de la pendiente de calibrado externo es (0.0068 ± 0.0013) . Doblando la cantidad de muestra se obtiene una recta de adición patrón de pendiente 0.0062. De este modo se comprueba que es posible doblar la cantidad de muestra sin que se aprecie efecto matriz.

IV.2.2.4. Parámetros de calidad del método

IV.2.2.4.1. Exactitud

La exactitud del método para la determinación de plomo en anisados se ha estudiado mediante ensayos de recuperación, tal y como se ha explicado en la Sección IV.2.1.4.1. Se analizaron muestras dopadas en cinco niveles de adición, realizando cinco réplicas en cada nivel, realizando el correspondiente ANOVA a partir de los datos de recuperación obtenidos. En la Tabla IV.17 se muestran los cinco niveles de adición estudiados. En la Figura IV.38 se pueden observar los rangos de recuperaciones individuales encontrados a cada nivel de adición. Los resultados del ANOVA se presentan en la Tabla IV.18.

Tabla IV.17. Niveles de adición estudiados en el método de determinación de plomo

| Nivel de adición | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|------------------------|----|----|----|----|----|
| Pb ($\mu\text{g/l}$) | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 |

Tabla IV. 18. Resultado del ANOVA de las recuperaciones de plomo

| | S^2 g. l. | | | |
|------------|-------------|----|-------------------|-------|
| Nivel | 746.1 | 4 | F | 8.665 |
| Error puro | 86.1 | 20 | F _{crit} | 3.515 |

Como se puede observar, existe un sesgo significativo debido a uno o más niveles que presentan recuperaciones medias significativamente diferentes al resto. Para detectar el nivel responsable de dicho sesgo se aplica el test de Tukey-HSD [8]. El resultado del mismo indica que el primer nivel de adición presenta diferencias significativas con los niveles 3, 4 y 5. Este hecho puede visualizarse en la Figura IV.18, donde se representan los rangos de recuperación obtenidos en cada nivel de adición. Como se puede ver, es posible que el nivel 2 también presente un sesgo respecto al resto. Se realiza de nuevo un ANOVA, eliminando el primer nivel, para comprobar esto. Los resultados de este análisis (Tabla IV.19) muestran que existe un sesgo debido al cambio de nivel, el nivel responsable de dicho sesgo, como indica el test de Tukey, es el segundo.

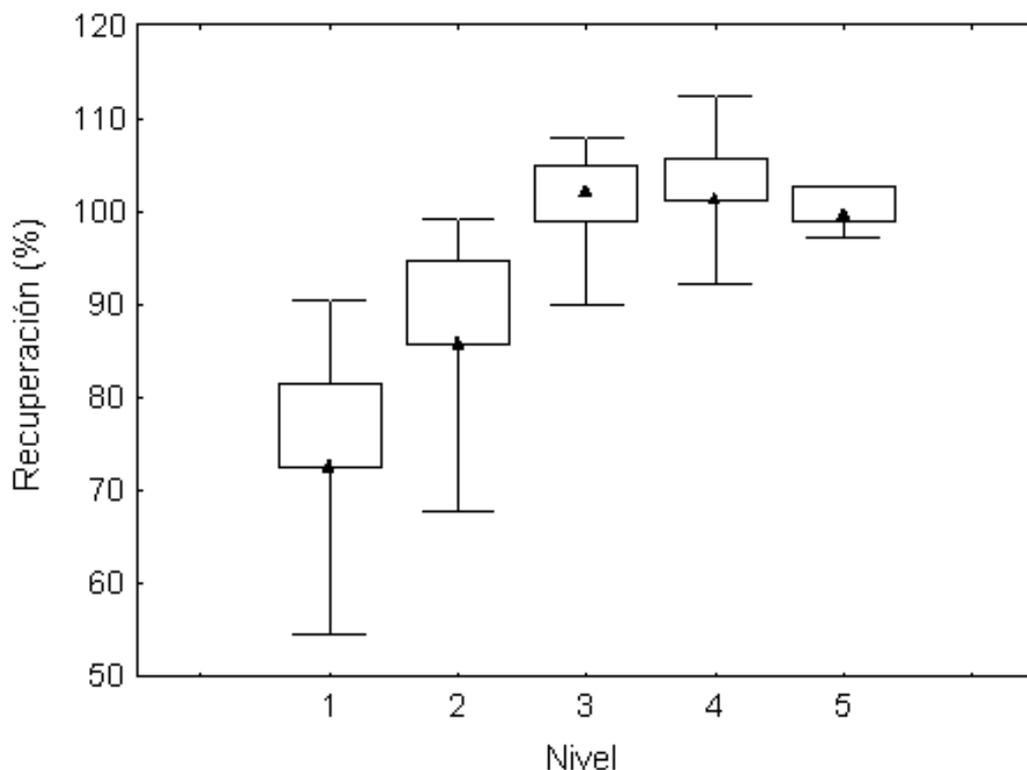


Figura IV.38. Rango de recuperaciones de plomo en cada nivel de adición

Tabla IV. 19. Resultado del ANOVA de las recuperaciones de plomo tras eliminar el primer nivel de adición

| | S^2 | g. l. | | |
|------------|-------|-------|------------|-------|
| Nivel | 273.1 | 3 | F | 4.319 |
| Error puro | 63.2 | 16 | F_{crit} | 4.077 |

Para establecer la exactitud del método se deben considerar sólo los tres últimos niveles de adición. Los valores de recuperación media de estos niveles, así como la recuperación global, y sus incertidumbres expandidas se muestran en la Tabla IV.20. A partir de estos resultados, se deduce que sólo es posible asegurar la exactitud del método a partir del tercer nivel de adición, es decir, las muestras que presenten menos de 30 $\mu\text{g/l}$ de plomo no podrán ser cuantificadas de manera exacta. Si la dilución de la muestra es 2/10, será posible cuantificarla de manera exacta a partir de los 15 $\mu\text{g/l}$.

Tabla IV.20. Recuperaciones de plomo en cada nivel de adición seleccionado y recuperación global, junto con sus incertidumbres expandidas

| Nivel de Adición | Recuperación (%) (R ± U) |
|------------------|-----------------------------|
| 3 | 100 ± 14 |
| 4 | 102 ± 15 |
| 5 | 100 ± 5 |
| Global | 101 ± 7 |

IV.2.2.4.2. Precisión

La precisión del método ha sido evaluada mediante el estudio de la repetitividad y reproducibilidad del mismo. Para llevar a cabo estos estudios se fortificó una muestra de anís con 50 µg/l de patrón de plomo y se empleó esta como muestra de control. La desviación estándar relativa obtenida al determinar el contenido en plomo de esta muestra diez veces arrojó un valor de repetitividad del 3.95 %. La reproducibilidad, obtenida al analizar la muestra de control en condiciones de precisión intermedia, fue del 4.23 %.

IV.2.2.4.3. Calibración, linealidad y sensibilidad

Se ha establecido calibrado externo utilizando patrones entre 2 µg/l y 10 µg/l. En la Tabla IV.21. se presentan los parámetros de dicho calibrado, obtenidos a partir de seis experimentos. La linealidad se calculó, según lo descrito en la Sección IV.2.1.4.3, promediando las linealidades de cada una de las rectas de calibrado. Los límites de detección y cuantificación y la masa característica también se presentan en la Tabla IV.21.

Tabla IV.21. Parámetros de la recta de calibrado, linealidad, límites de detección y cuantificación y masa característica para la determinación de plomo por ET-AAS

| Parámetro | Valor |
|-------------------------|-------------------|
| $b \pm s_b$ | 0.007 ± 0.001 |
| $a \pm s_a$ | 0.000 ± 0.003 |
| r | 0.9993 |
| Linealidad | 97.7 % |
| LOD ($\mu\text{g/l}$) | 0.7 |
| LOQ ($\mu\text{g/l}$) | 2.3 |
| m_0 (pg) | 13.2 ± 0.3 |

Se puede calcular los límites de detección y cuantificación referidos a la muestra teniendo en cuenta la dilución efectuada y los datos de la Tabla IV.21. Para una dilución 1/10 estos límites son 7 y 23 $\mu\text{g/l}$, pudiéndose disminuir a la mitad si se emplea una dilución 2/10. El límite de cuantificación obtenido concuerda perfectamente con la baja recuperación encontrada por debajo de los 30 $\mu\text{g/l}$. El valor de m_0 obtenido es de 13.2 pg, un valor muy parecido al teórico (10 pg), con lo que la sensibilidad del método es prácticamente la misma al diluir con la mezcla ácida de etanol y agua o con patrones acuosos.

IV.2.2.5. Determinación de plomo en anisados

Se han analizado una serie de muestras de anisados para determinar su contenido en plomo. Estas muestras son las mismas que se utilizaron en la determinación de cobre. En este caso no se ha encontrado ninguna muestra que presente valores por encima del límite de detección del método. Aunque no se haya podido cuantificar el contenido en plomo de estas muestras, el método desarrollado tiene validez, en cuanto que permite detectar concentraciones en plomo inferiores al límite legal vigente, establecido en el Real Decreto nº 1424/1988 [32], que es de 1 mg/l.

IV.3. Determinación de anetol en anisados mediante HPLC

IV.3.1. Diseño del método

El anetol se encuentra en los anisados como componente orgánico mayoritario y es el principal responsable del flavor de esta bebida. Por tanto, es un parámetro muy importante en la caracterización de los anisados. La cromatografía de gases es el método habitual para determinar anetol en anisados. Hay que destilar la muestra, y una porción del destilado se analiza por cromatografía gaseosa con detector de ionización de llama, utilizando mentol como patrón interno. En este trabajo, se propone un nuevo procedimiento basado en el uso de la cromatografía líquida, que permite una determinación rápida y sencilla del anetol. La determinación se lleva a cabo directamente en la muestra, con lo que el procedimiento se simplifica considerablemente. De esta forma se reduce el tiempo de análisis y los posibles errores cometidos en la manipulación de la muestra. Teniendo en cuenta los datos existentes en la bibliografía [33], se ha puesto a punto un método de cromatografía en fase reversa con detección por absorción ultravioleta. Se ha utilizado una columna C-18 y una fase móvil metanol-agua (80:20). Ya en la Tabla III.6 se han resumido las condiciones cromatográficas utilizadas. Con estas condiciones se obtuvo un factor de retención (k') para el anetol de 2.4.

El factor de retención se relaciona con la resolución de los picos cromatográficos. Para valores muy bajos se considera que la resolución de los picos no es buena. Valores demasiado altos de este factor implican un tiempo de análisis excesivo. Los valores óptimos de este factor están entre 1 y 10 [34]. En este caso el valor 2.4 está dentro del intervalo óptimo y es suficientemente bajo. El tiempo de retención del anetol en las condiciones de trabajo es de 7.2 minutos.

En cuanto a la selección de la longitud de onda de medida, se realizó a partir de los datos en tres dimensiones obtenidos por el detector de fila de diodos al realizar el cromatograma de un patrón de anetol (Figura IV.39). Se eligió la longitud de onda a la que el patrón presentaba máxima absorbancia (257 nm). Un cromatograma de un patrón de anetol a la longitud de onda seleccionada se puede ver en la Figura IV.40. Se comprobó que esta selección era correcta a partir del espectro obtenido mediante el detector de fila de diodos al tiempo de retención del analito (Figura IV.41a).

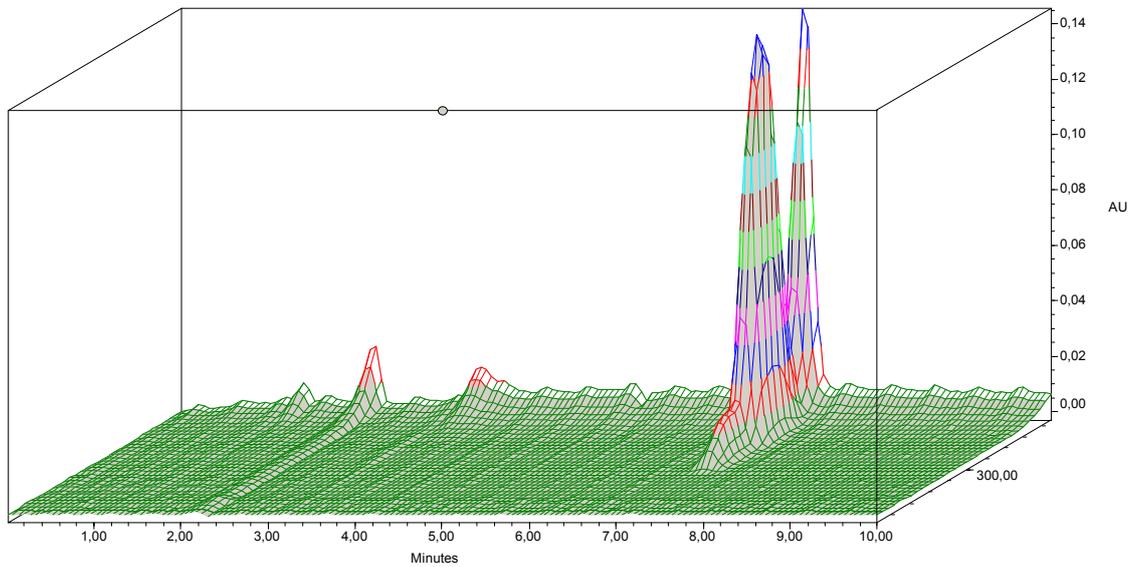


Figura IV.39. Cromatograma 3D de un patrón de anetol.

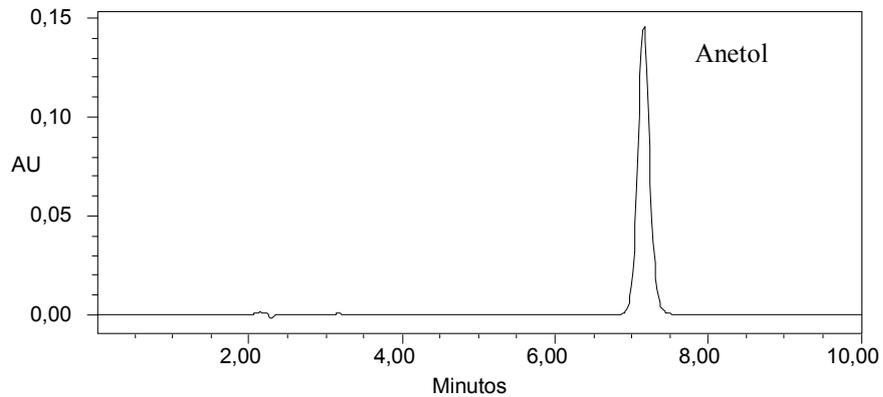


Figura IV.40. Cromatograma de un patrón de 8 mg/l de anetol.
Condiciones cromatográficas Tabla III.6.

La presencia de anetol en las muestras se comprobó comparando los cromatogramas obtenidos para una muestra sin dopar y otra dopada, observando como aumenta el pico asignado al anetol. Un cromatograma obtenido para una muestra se puede ver en la Figura IV.42. Además se compararon los espectros obtenidos para la muestra y el patrón. El espectro del pico asignado al anetol en la muestra se presenta en la Figura IV.41b.

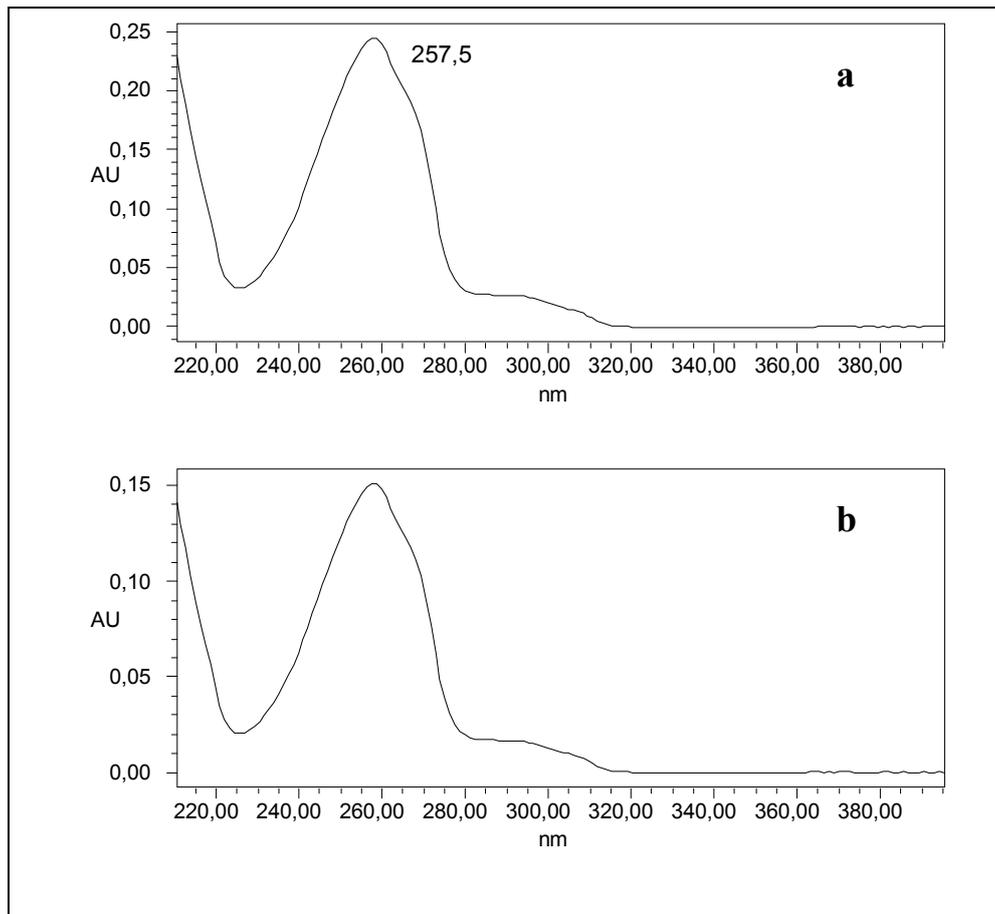


Figura IV.41. Espectro de absorción UV de anetol (a). Espectro de absorción UV correspondiente al pico ($t_R=7.2$ min) para una muestra de anís (b)

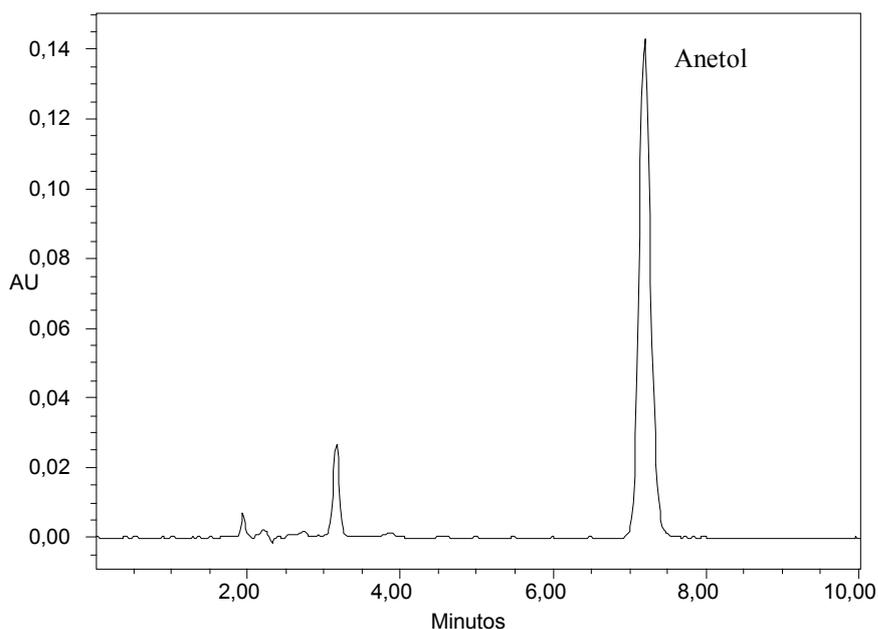


Figura IV.42. Cromatograma de una muestra de anisado. Condiciones cromatográficas Tabla III.6.

La pureza espectral del pico se comprobó superponiendo los espectros obtenidos al comienzo, en el máximo y al final del pico de anetol para una muestra de anís. Como se puede observar en la Figura IV.43, los tres espectros concuerdan bien, con lo que el pico cromatográfico corresponde a un único componente.

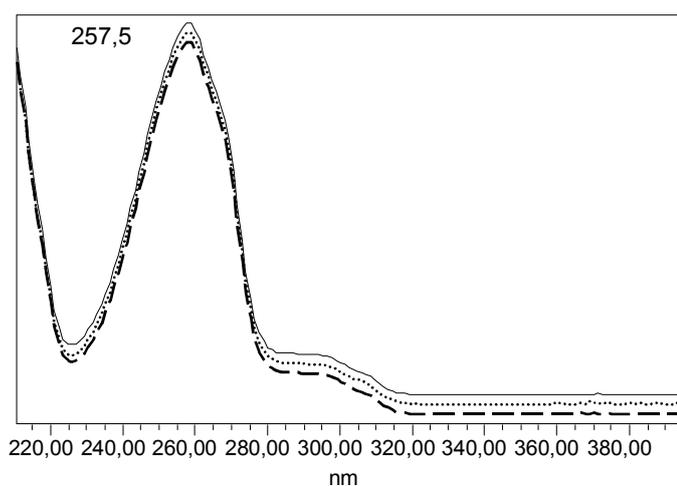


Figura IV.43. Espectros extraídos del pico de anetol de una muestra a 7.13 (línea discontinua), 7.21 (línea continua) y 7.30 (línea de puntos) minutos.

IV.3.1.1. Asimetría y factor de cola

Como ya se ha dicho, estos dos parámetros dan cuenta de la calidad de la forma del pico cromatográfico. Los métodos que llevan a picos simétricos son siempre preferidos a los que no, pues la asimetría del pico puede afectar a los resultados de distintas formas [35]:

- Hace que el número de platos y la resolución de la medida sea inexacta.
- Introduce imprecisión en la cuantificación.
- Disminuye la resolución y hace imposible detectar picos pequeños en la cola.
- Hace poco reproducible la retención.

La asimetría del pico (A_s) se mide a una altura igual al 10% de la altura total del pico cromatográfico según la expresión:

$$A_s = \frac{B}{A} \quad (4.28)$$

siendo B la distancia desde la bisectriz del pico hasta la cola del mismo y A la distancia entre el frente del pico y dicha bisectriz. Se considera que la asimetría de un pico debe estar comprendida entre 1.0 y 1.05 para que sea buena. Hasta valores de 1.2 es aceptable y a partir de éste, inaceptable.

Para el cálculo del factor de cola del pico (PTF) se utiliza la siguiente expresión:

$$PTF = \frac{A+B}{2A} \quad (4.29)$$

Pero en este caso los valores de A y B se miden a una distancia igual al 5% de la altura total del pico. Este factor también debe tener un valor próximo a 1.

En este caso, se obtuvo un valor de 1.04 para la asimetría del pico y un factor de cola de 1.03. Con esto se puede asegurar que la calidad del pico, en cuanto a su forma, es buena.

IV.3.2. Efecto matriz

Para estudiar la presencia de efecto matriz se preparó una recta de calibrado externo y otra de adición patrón sobre una muestra de control. Para la obtención de las rectas de calibrado se representó el área de los picos cromatográficos frente a la concentración de los patrones o las adiciones, respectivamente. Se compararon estadísticamente las pendientes y los resultados del estadístico t se presentan en la Tabla IV.22. Como se puede observar, las pendientes son prácticamente iguales y su cociente no difiere significativamente de la unidad, de lo que podemos concluir que no existe efecto matriz. Por lo tanto, es posible llevar a cabo el análisis de las muestras de anisados empleando un calibrado externo para cuantificar el contenido en anetol. En la Figura IV.44 se puede ver la comparación gráfica de ambas rectas.

Tabla IV.22. Resultado del test t para comprobar el efecto matriz en la determinación de anetol.

| | b | s_b | t_{cal} | $t_{crit}(95\%)$ |
|-------------------|--------|-------|-----------|------------------|
| Calibrado externo | 197910 | 576 | 0.49 | 2.02 |
| Adición patrón | 199159 | 2500 | | |

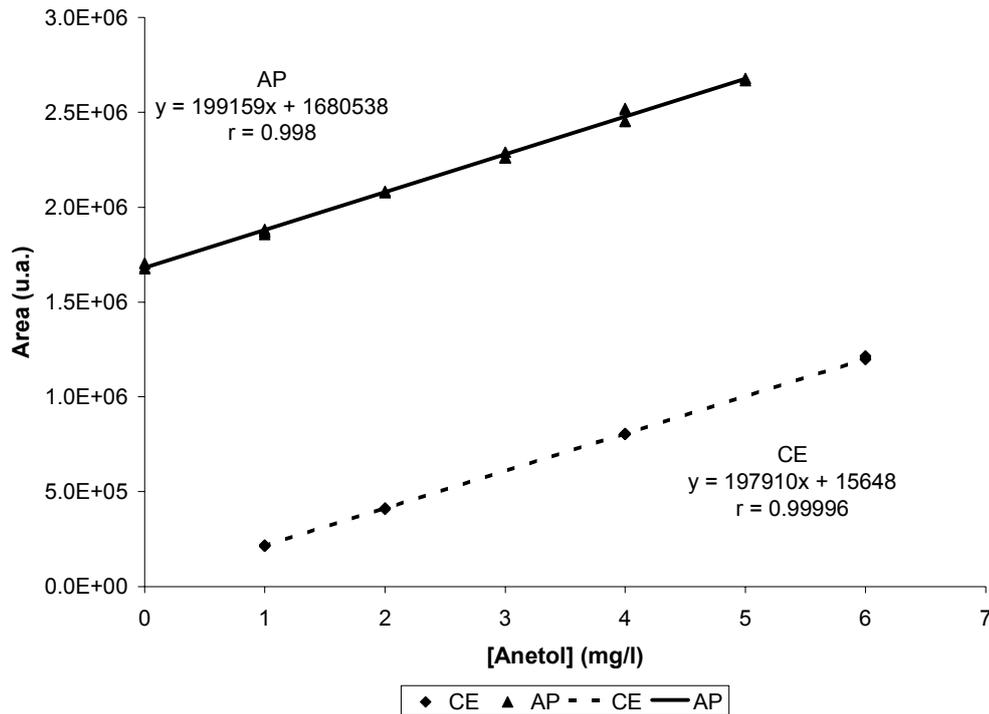


Figura IV.44. Curvas de calibrado externo y de adición patrón para anetol

IV.3.3. Parámetros de calidad del método

IV.3.3.1. Exactitud

La exactitud del método para la determinación de anetol en anisados se ha estudiado mediante ensayos de recuperación. Se realizó un análisis de la varianza de un factor siguiendo el esquema explicado en la sección IV.2.1.4.1. Se analizaron muestras dopadas en cinco niveles de adición (Tabla IV.23), realizando cinco replicas en cada nivel. Se comprobó que no existen errores sistemáticos debidos al cambio de nivel mediante una prueba F de dos colas (Ecuación 4.20).

En la Figura IV.45 se pueden observar los rangos de recuperaciones individuales para cada nivel de adición. Los resultados del ANOVA se presentan en la Tabla IV.24. Como se puede ver en el resultado del análisis el nivel de adición no introduce un sesgo significativo en el resultado global.

Tabla IV.23. Niveles de adición estudiados en el método de determinación de anetol.

| | | | | | |
|------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| Nivel de adición | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Anetol (mg/l) | 125 | 250 | 375 | 500 | 625 |

Tabla IV.24. Resultado del ANOVA de las recuperaciones de anetol

| | S^2 g. l. | | | |
|------------|-------------|----|-------------------|-------|
| Nivel | 30.6 | 4 | F | 1.50 |
| Error puro | 20.4 | 20 | F _{crit} | 3.515 |

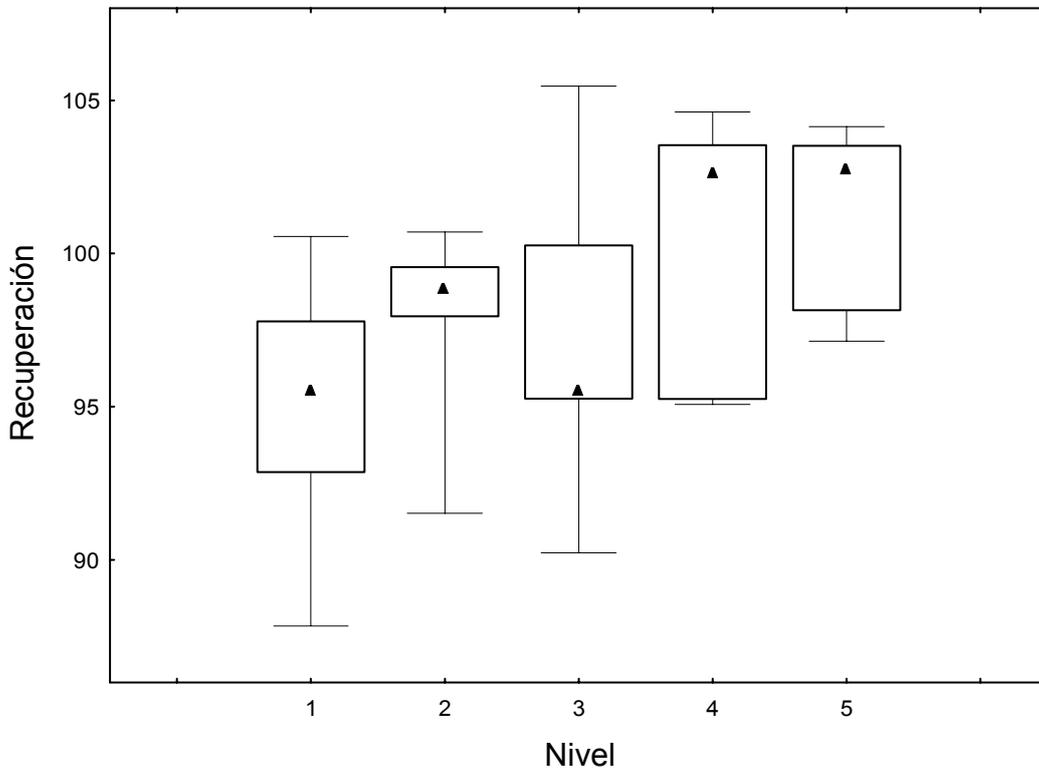


Figura IV.45. Rango de recuperaciones de anetol en cada nivel de adición

Los valores de recuperación obtenidos a cada nivel de adición y la recuperación global, junto con sus incertidumbres expandidas, contienen al 100% (Tabla IV.25), con lo que el método se considera exacto.

Tabla IV.25. Recuperaciones de anetol en cada nivel de adición y recuperación global junto con sus incertidumbres expandidas.

| Nivel de Adición | Recuperación (%) (R ± U) |
|------------------|-----------------------------|
| 1 | 95 ± 10 |
| 2 | 98 ± 7 |
| 3 | 97 ± 12 |
| 4 | 100 ± 9 |
| 5 | 101 ± 6 |
| Global | 98 ± 4 |

IV.3.3.2. Precisión

En el estudio de la precisión del método se observó la repetitividad y reproducibilidad del mismo. En el estudio de repetitividad se analizó una misma muestra diez veces y se calculó la desviación estándar relativa. Se obtuvo un valor de repetitividad del 0.9 %.

Para llevar a cabo el estudio de reproducibilidad se analizó una muestra de control, realizando diez replicados, en días distintos en condiciones de precisión intermedia. El valor de precisión intermedia obtenido, expresado como desviación estándar relativa, fue del 1.6%.

IV.3.3.3. Robustez

En este apartado se ha estudiado la influencia de cuatro factores en la respuesta del método. Se ha visto como afectan pequeñas variaciones en la temperatura de la columna, el porcentaje de metanol en la fase móvil, el flujo de la misma y la longitud de onda empleada en la detección. La evaluación se realiza utilizando el diseño propuesto por Youden [36], según lo explicado en la sección II.4.2. Las variaciones realizadas se muestran en la Tabla IV.26. En ella se recogen los valores máximos y mínimos para cada uno de los factores. La matriz de diseño se presenta en la Tabla IV.27.

Tabla IV.26. Valores máximos y mínimos de los factores considerados en el estudio de robustez.

| Factor | Nivel Máximo | Nivel Mínimo |
|----------------|--------------|--------------|
| T (°C) | 31 | 29 |
| % Metanol | 81 | 79 |
| Flujo (ml/min) | 1.1 | 0.9 |
| λ (nm) | 259 | 255 |

Tabla IV.27. Matriz de diseño empleada en el estudio de robustez del método cromatográfico para la determinación de anetol en anisados.

| N° exp. | Factor | | | | Respuesta |
|---------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | x ₁ | x ₂ | x ₃ | x ₄ | Y |
| 1 | + | + | + | + | Y ₁ |
| 2 | + | + | - | + | Y ₂ |
| 3 | + | - | + | - | Y ₃ |
| 4 | + | - | - | - | Y ₄ |
| 5 | - | + | + | - | Y ₅ |
| 6 | - | + | - | - | Y ₆ |
| 7 | - | - | + | + | Y ₇ |
| 8 | - | - | - | + | Y ₈ |

En cada uno de los experimentos planteados en la Tabla IV.27 se determinó el contenido en anetol de una muestra de control, realizando ocho réplicas de la misma. Los resultados obtenidos para cada uno de los experimentos, junto con su desviación estándar, se muestran en la Tabla IV.28.

Tabla IV.28. Resultados obtenidos para cada experimento.

| Experimento | T ^a (°C) | % metanol | Flujo (ml/min) | l (nm) | Anetol* (g/l) | S _{anetol} (g/l) |
|-------------|---------------------|-----------|----------------|--------|---------------|---------------------------|
| 1 | 31 | 81 | 1.1 | 259 | 1.012 | 0.015 |
| 2 | 31 | 81 | 0.9 | 259 | 1.030 | 0.012 |
| 3 | 31 | 79 | 1.1 | 255 | 1.014 | 0.012 |
| 4 | 31 | 79 | 0.9 | 255 | 1.020 | 0.015 |
| 5 | 29 | 81 | 1.1 | 255 | 1.053 | 0.009 |
| 6 | 29 | 81 | 0.9 | 255 | 1.055 | 0.009 |
| 7 | 29 | 79 | 1.1 | 259 | 1.055 | 0.008 |
| 8 | 29 | 79 | 0.9 | 259 | 1.018 | 0.016 |

*Media de ocho determinaciones

Con estos resultados podemos calcular los contenidos en anetol cuando cada uno de los factores alcanza su valor máximo y mínimo (Tabla IV.29). De esta forma se calcula el valor de t_i experimental según la expresión:

$$t_i = \frac{\sqrt{2}|D_i|}{S_I} \quad (4.30)$$

donde, como ya se dijo en la Sección II.4.2 (Ecuación 2.222), D_i es la diferencia entre las medias de las respuestas cuando el factor i alcanza su valor máximo y mínimo. S_I es la desviación estándar obtenida en condiciones de precisión intermedia. El cálculo de este parámetro se verá más adelante cuando se hable de las características analíticas del método. El valor t_i se compara con el obtenido en las tablas para los grados de libertad de S_I (cinco en este caso) y un 95% de nivel de confianza. Los resultados de esta comparación se presentan en la Tabla IV.29. Como se puede observar, no existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos cuando los factores alcanzan sus valores máximos y mínimos, de lo cual se puede deducir que dichos factores no afectan significativamente a los resultados del método y, por lo tanto, el método es robusto.

Tabla IV.29. Resultados del estadístico t de Student en el ensayo de robustez del método de determinación de anetol mediante HPLC.

| Factor <i>i</i> | $\bar{Y}_{i+} \pm s_{i+}$ (g/l) | $\bar{Y}_{i-} \pm s_{i-}$ (g/l) | t_i | $t_{\text{crit}}(0.05, 5)$ |
|---------------------|---------------------------------|---------------------------------|-------|----------------------------|
| T ^a (°C) | 1.021 ± 0.010 | 1.045 ± 0.019 | 2.03 | 2.57 |
| Flujo (ml/min) | 1.039 ± 0.021 | 1.027 ± 0.018 | 0.97 | 2.57 |
| % Metanol | 1.034 ± 0.023 | 1.032 ± 0.018 | 0.12 | 2.57 |
| λ (nm) | 1.037 ± 0.021 | 1.024 ± 0.019 | 1.06 | 2.57 |

IV.3.3.4. Calibración, linealidad y límites de detección y cuantificación

Se realizó el correspondiente calibrado externo para la determinación de anetol en anisados con patrones desde 1 mg/l a 16 mg/l, representando el área de pico cromatográfico frente a la concentración de los patrones. Los datos de la recta de calibrado (Figura IV.36) se muestran en la Tabla IV.30. Los límites de detección y cuantificación se calcularon sustituyendo en la recta de calibrado el valor de la señal igual a 3 y 10 veces la desviación estándar de la regresión [14]. Se obtuvieron valores de 0.1 mg/l para el límite de detección y 0.4 mg/l para el de cuantificación.

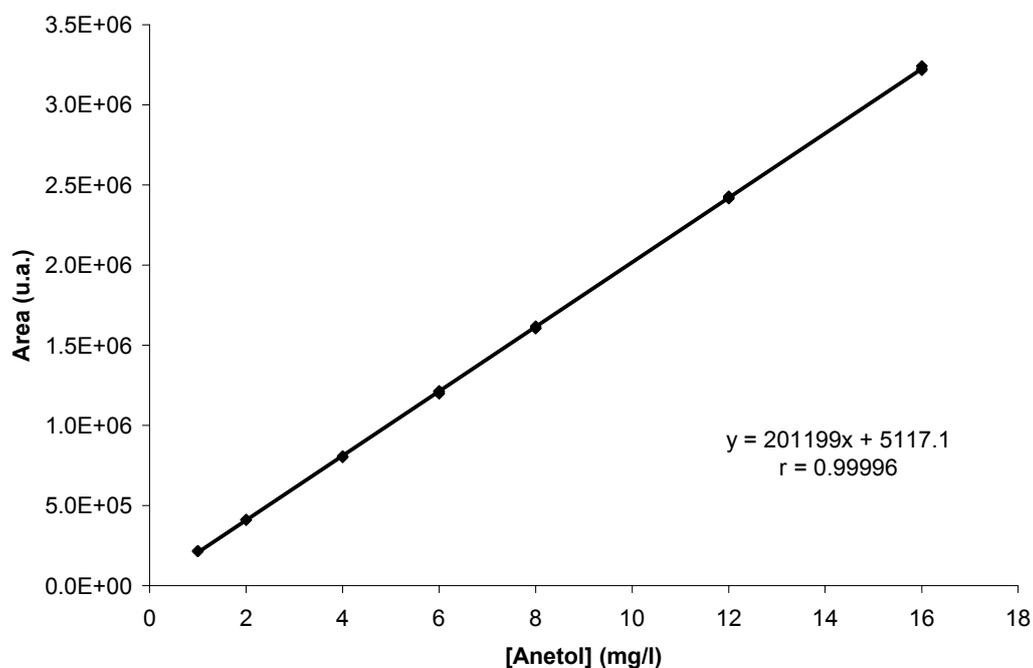


Figura IV.46. Recta de calibrado externo para la determinación de anetol

Tabla IV.30. Parámetros de la recta de calibrado y límites de detección y cuantificación para la determinación de anetol.

| Parámetro | Valor |
|-------------|------------------|
| $b \pm s_b$ | 201200 ± 300 |
| $a \pm s_a$ | 5000 ± 2000 |
| r | 0.9999 |
| LOD | 0.1 mg/l |
| LOQ | 0.4 mg/l |

La linealidad del método se estudió gráficamente. Se representó el área media obtenida para cada patrón, dividida de la concentración del mismo, frente a su concentración. Se define como rango lineal aquél en el que los valores de señal/concentración se mantienen entre un 95-105% del valor de la mediana de estos valores [37]. Como se puede ver en la Figura IV.47, en este caso, el rango lineal va desde 2 mg/l hasta 16 mg/l. Aunque tenemos un límite de cuantificación de 0.4 mg/l, los valores obtenidos para las muestras que estén por debajo de 2 mg/l no podrán ser cuantificados, con lo que tendríamos que diluir menos la muestra en cuestión. Este rango lineal podría extenderse más hacia valores más altos de concentración, pero debido al contenido encontrado en las muestras, no es necesario extender más el rango de concentraciones.

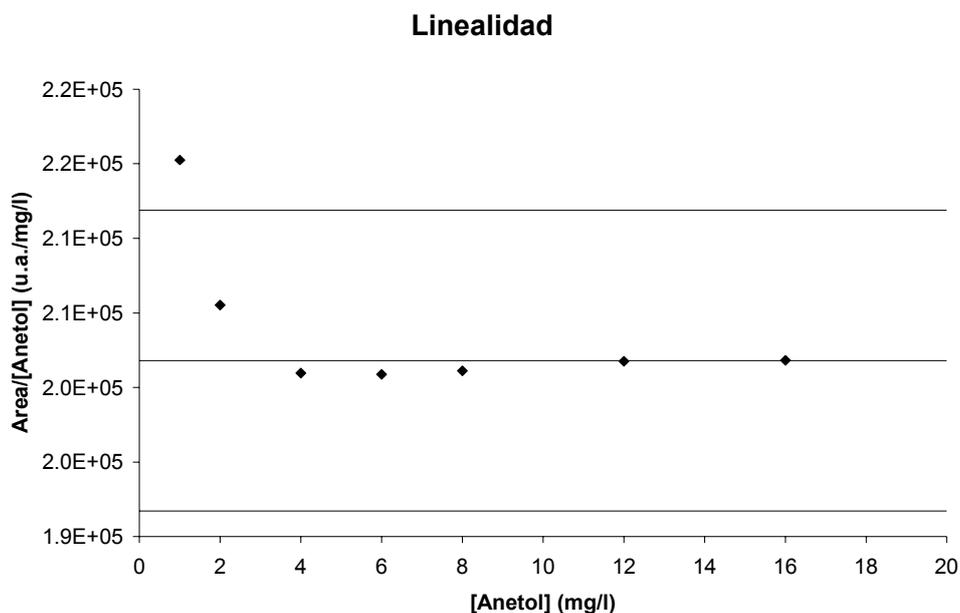


Figura IV.47. Rango lineal hallado para el anetol

IV.3.4. Determinación de anetol en anisados

Para comprobar la aplicabilidad del método propuesto se ha determinado el contenido en anetol de una serie de muestras comerciales de distintas marcas. Las muestras se diluyeron en metanol de modo que los contenidos encontrados en la muestra diluida quedasen incluidos en el rango lineal del calibrado. Los análisis se realizaron por triplicado. En la Tabla IV.31 se muestran los resultados obtenidos.

El contenido medio en anetol de todos los anises analizados está alrededor de 1 g/l. El mayor contenido se encontró para la muestra de anís de Rute (4R), con un contenido de 4.04 g/l. El menor valor se encontró para la muestra de Almendralejo (21A1) con un contenido de 0.125 g/l.

Tabla IV.31. Contenido en anetol (g/l) de las muestras de anisados analizadas

| Código | Anetol | Código | Anetol |
|--------|----------|--------|-----------|
| 1C | 0.475(2) | 14U | 0.476(8) |
| 2C | 1.470(5) | 15DM | 1.675(8) |
| 3C | 0.841(2) | 16V | 2.421(7) |
| 4R | 4.04(8) | 17V | 0.82(1) |
| 5R | 0.38(1) | 18Cr | 1.79(3) |
| 6Ch | 0.755(4) | 19Z | 1.532(8) |
| 7Ch | 0.398(2) | 20Ag | 0.176(2) |
| 8Ch | 0.358(3) | 21Al | 0.125(1) |
| 9Cs | 0.181(2) | 22B | 1.04(2) |
| 10E | 2.69(3) | 23B | 0.847(7) |
| 11E | 0.582(9) | 24T | 0.531(6) |
| 12Ca | 0.89(1) | 25S | 0.1877(3) |
| 13Ca | 1.26(2) | 26Zi | 0.278(3) |

Valor entre paréntesis: error asociado a la última cifra significativa

IV.4. Diferenciación de denominaciones de origen de anisados según su perfil metálico

Como ya se indicó en el apartado III.1.3.1., entre las muestras de anís analizadas mediante ICP-AES hay 36 con denominación de origen reconocida [38]. Usando su perfil metálico, se ha llevado a cabo un estudio para diferenciar dichas denominaciones y, posteriormente, establecer las reglas de clasificación que discriminan dichas muestras. De los datos expuestos en la Tabla IV.9, se utiliza el contenido mineral de las muestras 1C a 36Ch, ambas inclusive. Se considerarán tres clases, Cazalla (C), Chinchón (Ch) y Rute (R).

Atendiendo al contenido metálico de estas 36 muestras se observa, en la Tabla IV.9, que el metal que presenta mayores contenidos es el sodio, con valores dentro del intervalo 1.3-64.5 mg/l. Calcio, magnesio y silicio presentan valores intermedios, entre 0.012 y 3.35 mg/l. Los elementos que se presentan en menor proporción son zinc, boro e hierro, con contenidos inferiores a 0.113 mg/ml. Por otro lado, sodio, magnesio, calcio y silicio parecen tener diferentes contenidos dependiendo del tipo de muestra. Todo esto se puede observar en los diagramas de caja de las Figuras IV.48-54, donde se representan el rango de los contenidos en cada uno de estos elementos para cada denominación de origen, su mediana y el rango intercuartil. Se han calculado los contenidos medios de estos cuatro elementos, junto con su desviación estándar, para cada clase de muestra (Tabla IV.32). Tras aplicar el test t de Student (Tabla IV.33) [14], se concluye que los contenidos medios para esos elementos son estadísticamente diferentes para las tres denominaciones de origen de anís.

Tabla IV.32. Contenido medio (mg/l) de Na, Mg, Ca y Si para los tres tipos de anises analizados

| Clase | Na | Mg | Ca | Si |
|-------|-------------|-------------|-----------|-------------|
| C | 40 ± 13 | 0.4 ± 0.2 | 1.0 ± 0.4 | 2.4 ± 0.6 |
| R | 17.1 ± 0.9 | 2.2 ± 0.1 | 2.9 ± 0.2 | 0.19 ± 0.01 |
| Ch | 1.61 ± 0.16 | 0.03 ± 0.01 | 0.6 ± 0.2 | 0.29 ± 0.06 |

Tabla IV.33. Pruebas de significación para comparar las concentraciones medias de sodio, magnesio, calcio y silicio de las muestras de las tres denominaciones de origen

| Cazalla-Rute | F_{exp} | F_{crit} | t_{exp} | t_{crit} |
|------------------|-----------|------------|-----------|------------|
| Na | 184.829 | 6.314 | 8.26 | 2.07 |
| Mg | 2.650 | 6.314 | 24.50 | 2.06 |
| Ca | 5.648 | 6.314 | 12.17 | 2.06 |
| Si | 1861.584 | 6.314 | 17.64 | 2.07 |
| Cazalla-Chinchón | F_{exp} | F_{crit} | t_{exp} | t_{crit} |
| Na | 6920.746 | 4.452 | 13.95 | 2.08 |
| Mg | 244.312 | 4.452 | 9.71 | 2,08 |
| Ca | 3.434 | 4.452 | 3.09 | 2.05 |
| Si | 92.271 | 4.452 | 16.56 | 2.07 |
| Chinchón-Rute | F_{exp} | F_{crit} | t_{exp} | t_{crit} |
| Na | 37.444 | 5.285 | 39.45 | 2.57 |
| Mg | 92.202 | 5.285 | 50.31 | 2.57 |
| Ca | 0.608 | 5.285 | 23.62 | 2.18 |
| Si | 0.050 | 5.285 | 4.16 | 2.18 |

Para confirmar las diferencias entre los tres tipos de muestra, se realiza un estudio quimiométrico de los datos. Se prepara una matriz de datos con 7 columnas, una por cada elemento analizado, y 36 filas, correspondientes a cada una de las muestras. Inicialmente se aplica un método de visualización de datos, el análisis de componentes principales (PCA), para confirmar la tendencia de estos. Después, se aplicará una técnica de reconocimiento de patrones, como el análisis cluster (CA), para establecer relaciones de pertenencia de los casos a las tres categorías citadas y observar las posibles agrupaciones naturales de las muestras. Se aplicará el análisis discriminante lineal y SIMCA para establecer las reglas de agrupación de estos casos. Todos los cálculos quimiométricos se han llevado a cabo usando el programa informático STATISTICA 5.5 de StatsoftTM (Tulsa, OK, USA), excepto el SIMCA, que se ha llevado a cabo mediante el programa específico SIMCA P de Umetrics.

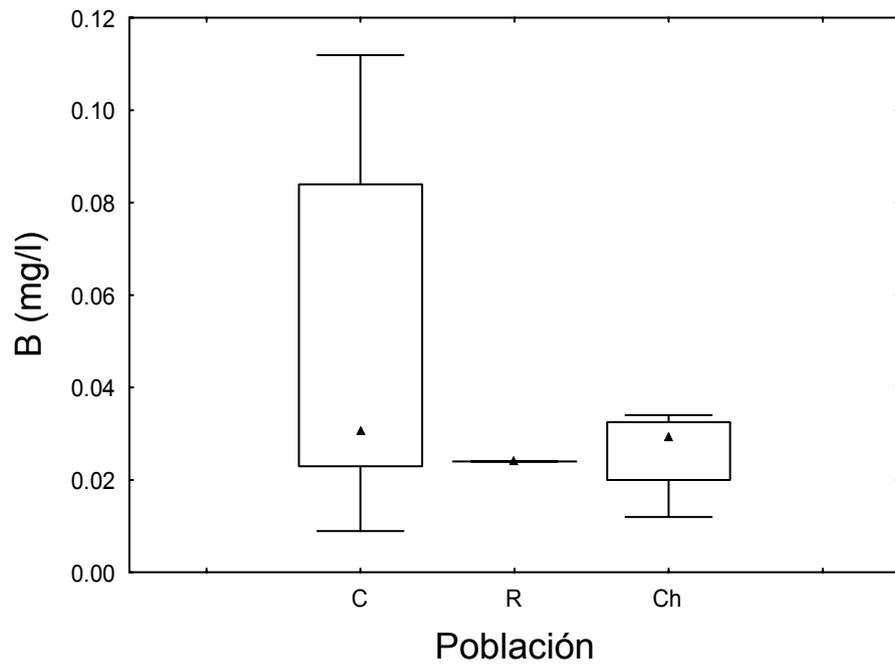


Figura IV.48. Rango de concentraciones de boro para las tres denominaciones de origen

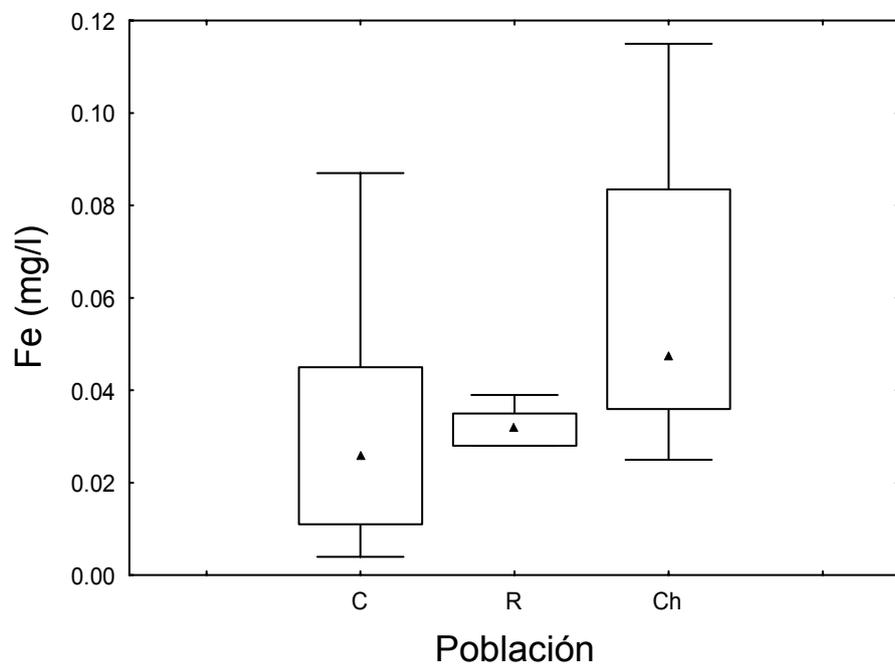


Figura IV.49. Rango de concentraciones de hierro para las tres denominaciones de origen

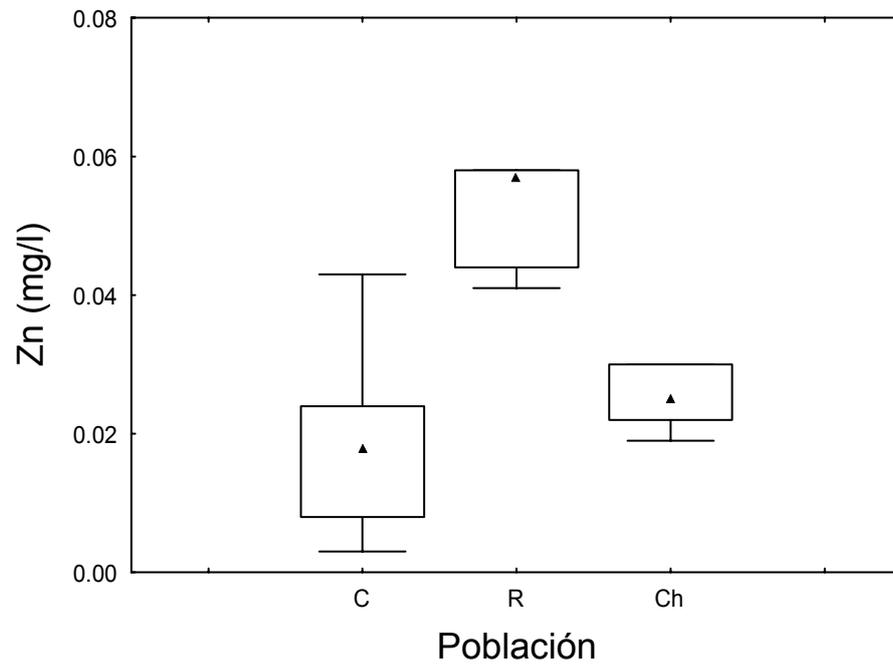


Figura IV.50. Rango de concentraciones de zinc para las tres denominaciones de origen.

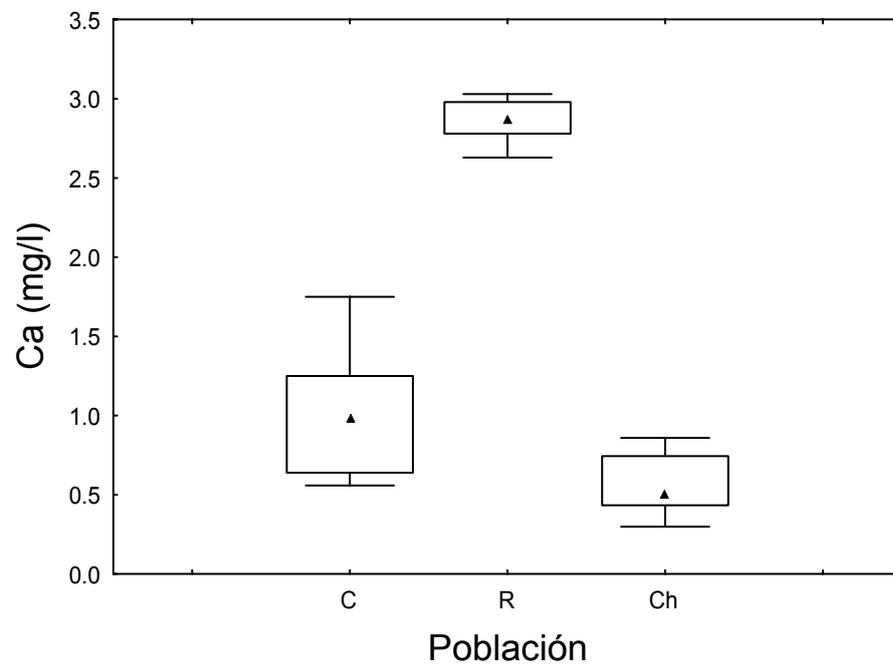


Figura IV.51. Rango de concentraciones de calcio para las tres denominaciones de origen.

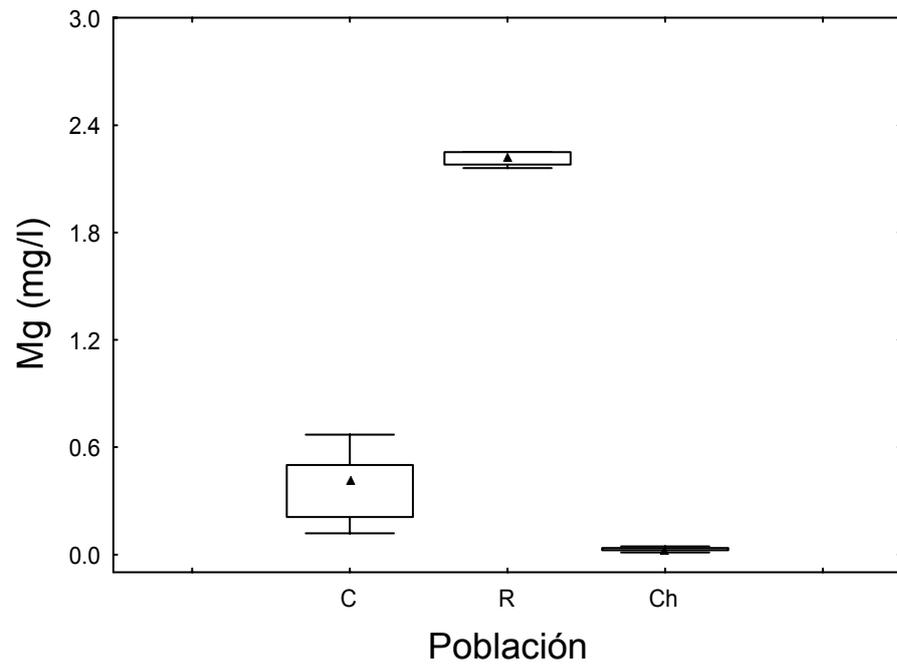


Figura IV.52. Rango de concentraciones de magnesio para las tres denominaciones de origen.

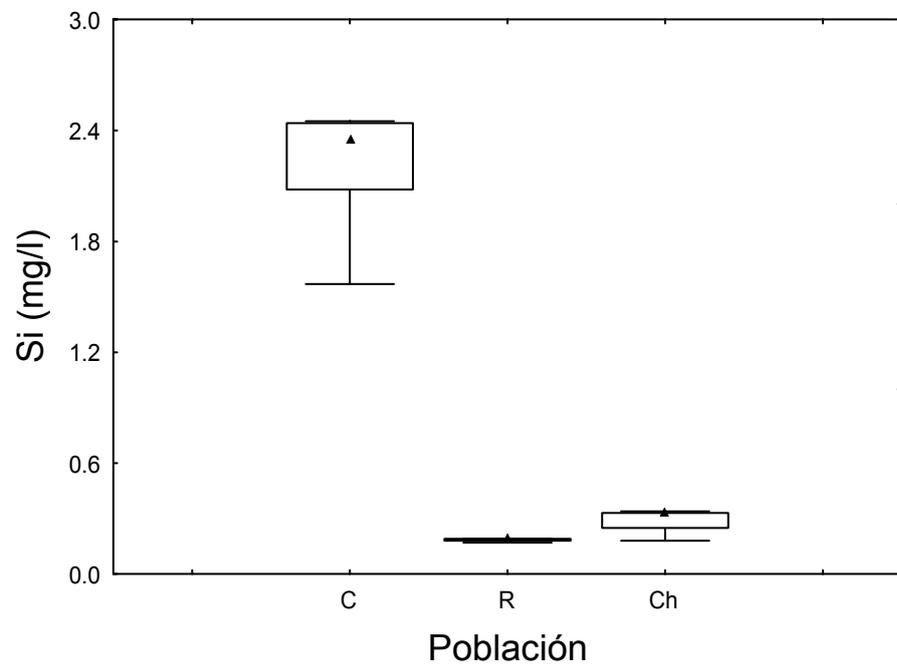


Figura IV.53. Rango de concentraciones de silicio para las tres denominaciones de origen.

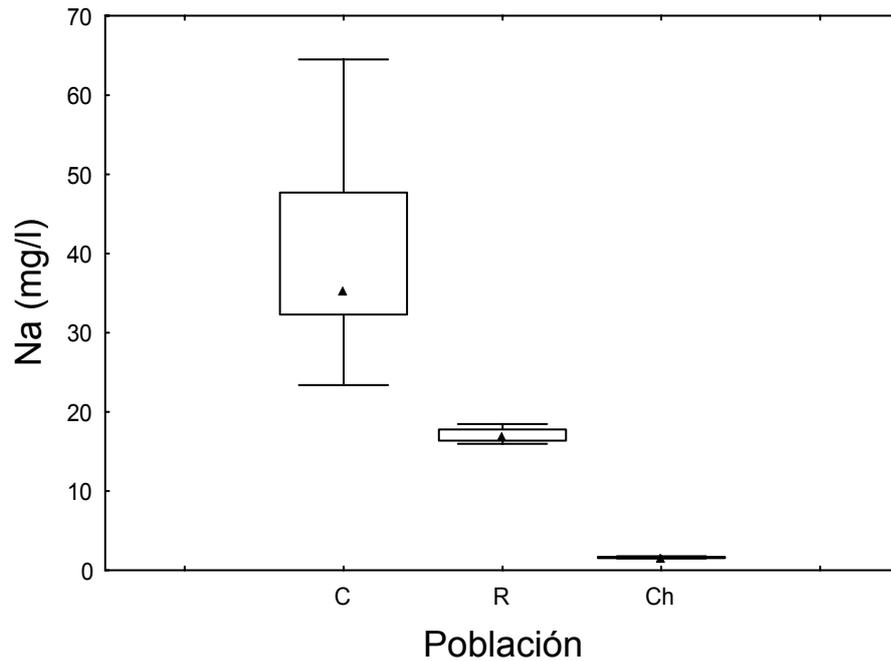


Figura IV.54. Rango de concentraciones de sodio para las tres denominaciones de origen.

IV.4.1. Visualización de los datos mediante PCA

Después de aplicar el PCA a la matriz de datos, utilizando como variables el contenido de los elementos mayoritarios, se han obtenido los tres primeros componentes principales (Ecuaciones 4.31-33), que explican el 99% de la varianza de los datos originales. Los dos primeros explican el 97% de la misma, el PC1 un 59% y el PC2 un 38%. Atendiendo al peso de las variables originales en el primer componente principal, las que mayor poder discriminante tienen son silicio, magnesio y calcio. La distribución de las muestras de anisados según su denominación de origen (C, R, Ch) en el espacio definido por los tres primeros PCs se puede ver en la Figura IV.55.

$$PC1 = 0.34|Mg| + 0.32|Ca| - 0.28|Na| - 0.36|Si| \quad (4.30)$$

$$PC2 = -0.37|Mg| - 0.42|Ca| - 0.48|Na| - 0.34|Si| \quad (4.31)$$

$$PC3 = 2.50|Mg| - 2.33|Ca| - 0.22|Na| + 0.51|Si| \quad (4.32)$$

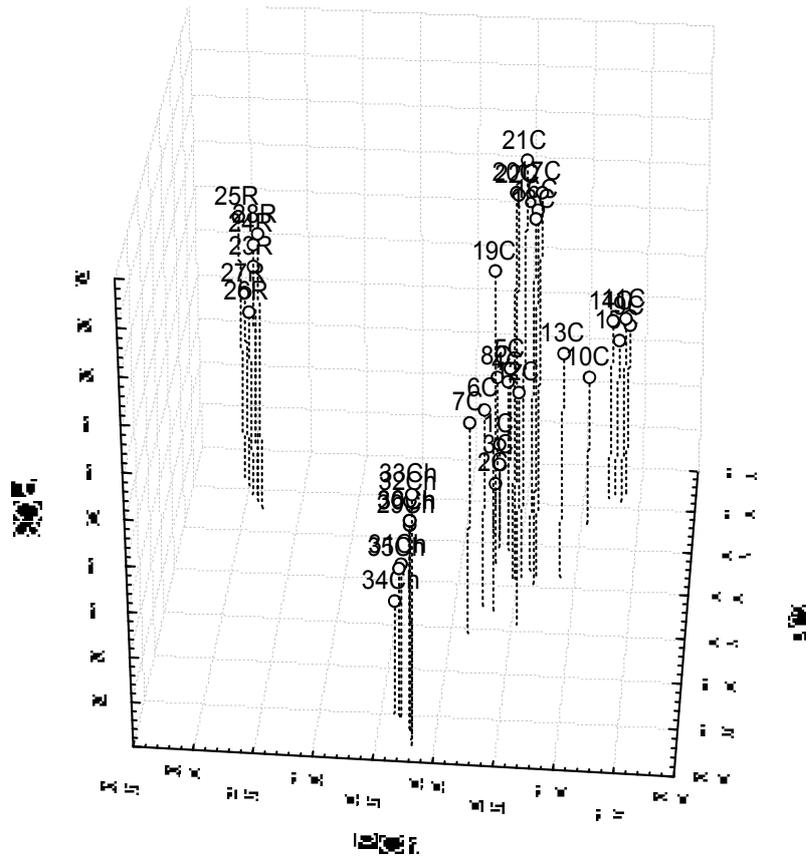


Figura IV.55. Distribución de muestras de anisados según su denominación de origen (C, R, Ch) en el espacio definido por los tres primeros PCs.

Al representar las coordenadas de las muestras en el espacio creado por los tres primeros PCs, se pueden observar las tres denominaciones de origen separadas entre sí. Esta separación ya es clara si consideramos tan sólo los dos primeros componentes principales (Figura IV.56).

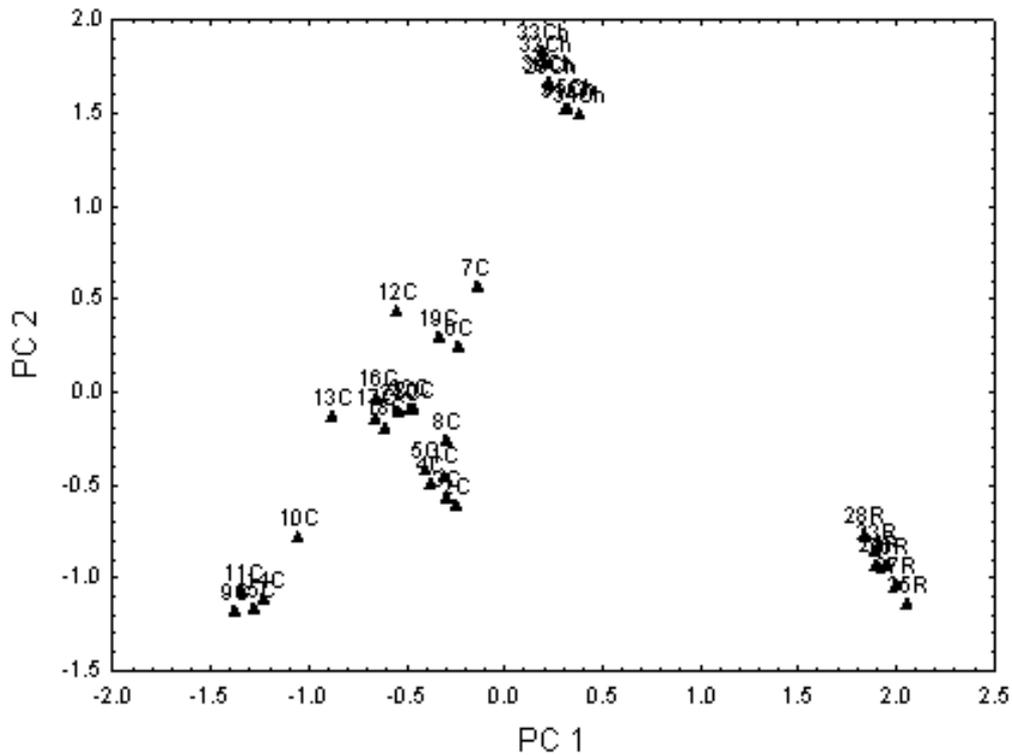


Figura IV.56. Distribución de muestras de anisados según su denominación de origen (C, R, Ch) en el plano definido por los dos primeros PCs.

IV.4.2. Análisis cluster

Para evaluar la tendencia observada en el apartado anterior se realiza el análisis cluster jerárquico aglomerativo de las muestras. De acuerdo con lo encontrado en el PCA, el contenido en silicio es uno de los descriptores con mayor contribución a la discriminación entre muestras. Al atender a la matriz de correlación (Tabla IV.34) entre las variables empleadas en el PCA, se puede observar que los contenidos en magnesio y calcio presentan un factor de correlación de 0.91, con lo que las dos variables proporcionan la misma información. Puesto que la contribución del magnesio al primer componente principal es mayor que la del calcio, no se utiliza el contenido en este último elemento para el análisis cluster.

Tabla IV.34. Matriz de correlación de los contenidos en Mg, Ca, Na y Si de las muestras de anisados con denominación de origen

| Elemento | Mg | Ca | Na | Si |
|----------|--------|--------|--------|--------|
| Mg | 1.00 | 0.91 | - 0.14 | 0.38 |
| Ca | 0.91 | 1.00 | 0.04 | - 0.30 |
| Na | - 0.14 | - 0.04 | 1.00 | 0.91 |
| Si | - 0.38 | - 0.30 | 0.91 | 1.00 |

Por lo tanto, se aplica el análisis cluster utilizando el contenido en silicio y magnesio como variables. Utilizando la distancia Euclídea como medida de la similitud y el método de Ward como regla de amalgamación. El dendrograma obtenido se presenta en la Figura IV.57.

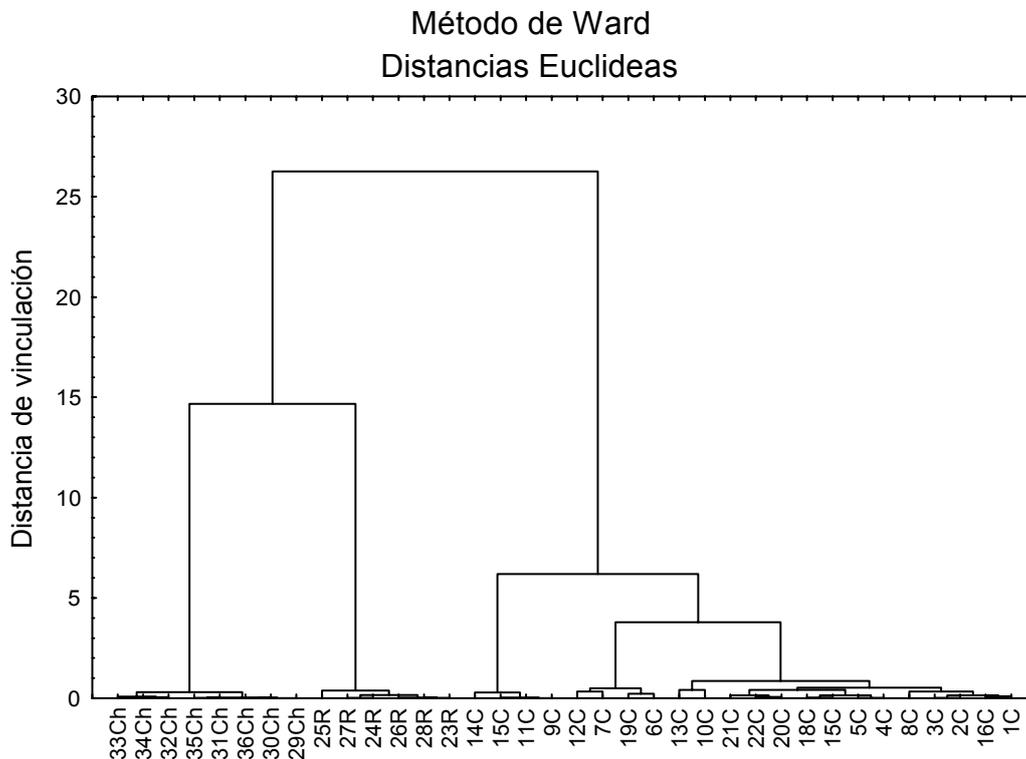


Figura IV.57. Dendrograma obtenido al aplicar CA a los contenidos en Mg y Si.

Como se puede observar, inicialmente aparecen dos clusters. Uno de ellos se divide en otros dos, que contienen, cada uno, las muestras de Chinchón y Rute. El otro contiene las muestras procedentes de Cazalla. A partir de una distancia umbral de 14, se aprecian los tres clusters correspondientes a cada denominación de origen, Cazalla, Rute y Chinchón.

IV.4.3. Análisis discriminante lineal

Puesto que conocemos *a priori* la pertenencia de cada muestra a su clase y hemos comprobado mediante análisis cluster que se puede observar una separación natural entre las mismas, es posible aplicar métodos de reconocimiento de patrones supervisados, como el LDA. En este caso se establecen tres clases, que corresponden a las tres denominaciones de origen, Cazalla (C), Rute (R) y Chinchón (Ch). Se llevó a cabo el análisis discriminante lineal por pasos, eliminando en cada paso las variables con menor poder discriminante. Tras aplicar LDA a la matriz de datos, se obtuvieron dos funciones discriminantes (Ecuaciones 4.34-35). En la Figura IV.58 puede observarse la distribución de las muestras de cada clase en el plano formado por las dos funciones discriminantes extraídas. Las tres clases aparecen diferenciadas. La capacidad de reconocimiento de este modelo, de acuerdo con la probabilidad *a posteriori* fue del 100%. La capacidad de predicción, calculada mediante el método de *leave-one-out*, fue también del 100%. Aunque, aparentemente, la clasificación es perfecta, es posible que se presenten casos de falsos positivos o falsos negativos. Para poder detectarlos es preciso llevar a cabo el estudio de los datos con un método de modelado suave.

$$FD1 = 1.76|Mg| + 2.64|Na| - 2.04|Si| \quad (4.34)$$

$$FD2 = 0.20|Mg| + 0.15|Na| + 0.89|Si| \quad (4.35)$$

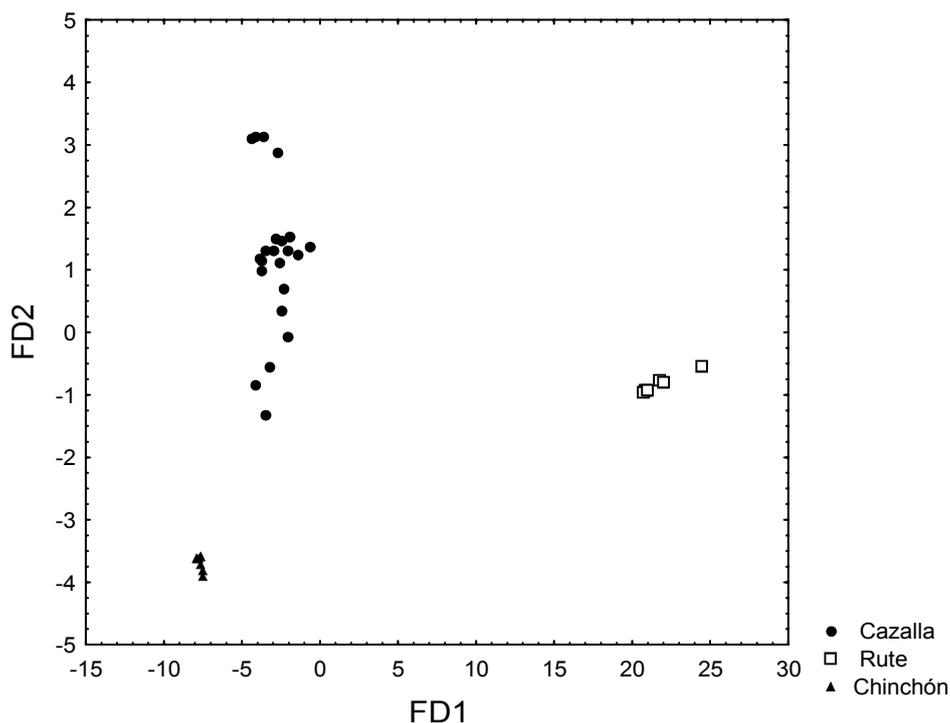


Figura IV.58. Distribución de las muestras de anisados según sus denominaciones de origen en el plano definido por las dos funciones discriminantes.

IV.4.4. Modelado suave independiente por analogía de clases

A partir de los resultados obtenidos para las treinta y seis muestras de anisados con denominación de origen se llevan a cabo los cálculos de SIMCA, realizando un análisis en componentes principales dentro de cada clase. Con esto se construyen los modelos matemáticos que definen a cada clase y se puede comprobar si la clasificación de las muestras empleadas en el entrenamiento es correcta. La distancia perpendicular de cualquier objeto al hiperplano definido por los dos primeros componentes principales se usan para clasificar los casos, detectando falsos positivos y falsos negativos.

Para validar el proceso de clasificación, definimos la sensibilidad (SENS) de una clase como el número de objetos pertenecientes a ésta correctamente clasificados en la misma, y la especificidad (SPEC) como el número de objetos que no pertenecen a ella y se han considerado dentro de otra clase [39] Estas características pueden transformarse fácilmente al número de falsos positivos (FP) y falsos negativos (FN) a partir de las siguientes expresiones.

Dada una clase ideal A:

$$\%FN = 100 \left(1 - \frac{\langle n_A \rangle}{n_A} \right) \quad (4.36)$$

$$\%FP = 100 \left(1 - \frac{\langle n'_A \rangle}{n'_A} \right) \quad (4.37)$$

donde n_A es el número de objetos pertenecientes a la clase A, n'_A es el número de objetos que no pertenecen a la clase A, $\langle n_A \rangle$ es el número de objetos pertenecientes a la clase A correctamente clasificados en la misma y $\langle n'_A \rangle$ es el número de objetos que no pertenecen a la clase A y fueron clasificados como no A.

De acuerdo con esto se estudió el porcentaje de falsos positivos y falsos negativos para cada una de las clases. Tan sólo la clase Cazalla presenta falsos negativos, siendo el porcentaje de FN del 4.5%. Este comportamiento puede visualizarse empleando el gráfico de Coomans, en el que se representan los objetos en función a la distancia a dos de las clases consideradas en el análisis (Figuras IV.59-60). Al ver la Figura IV.59 cabría pensar que la clase Chinchón puede presentar falsos positivos, pero eso se descarta con en el diagrama de la Figura IV.60, en la que se representan las distancias a las clases Chinchón-Rute.

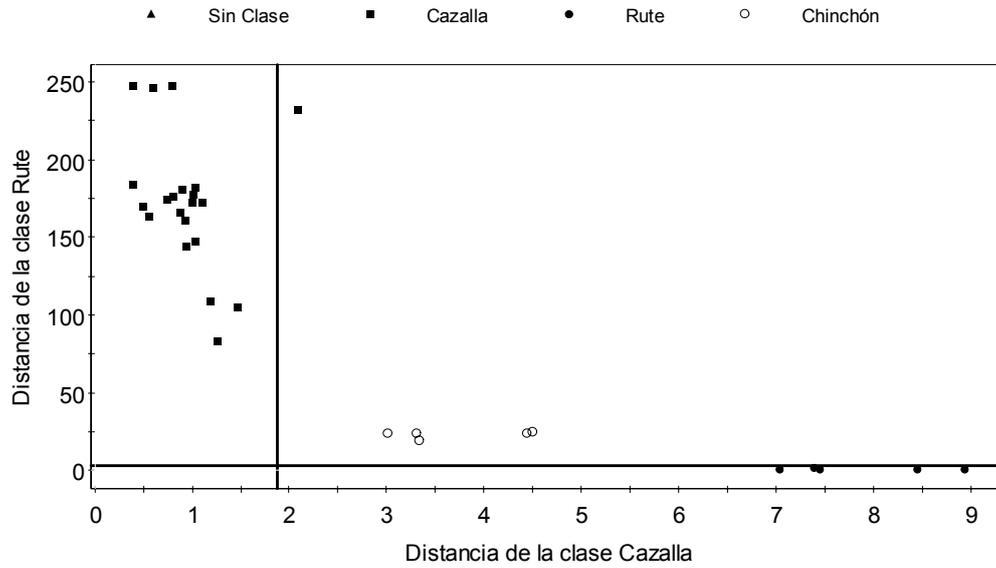
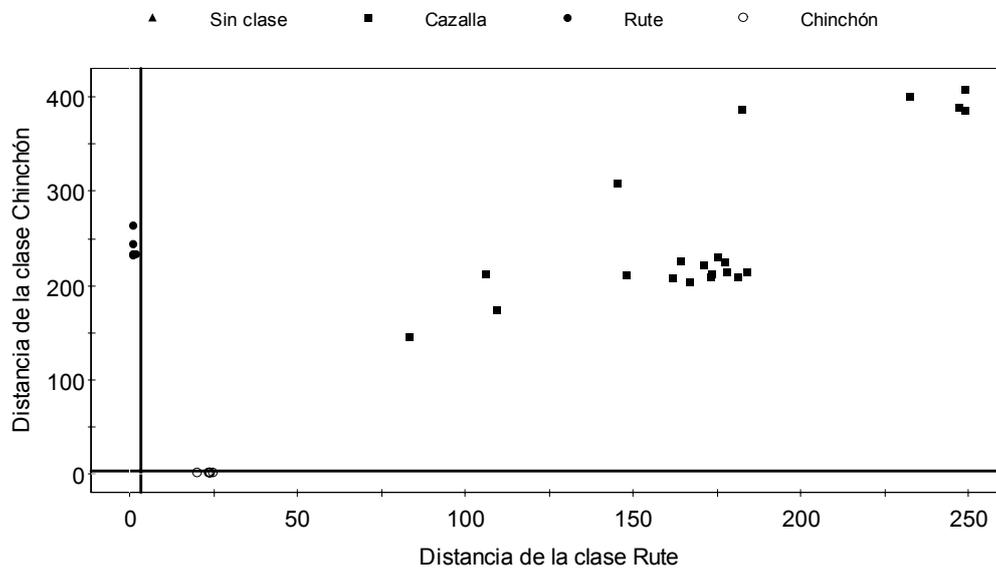


Figura IV.59. Diagrama de Coomans en el que se representan los casos en función a la distancia a las clases Cazalla y Rute.



IV.5. Bibliografía

1. A. G. González, M. A. Herrador, A. G. Asuero. Intra-laboratory testing of method accuracy from recovery assays. *Talanta*, **1999**, 48, 729-736.
2. A. Maroto, R. Boqué, J. Riu, R. X. Rius. Measurement uncertainty in analytical methods in which trueness is assessed from recovery assays. *Analytica Chimica Acta*, **2001**, 440, 171-184.
3. Statsoft, STATISITICA for Windows, Computer Program Manual, Tulsa, OK, **1999**, <http://www.statsoft.com>.
4. D. L. Massart, B. G. M. Vandeginste, L. M. C. Buydens, S. de Jong, P. J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke. Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A, Elsevier, Amsterdam, **1997**.
5. AOAC Official Methods Program Manual, Part 6: Guidelines for Collaborative Study, <http://www.aoac.org/vmeth/omamannual/omamannual.html>.
6. W. G. Cochran. The distribution of the largest of a set of estimated variances as a fraction of their total. *Annals of Eugenics*, **1941**, 11, 47-61.
7. F. Grubbs. Procedures for detecting outlying observations in samples. *Technometrics*, **1969**, 11, 1-21.
8. J. A. Rafter, M. L. Abell, J. P. Braselton. Multiple comparison methods for means. *SIAM Review*, **2002**, 44, 259-278.
9. EURACHEM/CITAC Guide, Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, second ed., **2000**.
10. R. Compañó, A. Rios. Garantía de la calidad en los laboratorios analíticos, Editorial Síntesis, Madrid, **2002**.
11. M. Thompson. Regression Methods in the Comparison of Accuracy. *Analyst*, **1982**, 107, 1169-1180.
12. NIST/SEMATECH e-Handbook of Statistical Methods, <http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/>, 28/10/2002
13. L. Cuadros, A. M. García, J. M. Bosque. Statistical estimation of linear calibration range. *Analytical Letters*, **1996**, 29, 1231-1239.
14. J.N. Miller and J.C. Miller, Statistics and chemometrics for analytical chemistry, 4^a ed., **2000**, Prentice Hall, London.

15. J. Inczédy, T. Lengyel, A. M. Ure. Compendium of analytical nomenclature. Definitive rules. Section 18.4.3.7 Detection and quantification capabilities, 3rd Edition, **1997**, IUPAC, www.iupac.org.
16. A. A. Almeida, M. L. Bastos, M. I. Cardoso, M. A. Ferreira, J. L. F. C. Lima. Determination of lead and aluminium in Port wine by electrothermal atomic absorption spectrometry, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **1992**, 7, 1281-1285.
17. A. A. Almeida, M. I. Cardoso, J. L. F. C. Lima. Determination of copper in Port wine and Madeira wine by electrothermal atomization atomic absorption spectrometry, *Atomic Spectroscopy*, **1994**, 15, 73-77.
18. A. M. Cameán, I. Moreno, M. López-Artiguez, M. Reppeto, A. G. González. Differentiation of Spanish brandies according to their metal content, *Talanta*, **2001**, 54, 53-59.
19. C.-H. Chung. Atomization mechanism with Arrhenius plots taking the dissipation function into account in graphite furnace atomic absorption spectrometry, *Analytical Chemistry*, **1984**, 56, 2714-2720.
20. M. Wang, A. Z. Yuzefovsky, R. G. Michel. Determination of ultratrace amounts of copper and cadmium in seawater by graphite furnace atomic absorption spectrometry with flow-injection semi on-line preconcentration, *Microchemical Journal*, **1993**, 48, 326-342.
21. J. E. Tahán, V. A. Granadillo, R. A. Romero. Electrothermal atomic absorption spectrometric determination of Al, Cu, Fe, Pb, V and Zn in clinical samples and in certified environmental reference materials, *Analytica Chimica Acta*, **1994**, 295, 187-197.
22. B. Welz, G. Schelemmer, J. R. Mudakavit. Palladium nitrate – magnesium nitrate modifier for graphite furnace atomic absorption spectrometry. Part 2. Determination of arsenic, cadmium, copper, manganese, lead, antimony, selenium and thallium in water, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **1988**, 3, 695-701.
23. P. Bermejo-Barrera, A. Moreda-Piñeiro, J. Moreda-Piñeiro, A. Bermejo-Barrera. Copper determination in cocaine and heroin by electrothermal atomic absorption spectrometry using palladium-magnesium nitrate and nitric acid as chemical modifiers, *Analytica Chimica Acta*, **1995**, 14, 201-209.

24. Analytical techniques for graphite furnace AAS. Perkin-Elmer. January, **1984**, Bodenseewerck Perkin-Elmer GmbH, Veberlingen, F. R. G.
25. T. A. M. Ure, L. R. P. Butler, B. V. L'vov, I. Rubeska, R. Sturgeon. Nomenclature, symbols, units and their usage in spectrochemical analysis - XII. Terms related to electrothermal atomization (IUPAC Recommendations, 1992), *Pure and Applied Chemistry*, **1992**, 64, 253-259.
26. B. L. L'vov, G. N. Ryabchuk. A new approach to the problem of atomization in electrothermal atomic absorption spectrometry, *Spectrochimica Acta*, **1982**, 37B, 673-684.
27. R. E. Sturgeon, S. S. Berman. Absorption pulse shifting in graphite furnace atomic absorption spectrometry, *Analytical Chemistry*, **1985**, 57, 1268-1275.
28. D. A. Bass, J. A. Holcombe. Mechanisms of lead vaporization from an oxygenated graphite surface using mass spectrometry and atomic absorption, *Analytical Chemistry*, **1988**, 60, 578-582.
29. X.-Q. Shan, D.-X. Wang. X-ray photoelectron spectroscopic study of the mechanism of palladium matrix modification in the electrothermal atomic absorption spectrometric determination of lead and bismuth, *Analytica Chimica Acta*, **1985**, 173, 315-319.
30. G. Schlemmer, B. Welz. Palladium and magnesium nitrates, a more universal modifier for graphite furnace atomic absorption spectrometry, *Spectrochimica Acta*, **1986**, 41B, 1157-1165.
31. S. Xiao-quan, B. Radziuk, B. Welz. Application of palladium as a chemical modifier in electrothermal atomic absorption spectrometry with tungsten tube atomizer, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **1992**, 7, 389-396.
32. Real Decreto 25-11-1988, nº 1424/1988, Ministerio de Relaciones con las Cortes y de Secretaría del Gobierno (BOE 1-12-1988, núm. 288, pág. 34033).
33. P. Currò, G. Micali, F. Lanuzza. Determination of β -asarone, safrole, isosafrole and anethole in alcoholic drinks by high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography*, **1987**, 404, 273-278.
34. S. Lindsay. High Performance Liquid Chromatography, 2nd ed., **1987**, ACOI, John Wiley & Sons, London.

35. L. R. Snyder, J. J. Kirkland, J. L. Glajch. Practical HPLC method development, 2nd ed., **1997**, John Wiley & Sons, Inc., New York, USA.
36. W. J. Youden. Statistical techniques for collaborative tests, The AOAC, Washington, **1967**.
37. L. Huber. Validation of Analytical methods: review and strategy, *LC-GC International*, **1998**, 11, 96-105.
38. Reglamento (CEE) núm. 1576/89, 29-5-1989 (DOCE 12-6-1989, núm. L 160, P. 0001-0017).
39. D. González-Arjona, G. López-Pérez, A. G. González, Holmes, a program for performing procrustes transformations, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, **2001**, 57, 133-137.

V. Resumen y conclusiones

1. Se ha estudiado el perfil metálico de bebidas anisadas españolas, determinando los contenidos de boro, calcio, cobre, hierro, magnesio, plomo, silicio, sodio y zinc.

2. Se ha realizado un estudio comparativo sobre distintos procedimientos de tratamiento de muestra, considerando métodos por vía seca y vía húmeda. Según 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 que emplea una mezcla $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ (10:1).

3. Se ha puesto a punto un método de determinación de boro, calcio, hierro, magnesio, silicio, sodio y zinc en anisados por ICP-AES, estudiándose las características analíticas del método. Mediante ensayos de recuperación se evaluó la exactitud, obteniéndose en todos los casos valores del 100%. En cuanto a la precisión se obtuvieron valores de repetitividad entre 0.8 y 3.9% y de reproducibilidad entre 1.5 y 4.4%. La linealidad obtenida para todos los elementos es superior al 99%. Los límites de detección, están comprendidos entre 0.005 y 0.115 mg/l.

4. Se han analizado 115 muestras de anises comerciales, determinando su contenido en boro, calcio, hierro, magnesio, silicio, sodio y zinc. Los componentes que se encontraron en menor proporción fueron boro, hierro y zinc, mientras que calcio, magnesio, silicio y sodio se encuentran en mayor proporción.

5. Se ha puesto a punto un método para la determinación de cobre en anisados mediante ET-AAS, utilizando $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ como modificador de matriz. La temperatura de mineralización se estableció en $1300\text{ }^\circ\text{C}$ y la de atomización en $2300\text{ }^\circ\text{C}$. Se comprobó la ausencia de efecto matriz. Las recuperaciones obtenidas fueron del 100%. Los valores de repetitividad obtenidos fueron del 2.85% y de reproducibilidad del 5.96%. La linealidad fue del 97.7%. Los límites de detección y cuantificación, referidos a la muestra, fueron de 3.2 y

10.6 µg/l, respectivamente. La sensibilidad, expresada como masa característica, fue de 8.4 pg.

6. Se ha determinado el contenido de cobre de 26 muestras de anisados. Las concentraciones obtenidas varían entre 3.2 µg/l y 437 µg/l.

7. Se ha puesto a punto un método para la determinación de plomo en anisados mediante ET-AAS, utilizando la mezcla Mg(NO₃)₂ y Pd(NO₃)₂ como modificador de matriz. Las temperaturas de mineralización y atomización fueron 900 °C y 1800 °C, respectivamente. Se comprobó la ausencia de efecto matriz. Las recuperaciones obtenidas fueron del 100%. Se obtuvieron valores de repetitividad del 3.95% y de reproducibilidad del 4.23%. La linealidad fue del 97.7%. Los límites de detección y de cuantificación, referidos a la muestra, fueron de 7 y 23 µg/l, respectivamente. La sensibilidad, expresada como masa característica fue de 13.2 pg.

8. Se han analizado 26 muestras de anisados comerciales para determinar su contenido en plomo. Todas las muestras analizadas presentaron contenidos inferiores al límite de detección del método. Los valores que se pueden detectar con este método son inferiores al límite legal permitido (1 mg/l).

9. Se ha puesto a punto un método para la determinación de anetol en muestras de anís mediante HPLC, utilizando una columna de C18, una fase móvil de metanol/agua 80:20 y detección ultravioleta a 257 nm.

10. Se estudiaron las características analíticas del método. Las recuperaciones obtenidas fueron del 100%. Se obtuvieron valores de repetitividad del 0.9% y de reproducibilidad del 1.6%. Se comprobó que el rango lineal del método iba desde 2 hasta 16 mg/l. Los límites de detección y de cuantificación fueron de 0.1 y 0.4 mg/l, respectivamente.

11. Se estudió la robustez del método variando la temperatura de la columna, el porcentaje en metanol, el flujo de la fase móvil y la longitud de onda de detección. Se

concluyó que ninguno de estos factores influye significativamente en la respuesta del método.

12. Se han analizado 26 muestras de anisados para determinar su contenido en anetol. La concentraciones encontradas varían entre 0.125 y 4.04 g/l.

13. Se ha realizado un estudio quimiométrico con el fin de llevar a cabo una diferenciación entre las distintas denominaciones de origen de anisados españoles. Para este estudio se ha empleado el perfil metálico de las muestras.

14. Se ha evaluado la capacidad discriminadora de los elementos analizados para diferenciar las muestras de anisados con denominación de origen. Con este fin, se ha aplicado el análisis de componentes principales, dando como resultado que magnesio, calcio sodio y silicio son las variables más discriminantes.

15. Se han aplicado métodos de reconocimiento de patrones supervisados y no supervisados. Utilizando análisis cluster y análisis discriminante lineal se diferenciaron las tres denominaciones de origen. El modelo creado tiene una capacidad de reconocimiento y una capacidad de predicción del 100%.

16. Para detectar falsos positivos y falsos negativos se utilizó una técnica de modelado suave, como es el SIMCA. Sólo la clase Cazalla presenta un 4.5% de falsos negativos.

17. A la vista de los resultados, se concluye que es posible diferenciar las denominaciones de origen de anisados en base a su perfil metálico, siendo el contenido en silicio y magnesio los descriptores con mayor poder de discriminación.