

Análisis de varianza para la caracterización de diferentes tipos de tequila, utilizando espectroscopia Raman

Ramírez Galindo, M.E.¹, Pliego Sandoval, J.E.², Reyes- Nava, L.A³, Iñiguez- Muñoz, L.E³, López Villalvazo, A.J.²

¹Ingeniería en Sistemas Biológicos. Centro Universitario del Sur. Avenida Enrique Arreola Silva 883, Ciudad Guzmán, Colonia centro, 49000, Jalisco, México.

²Departamento de Ciencias Computacionales e Innovación Tecnológica. Centro Universitario del Sur. Avenida Enrique Arreola Silva 883, Ciudad Guzmán, Colonia Centro, 49000, Jalisco, México.

³Departamento de la Naturaleza. Centro Universitario del Sur. Avenida Enrique Arreola Silva 883, Ciudad Guzmán, Colonia Centro, 49000, Jalisco, México. Teléfono: +52(341) 575 2222.

*correo: jorge.pliego@cusur.udg.mx

Palabras clave: ANOVA, espectroscopia Raman, tequila

Introducción

Uno de los principales factores de riesgo para la salud es la ingesta de alcohol. Anualmente, en el continente americano aproximadamente 85,000 personas mueren a causa del consumo de alcohol. Del 80% de las defunciones por motivo de alcohol ocurridas en tres de los países más poblados (Estados Unidos, Brasil y México), este último tuvo un 18.4% [1].

Una bebida alcohólica es aquella que contiene un compuesto químico llamado etanol, el cual es un líquido incoloro e inflamable. En muchos países, los alcoholes se consumen legalmente y existen leyes que regulan su producción, venta, consumo y composición. Las bebidas alcohólicas también poseen más de 1000 componentes distintos, entre los cuales se encuentran los aditivos y los contaminantes, mismos que contribuyen en su calidad de distintas formas. Algunos de estos componentes como los ésteres son beneficiosos porque mejoran las propiedades sensoriales del producto final; por otro lado, los compuestos de carbonilo resultan perjudiciales debido a que pueden ser potencialmente carcinógenos [2].

Las bebidas alcohólicas se dividen en tres tipos según el material fermentable que se utiliza y el método por el cual se procesa el material: cerveza, vinos y bebidas destiladas o licores. La graduación alcohólica en bebidas elaboradas de la fermentación (vino, cerveza, sidra, hidromiel y sake) y la destilación (licores como brandy, whisky, tequila, ron, vodka, etc.), no suele exceder los 15 grados. El contenido de alcohol puede variar de un 3% al 45%, dependiendo del tipo de bebida [3].

El tequila es una bebida alcohólica típica en México, que se produce como resultado de la fermentación de la planta de agave tequilana Weber variedad azul conocida como agave azul, la cual se elabora principalmente en el estado de Jalisco; sin embargo, algunas regiones de los estados de Michoacán, Nayarit, Tamaulipas y Guanajuato también poseen las denominaciones de origen del tequila [4].

Entre los tipos de tequila, se encuentra el tequila 100% agave, lo cual quiere decir que el 100% de sus azúcares provienen del agave; y el tequila mixto, una bebida alcohólica en la cual el 51% de sus azúcares provienen del jugo de agave y el 49% restante de otra fuente como la caña de azúcar. Asimismo, existen otras clasificaciones que van de acuerdo con las características que adquiere la bebida durante el proceso de maduración en barricas de madera de roble, estas se catalogan en cinco clases: 1) Blanco (plata): producto sin aditivos y cuyo contenido de alcohol se ajusta en dilución con agua; 2) Joven (oro): producto resultante de la combinación ya sea de tequila blanco con aditivos o de tequila blanco con añejo y/o añejo y/o extra añejo; 3) Reposado (envejecido): producto que se somete a un proceso de envejecimiento de dos meses; 4) Añejo (extra envejecido): producto que se somete a un proceso de envejecimiento de un año y 5) Extra añejo (ultra envejecido): producto que se somete a un proceso de envejecimiento de al menos tres años [5].

El uso de barriles de madera para la maduración de la bebida destilada tiene la finalidad proporcionarle características fisicoquímicas como aroma, sabor y color. Durante las distintas etapas del proceso de producción de las bebidas alcohólicas se producen compuestos volátiles y semivolátiles como resultado de transformaciones bioquímicas, los cuales son los responsables del sabor y aroma de dichas bebidas como el tequila [6]. De acuerdo con el tiempo de maduración de la bebida se generan diferentes sabores que son buscados y apreciados por el consumidor y con esto elevan su costo, por lo cual es importante garantizar la composiciones de este producto.

Por tal motivo metodologías de referencia como el HPLC (cromatografía líquida de alta presión) , sin embargo es invasiva, destructiva y requiere de periodos largos para su análisis, como alternativas a esta, se encuentra, la técnica analítica conocida como espectroscopia Raman la cual ofrece ventajas como un análisis rápido no destructivo, proporciona información específica de compuestos, tiene un gran potencial para el análisis multicomponente y requiere poca preparación de la muestra, permitiendo un análisis en el lugar de consumo [7].

Así pues en este trabajo, la espectroscopia Raman y análisis de varianza (ANOVA) se emplearán para realizar un análisis en muestras de tres distintos tipos de tequila: blanco, reposado y extra añejo; con el fin de encontrar diferencias significativas entre los datos y con ello se logre caracterizar cada uno de los tequilas.

Metodología

Materiales

Programas

Se utilizó el programa Matlab versión R2020b licencia 40979805 para el tratamiento de los datos y la obtención de las áreas bajo la curva de los picos característicos de los espectros Raman y el programa Statgraphics versión Centurion XV.

Métodos

Procesamiento de las muestras

Se trabajó con los espectros Raman proporcionados de 40 marcas de tequilas comerciales, de las cuales 13 eran de tequilas blancos, 20 de tequilas reposados y 7 de tequilas extra añejos.

Obtención de las áreas bajo la curva

Se seleccionaron los picos característicos de los espectros Raman y se calcularon las áreas bajo la curva de dichos picos, mediante el método de trapecio en Matlab.

Análisis de varianza (ANOVA)

Se efectuaron análisis de varianza (ANOVA) simples para las áreas bajo la curva por cada uno de los picos característicos, con el propósito de encontrar diferencias significativas y seleccionar que pico o picos pueden diferenciar mejor los espectros.

Resultados y discusión

Se realizaron pruebas ANOVA sobre cada área bajo la curva de los picos 900 cm^{-1} , $1050\text{-}1150\text{ cm}^{-1}$, $1260\text{-}1340\text{ cm}^{-1}$ y $1470\text{ a }1500\text{ cm}^{-1}$, correspondientes a los enlaces CCO, CO y OH, OH y CH_2 respectivamente de los espectros Raman de cada uno de los diferentes tipos de tequila. Los valores-P de la pruebas-F de Fisher resultaron menores que el alfa (0.05), lo que indica que hay una diferencia estadísticamente significativa entre la media de los picos 900 cm^{-1} (CCO,) $1050\text{-}1150\text{ cm}^{-1}$ (CO y OH), $1260\text{-}1340\text{ cm}^{-1}$ y $1470\text{ a }1500\text{ cm}^{-1}$ (OH y CH_2) entre un nivel de tipo de tequila y otro, con un nivel de confianza del 95%, posteriormente se realizaron prueba múltiple de rangos basadas en LSD.

Las Figuras 1 y 2 muestran los gráficos de medias de las áreas bajo la curva de los picos 900 cm^{-1} CCO, $1050\text{-}1150\text{ cm}^{-1}$ CO y OH, $1260\text{-}1340\text{ cm}^{-1}$ y $1470\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ (OH y CH₂), en donde, se pueden apreciar de mejor manera las medias de los tres tipos de tequila estudiados, En estas pruebas se puede observar en el eje de las "x" el tipo de tequila y en el eje de las "y" el desplazamiento Raman en el cual se encuentra el pico característico, para la figura 1A y 1B pico de 900 cm^{-1} y pico de $1260\text{ a }1340\text{ cm}^{-1}$ respectivamente, no es posible observar diferencia entre el tequila extra añejo y reposado sin embargo existe diferencia de ambos tequilas con respecto al tequila Blanco.

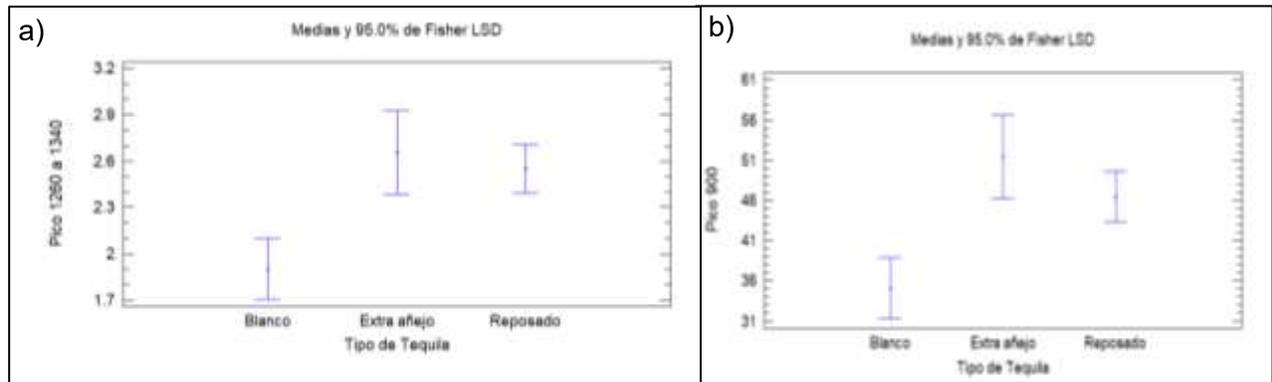


Figura 1. a) Gráfico de medias y 95.0% de Fisher LSD para pico 900 CCO . b) Gráfico de medias y 95.0% de Fisher LSD para pico 900 CCO .

En la Figura 2A el pico a $1050\text{-}1150\text{ cm}^{-1}$ y 2B $1470\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ se pueden observar diferencias en los tequilas reposado- blanco y extra añejo -blanco.

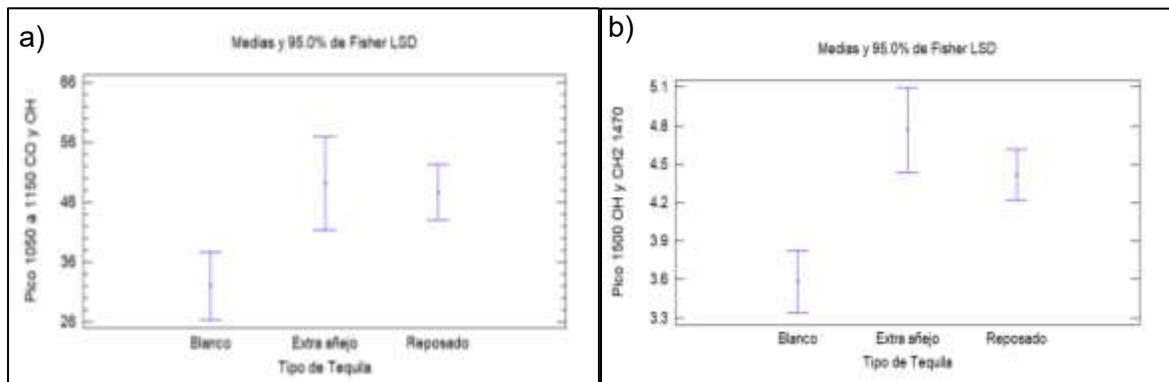


Figura 2. a) Gráfico de medias y 95.0% de Fisher LSD para pico $1260\text{-}1340$, b) Gráfico de medias y 95.0% de Fisher LSD para pico $1470\text{-}1500\text{ OH y CH}_2$

Por lo tanto, en los cuatro picos característicos hubo diferencias estadísticamente significativas coincidiendo que dichas diferencias de las medias se encuentran entre los tequilas Blanco-Extra añejo y Blanco-Reposado. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa LSD.

Discusiones

Frausto Reyes en el 2005 aplicó la espectroscopia Raman para estudiar el contenido de etanol en tequilas blancos, adicionalmente implementó un análisis de componentes principales para estudiar cualitativamente el contenido de etanol y su interrelación [7]. Es importante mencionar que el equipo utilizado en la investigación de Frausto es más robusto permitiendo medir desplazamientos Raman de 450 a 4000 cm^{-1} , en comparación con el rango del espectro de 0 a 2200 cm^{-1} de esta investigación.

Adicionalmente en este estudio se implementaron 3 tipos de tequila (blanco, reposado y extra añejo), analizando las diferencias entre los mismos, y no se evalúa solo el contenido de etanol si no las características de la muestra.

Conclusiones

Es posible encontrar diferencias significativas entre los tequilas blanco-reposado y blanco-extra añejo, sin embargo, esta metodología y el análisis de varianza no permitió diferenciar entre el tequila reposado y extra-añejo. Los picos característicos utilizados fueron 900 cm^{-1} CCO, 1050-1150 cm^{-1} CO y OH, 1260-1340 cm^{-1} y 1470-1500 cm^{-1} OH y CH_2 con un nivel de confianza del 95%, permitiendo así caracterizar la muestra.

Referencias

- [1] Salud OP de la. Unas 85.000 personas mueren al año por el alcohol en las Américas, el mayor consumidor mundial | Noticias ONU [Internet]. 2021 [cited 2021 Jun 26]. Available from: <https://news.un.org/es/story/2021/04/1490742>.
- [2] Wardencki W. Alcoholic beverages. In: *Encyclopedia of Analytical Science*. Elsevier; 2019. p. 67–76.
- [3] Núñez-Caraballo A, García-García JD, Ilyina A, Flores-Gallegos AC, Michelena-Álvarez LG, Rodríguez-Cutiño G, et al. Alcoholic Beverages: Current Situation and Generalities of Anthropological Interest. In: *Processing and Sustainability of Beverages*. Elsevier; 2019. p. 37–72.
- [4] Núñez-Caraballo A, García-García JD, Ilyina A, Flores-Gallegos AC, Michelena-Álvarez LG, Rodríguez-Cutiño G, et al. Alcoholic Beverages: Current Situation and Generalities of Anthropological Interest. In: *Processing and Sustainability of Beverages*. Elsevier; 2019. p. 37–72.
- [5] Warren-Vega WM, Fonseca-Aguñaga R, González-Gutiérrez L V., Carrasco-Marín F, Zárate-Guzmán AI, Romero-Cano LA. Chemical characterization of tequila maturation process and their connection with the physicochemical properties of the cask. *J Food Compos Anal*. 2021 May 1;98:103804.
- [6] Martín-del-Campo ST, López-Ramírez JE, Estarrón-Espinosa M. Evolution of volatile compounds during the maturation process of silver tequila in new French oak barrels. *LWT*. 2019 Nov 1;115:108386.
- [7] Frausto-Reyes C, Medina-Gutiérrez C, Sato-Berrú R, Sahagún LR. Qualitative study of ethanol content in tequilas by Raman spectroscopy and principal component analysis. *Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc*. 2005 Sep;61(11–12):2657–62.
- [8] Frausto-Reyes C, Medina-Gutiérrez C, Sato-Berrú R, Sahagún LR. Qualitative study of ethanol content in tequilas by Raman spectroscopy and principal component analysis. *Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc*. 2005 Sep;61(11–12):2657–62.