



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Determinación de terpenos en *Agave tequilana*  
Weber var. azul, *Agave angustifolia*, *Agave*  
*salmiana* y en sus respectivas bebidas alcohólicas

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**QUÍMICA DE ALIMENTOS**

P R E S E N T A :

**MARIA ALEJANDRA MEDINA ESPINOSA**



MEXICO, D. F.



EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUÍMICA

2004



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado

Presidente	Prof. Silvia Mendoza Arellano
Vocal	Prof. María de Lourdes Gómez Ríos
Secretario	Prof. Araceli Patricia Peña Álvarez
1er Suplente	Prof. Juan Diego Ortiz Palma Pérez
2o Suplente	Prof. Enrique Martínez Manrique

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 101 de Cromatografía de Gases, Departamento de Química Analítica, DEPg, Facultad de Química, U.N.A.M.

Asesor del Tema:

Dra. Araceli Patricia Peña Álvarez



Supervisor técnico

M. en C. Reyna del Carmen Labastida Rubio



Sustentante

María Alejandra Medina Espinosa



Con un agradecimiento muy especial a **Allied Domecq** por las facilidades prestadas para la elaboración de esta tesis.

Y a la *Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México* por brindarme la oportunidad de aprender y vivir una parte muy bonita de mi vida, pero sobretodo porque ahora puedo llamarme *UNIVERSITARIA* y gritar desde el corazón...

*GOYA, GOYA, CACHUN CACHUN RA RA  
CACHUN CACHUN RA RA GOYA  
UNIVERSIDAD!!!*



## AGRADECIMIENTOS

A DIOS, mi Señor y dador de todo bien, que pusiste a estas y otras muchas personas en mi camino para que me diera cuenta de cuánto me amas.

Te agradezco el testimonio de tu(s):

- ⊕ Amor, dulzura y apoyo incondicional con mis **pepitos**, personas que tanto admiro, respeto y amo.
- ⊕ Cuidados desde el cielo por parte de mis abuelitos **Colita**<sup>†</sup>, **David**<sup>†</sup>, **Eduardo**<sup>†</sup> y mi tío **David**<sup>†</sup>.
- ⊕ Palabras de aliento y apoyo moral con mi abuela **Martina**, mis tíos **Jorge** y **Ala**, la familia **Durán Bosa**, **Lupita López** y mi primo **David** (cuidalo Señor!).
- ⊕ Humildad servicio y lección de vida ejemplar con papi **Uri**.
- ⊕ Fortaleza, valentía y cariño fraternal con **P. Paco O.** y todos los niños de la **Casa Hogar Villa Nolasco**, especialmente **Mario**, **Victor**, **Felipe**, **Ray**, **Alberto**, **José V.** y **Pedro F.**
- ⊕ Perseverancia, franqueza y amistad sincera con **Irasema** y **Lorana**.
- ⊕ Compañerismo, alegría y buen humor en todos los momentos felices (y no tanto) con los integrantes de la "H. Jardinera": **Paola**, **Susana**, **Vanasa**, **Carlos (2)**, **Esperanza**, **Bolmar**, **Benjamín**, **Jonathán**, **Victor**, **César**, **Luis** y **Oscar** (rompánsen una pata!) y también con los integrantes de la "H. Canasta".
- ⊕ Sensibilidad y paciencia con **Mónica**, **Rebeca**, **Cecilia** y **Yenny**.
- ⊕ Confianza, presencia y apoyo en momentos difíciles con **Carman** y **Liliana**.
- ⊕ Ejemplo de vida cristiana que me mostraste con **Mayra**.
- ⊕ Bondad, cortésia y respeto con **Jesús**, **Edgar** y **Hugo**.
- ⊕ Vocación de educar con mis **profesores** de esta Facultad, especialmente, **Carlos (2)**, **Olga**, **Lucy**, **Fanny** y **Miguel Ángel**.
- ⊕ Valor, constancia, inteligencia, comprensión y aliento que de diferentes maneras (con regaños y dulzura) me enseñaste con la **Doctora Araceli**.
- ⊕ Espíritu de servicio, serenidad y generosidad con la **Maestra Carman**.
- ⊕ Compañerismo y disponibilidad con **Thalina**, **Laura**, **Miguel Ángel**, **Andrés**, **F. Rijo**, **Nacho**, **Hipócrates**.
- ⊕ Don de escucha, consuelo y corrección con **Javo**, **Hiram**, **Adri**, **Dulce**, **Carman**, **Oscar** y **P. Paco C.**
- ⊕ At last but not at least, de tu sencillez, nobleza, paciencia, cariño, consuelo y apoyo con una de las personas que pusiste más cerca de mí en este último "jalón": **Mario**.

A todos ustedes y algunos más que sin intención olvidé mencionar, por ser instrumentos y cooperar, de otras muchas maneras, para el cumplimiento de unos de los retos más importantes que me había fijado desde hace tiempo.

---

Gracias!



*La ciencia trata de explicarnos cómo han sido hechas las cosas.*

*La fe nos enseña el sentido sagrado de las cosas.*

*Ciencia y fe no luchan entre sí porque ambas vienen de Dios.*

*A MIS PAPITOS,*

*...es nuestro! ☺*



## INDICE

---

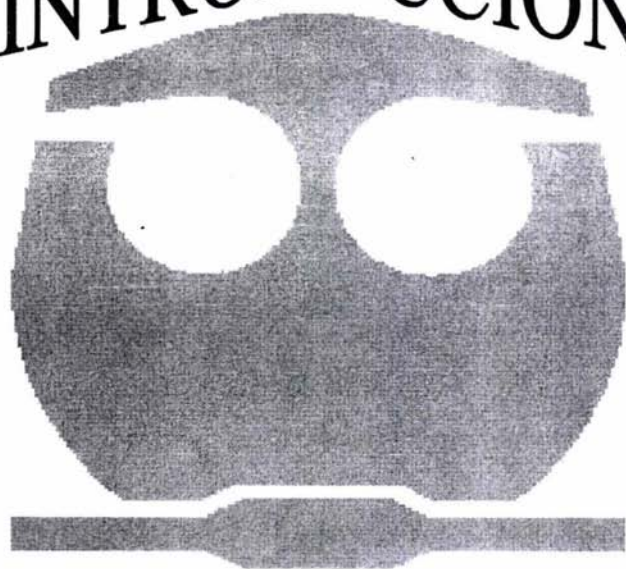
<b>Capítulo 1 Introducción</b>	1
<b>Capítulo 2 Antecedentes</b>	2
2.1 Agaves y bebidas alcohólicas	2
2.1.1 <i>Agave tequilana</i> Weber var. azul y el tequila	2
2.1.2 <i>Agave angustifolia</i> y el mezcal	4
2.1.3 <i>Agave salmiana</i> y el pulque	6
2.2 Terpenos	7
2.2.1 Biosíntesis de terpenos	9
2.3 Métodos de extracción	9
2.3.1 Destilación por Arrastre con Vapor (DAV)	10
2.3.2 Extracción Líquido-Líquido (ELL)	11
2.3.3 Micro Extracción en Fase Sólida (MEFS)	11
2.4 Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (CG-EM)	14
<b>Capítulo 3 Desarrollo Experimental</b>	20
3.1 Materiales y reactivos	20
3.2 Muestras	21
3.3 Análisis de terpenos en Agave	21
3.3.1 Preparación de las muestras de Agave	21
3.3.2 Destilación por Arrastre con Vapor	21
3.3.3 Micro Extracción en Fase Sólida – Head Space	21
3.4 Análisis de terpenos en bebidas alcohólicas	22
3.4.1 Extracción Líquido – Líquido	22
3.5 Análisis Cromatográfico	22
3.5.1 Mezcla concentrada de estándares	22
3.5.2 Condiciones cromatográficas	22



---

3.5.3 Identificación de terpenos en Agave y en bebidas alcohólicas	23
3.5.4 Cuantificación de terpenos	23
<b>Capítulo 4 Resultados y Discusión</b>	<b>24</b>
4.1 Análisis cromatográfico de terpenos	24
4.2. Análisis de terpenos en Agave	26
4.2.1 Extracción de terpenos en las diferentes especies de Agave	26
4.2.2 Identificación de terpenos en Agave	26
4.2.2.1 Identificación de terpenos en <i>Agave tequilana</i> Weber var. azul	26
4.2.2.2 Identificación de terpenos en <i>Agave angustifolia</i>	29
4.2.2.3 Identificación de terpenos en <i>Agave salmiana</i>	30
4.2.3 Comparación del perfil de terpenos en Agave	31
4.3 Análisis de terpenos en bebidas alcohólicas	37
4.3.1 Extracción de terpenos en las bebidas alcohólicas	37
4.3.2 Identificación de terpenos en bebidas alcohólicas	37
4.3.2.1 Identificación de terpenos en tequila	37
4.3.2.2 Identificación de terpenos en mezcal	41
4.3.2.3 Identificación de terpenos en pulque	43
4.3.3 Comparación del perfil de terpenos en bebidas alcohólicas	45
4.3.4 Cuantificación de terpenos en bebidas alcohólicas	49
<b>Capítulo 5 Conclusiones</b>	<b>52</b>
<b>Capítulo 6 Bibliografía</b>	<b>53</b>
<b>Anexo</b>	<b>I-IX</b>

# INTRODUCCIÓN







## CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

---

Existen más de trescientas especies de *Agave*, originario de América. Desde la época prehispánica, su jugo se empleó, fundamentalmente, para elaborar bebidas alcohólicas: en algunas regiones destilado como el tequila (*Agave tequilana* Weber var azul) y el mezcal (*Agave angustifolia*) o fermentado como el pulque (*Agave salmiana*)<sup>1</sup>.

Muy pocos estudios se han realizado sobre el aroma característico de cada una de estas bebidas alcohólicas, y ninguno sobre la materia prima. Sin embargo, el tequila se ha investigado más a fondo por ser una de las bebidas mexicanas más importantes a nivel mundial. Los primeros datos reportados son por Manjarrez y Llama (1969) y por Incitti *et al* (1980)<sup>2</sup>. Cedeño (1995) revisó el proceso de producción de Tequila<sup>3</sup>. Benn y Peppard (1996) publicaron los resultados de los análisis instrumental y sensorial en algunos tequilas<sup>4</sup>. Pinal *et al* (1997) reportaron los parámetros que afectan la producción de alcoholes superiores en el tequila<sup>2</sup>. Recientemente (2002) Mancilla-Magali analizaron los compuestos que se generan durante el proceso térmico del *Agave tequilana* Weber var. azul<sup>5</sup>.

Sin embargo, aun no existe suficiente información acerca de las bebidas alcohólicas nacionales consideradas como típicas. Por lo tanto se eligió un grupo de compuestos volátiles responsables del aroma: los terpenos, para obtener un perfil cromatográfico que caracterice a cada una de las especies de agave y sus respectivas bebidas alcohólicas. Se optimizó una metodología para su análisis en *Agave*<sup>6</sup> y se propuso otra para las respectivas bebidas alcohólicas. Se compararon los perfiles obtenidos y se cuantificaron algunos terpenos en las bebidas en estudio.

ANTECEDENTES





## **CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES**

---

### **2.1 Agaves y bebidas alcohólicas**

El género *Agave*, cuyo palabra viene del griego, significa "admirable", fue descrito inicialmente por Linneo en 1753, siendo la primera especie *Agave americana*. Son plantas perennes, rizomatosas, de tallos acaules, hojas grandes dispuestas en roseta y suculentas-fibrosas que terminan en una espina; inflorescencia en espiga; con flores de color amarillo verdoso y fruto alargado con numerosas semillas aplanadas. Los Agaves sólo tienen una floración al cabo de la cual la planta muere. Su propagación es principalmente en forma asexual (por hijuelos).

Los primeros datos que se tienen sobre los diferentes usos que se le daba al Agave, datan desde la época prehispánica, en diferentes códices indígenas<sup>3</sup>. De la planta en general, se aprovechaban: el jugo; las hojas, de las cuales sacaban fibra para obtener hilo y tejer telas o para elaborar papel; la espina terminal de las pencas, a manera de aguja para coser y para sacrificios corporales; las hojas secas, como suela de calzado, tejas en techos de casas y combustible.<sup>1</sup> En uno de los códices más importantes, el *Tonalmatlnahuatl* (Foto 1), se apunta que ciertas tribus ya cocinaban el Agave y lo usaban como alimento.<sup>3</sup> Fundamentalmente se empleó su jugo para elaborar bebidas alcohólicas: el tequila o el mezcal en algunas regiones; el pulque en otras. La preparación de bebidas alcohólicas (a excepción del pulque) con fines ceremoniales, se considera una influencia mesoamericana, sin embargo, también se consumía en culturas que se localizaban más al norte de México.

#### **2.1.1 *Agave tequilana* Weber var. azul y el tequila**

Se considera que al igual que la formación de los mestizos, el tequila resultó de la combinación de dos culturas: de un recurso nativo (el Agave) y una tecnología importada (la destilación). Entre el siglo XVIII y el XIX, la bebida alcohólica producida en un pequeño pueblo, al noreste del estado de Guadalajara, llamado Tequila, empezó a adquirir gran fama por su extraordinaria calidad. En esta



## CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

---

pequeña comunidad, las condiciones climatológicas y de la tierra eran ideales para el cultivo de cierta variedad de Agave: el "azul" (*A. tequilana* Weber). (Foto 2)

Poco a poco la calidad de este mezcal hecho con Agave azul (al que empezó a llamársele **tequila**) fue más reconocida y los avances del país y la tecnología fueron determinando que el tequila se hiciera más popular, no sólo en México, sino en todo el mundo.

La parte central de Jalisco presenta un tipo de clima de los más secos dentro del grupo de los cálidos subhúmedos con lluvias en verano. La temperatura media anual es de 23.6 °C. El tiempo que tarda el *Agave tequilana* Weber var. azul en llegar al estado de madurez industrial es aproximadamente de 6 a 7 años en las condiciones climáticas del Valle de Tequila y de 7 a 9 años en el de Atotonilco, y por lo tanto, el contenido de azúcares será más alto en los Agaves cultivados en Atotonilco<sup>1</sup>.

El proceso de obtención del tequila se inicia cuando los Agaves han alcanzado su madurez fisiológica entre los 5-10 años y les empieza a crecer la inflorescencia; en ese momento se "desquiotan" (corte de la inflorescencia). Después de un periodo de 7 meses a un año de descanso, la planta se cosecha o "jima" (Foto 3), acción que consiste en cortar la planta y sus hojas dando forma a un cuerpo ovoide que recibe el nombre de "piña" (Foto 4). Habiéndose jimado el agave se transporta a las fábricas tequileras, donde las piñas se desgarran y se conducen a autoclaves, ahí la materia prima se cuece a vapor y se exprime agregando agua a presión al bagazo. De esta manera se obtienen las mieles o mostos que se fermentarán. Durante el cocimiento, los azúcares complejos como la inulina se desdoblan en azúcares sencillos como la fructosa y la sacarosa. Las mieles extraídas del agave cocido se envían a tinajas de fermentación, donde las levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* transformarán los azúcares en alcohol etílico y bióxido de carbono en un tiempo de más o menos 24 horas. Con los jugos fermentados se





## CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

---

alimentan los alambiques de destilación, separándose mediante calor y presión los productos alcohólicos y las vinazas (desechos de agua y levaduras). Para la elaboración del tequila se necesitan dos destilaciones; la primera, llamada destrozamiento, donde el alcohol alcanza una graduación de 25% (v/v), y la segunda, llamada rectificación, donde el producto se destila hasta el 55% (v/v) de alcohol etílico. En la primera destilación se obtiene el tequila ordinario y en la segunda el tequila blanco<sup>1</sup> (Foto 5).

Hay cuatro tipos de tequila según la Norma:<sup>7</sup> el blanco (tipo I), producto de la rectificación y ajustado con agua de dilución a su graduación comercial; el joven abocado (tipo II), tequila blanco adicionado con uno o más saborizantes y colorantes inocuos para suavizar su sabor; el reposado (tipo III), producto que se deja al menos 2 meses en recipientes de roble o encino, susceptible de ser abocado; el añejo (tipo IV), producto sometido a maduración por lo menos de un año en barricas de roble o encino, susceptible de ser abocado y ajustado con agua de dilución a su graduación comercial (Foto 6). El tequila puede ser 100% de Agave o se le pueden adicionar hasta un 49% de otros azúcares ajenos al mismo (obtenidos de la caña de azúcar), pero tendrán que indicarse en la etiqueta<sup>8</sup>.

### 2.1.2 *Agave angustifolia* y el mezcal

Con el nombre de mezcal se conoce a otra bebida alcohólica destilada que se obtiene de diferentes Agaves en varios estados de la República Mexicana; las diferencias básicas con el tequila estriban en las especies de Agave utilizadas para la elaboración y en la forma artesanal o semi-industrial de obtención del mezcal, lo cual le confiere características organolépticas diferentes<sup>8</sup>.

En el Valle Central de Oaxaca, la especie más utilizada como productora de mezcal es *Agave angustifolia* (Foto 7), su cultivo es sistemático y amplio en la región; también crece en forma silvestre en muchas partes de la cuenca del Río Balsas y en la Mixteca.



## **CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES**

---

Para el cultivo de esta especie de Agave, se tiene preferencia por limpiar terrenos pedregosos, sin importar su pendiente, secundariamente se eligen zonas planas y menos pedregosas. Después de cultivado, este agave requiere aproximadamente de 6 a 8 años para producir una "piña" de 25 a 44 Kg, de las cuales se llegan a obtener alrededor de 5 litros de mezcal por cada una.

El principal proceso utilizado en Oaxaca para elaborar mezcal comienza cuando las piñas se pican en trozos pequeños para favorecer tanto el horneado como la molienda (Foto 8). Éstos se cuecen en hornos grandes construidos bajo la tierra y precalentados (Foto 9). De esta manera, el Agave debe permanecer tapado totalmente con la misma tierra de las excavaciones durante tres días; la molienda se realiza mediante un trapiche (pozo de cemento con un poste central del cual se hace girar alrededor, una rueda de acero tirado por dos mulas y controlado por una sola persona. Para la fermentación, dado la rapidez y el alto volumen del mosto, se utilizan tinas de madera con capacidad de hasta dos mil litros, el contenido se remueve con un trinche o bieldo metálico con soporte de madera (Foto 10). Para la destilación se utilizan el serpentín y el alambique de cobre (Foto 11), y se recupera en tinacos de madera<sup>1</sup>.

Según la Norma para mezcal<sup>9</sup>, de acuerdo al porcentaje de los carbohidratos provenientes del agave que se utilicen en la elaboración del mezcal, éste se clasifica en los tipos siguientes: mezcal 100% agave (tipo I) y mezcal al que se han adicionado 20% de otros carbohidratos no provenientes del Agave (tipo II). Ambos tipos pueden ser clasificados en tres categorías, de acuerdo a las características adquiridas en procesos posteriores a la destilación y rectificación: el joven (I), producto de la rectificación y ajustado con agua de dilución a su graduación comercial (36-55% alcohol volumen); el reposado (II), producto que se deja al menos 2 meses en recipientes de roble o encino, susceptible de ser abocado y el añejo (III), producto sometido a maduración por lo menos un año en





## CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

---

barricas de roble o encino, susceptible de ser abocado y ajustado con agua de dilución a su graduación comercial.

### 2.1.3 *Agave salmiana* y el pulque

Los Agaves nativos del Altiplano del centro de México, se encuentran en forma silvestre y cultivados en gran cantidad. Generalmente ocupan elevaciones entre 2300 y 2460 msnm, con una precipitación de 360 – 1000 m<sup>2</sup> en promedio anual y ligeras heladas en diciembre. El 70 a 80% de las lluvias ocurre durante los meses de mayo hasta octubre.

El *Agave salmiana*, el gran agave pulquero (Foto 12), crece conspicuamente sobre grandes regiones de tierra en el Altiplano Central de México, frecuentemente a lo largo de las carreteras cercanas a la Ciudad de México y en los estados de Michoacán, Guanajuato, Querétaro, San Luis Potosí, Hidalgo, Tlaxcala, Puebla y Morelos<sup>1</sup>.

Después de 8 a 12 años de crecimiento, un Agave pulquero se halla en su fase adulta y está próximo a reproducirse sexualmente mediante el surgimiento de su inflorescencia. Es en este momento, cuando se le emplea para la producción de "aguamiel", que una vez fermentado se convertirá en pulque. El proceso lo realiza una persona experimentada que reconoce el momento preciso de "capar" el Agave, es decir, quitarle el cono central de hojas *cogollo* o *meyolote*, incluyendo la yema vegetativa o *huevo*, a fin de que la planta no produzca su qurote o tallo floral. El "tlachiquero", es el trabajador encargado de capar y extraer el aguamiel. Para capar la planta buscará la cara del Agave (donde haya menos pencas u hojas) (Foto 13) hasta llegar al centro del tallo o *mezontete*; para lo cual se quitan los dientes y espinas de las hojas, hasta deshojar todo el centro de la planta. A partir de este momento el Agave puede dejarse descansar así hasta por seis meses, a fin de que se "añeje" y pueda producir aguamiel de buena calidad y en cantidad suficiente<sup>10</sup>. El siguiente paso es desgastar los tejidos donde existía el



## CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

---

cogollo con un "raspador" en forma de cuchara, con el cual se forma una cavidad en el centro llamada "cajete", hacia la cual escurre la savia dulce de las hojas, el "aguamiel" (Foto 14). El tlachiquero, dos veces al día y mediante succión, extrae el aguamiel con un "acocote" (calabaza larga con orificios en ambos extremos) (Foto 15). Posteriormente, "raspa" la cavidad para quitar los tejidos muertos y permitir el drene de los vasos de las hojas que vertirán nuevamente aguamiel al cajete. Una planta produce de 3 a 6 litros de aguamiel por extracción y según su robustez de 500 a 1000 litros en toda su vida, que dura de 3 a 8 meses. El aguamiel extraído se lleva al "tinacal", edificio donde el encargado o "mayordomo" lo vierte en tinas de madera o "toros" (Foto 16) (recipientes de piel de vacuno sin curtir), donde se fermenta entre 8 y 30 días. Sin embargo, la fermentación puede acelerarse mediante la adición de residuos de un pulque previo llamado "semilla". En la fermentación algunas bacterias como las *Zymomonas mobilis* y levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* transforman la glucosa en alcohol y bióxido de carbono, produciendo además ácido láctico; algunas más del género *Leuconostoc* producen dextranas (polisacáridos) que confieren al pulque su viscosidad (Foto 17).

El pulque se considera una bebida de moderación, blanca, viscosa y mucilaginososa, que presenta de 3 a 6 % de alcohol etílico y con sabor ácido y aroma peculiar. Entre sus propiedades alimenticias se incluyen los azúcares, aminoácidos esenciales y vitaminas del complejo B, por lo que llega a ser de importancia en la dieta de algunos grupos étnicos de las regiones semiáridas y templadas de México.

Con el pulque ya elaborado es común hacer "curados" agregando diversas frutas, semillas y hortalizas que le confieren otras propiedades organolépticas<sup>8</sup>.



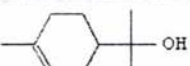



## CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

### 2.2 Terpenos

El común denominador de todas las bebidas alcohólicas es que son productos con un contenido significativo de etanol obtenido mediante fermentación. El sabor y aroma de las bebidas alcohólicas está influenciado en gran parte por ese alcohol; sin embargo, una gran variedad de compuestos orgánicos presentes en cantidades mucho menores son también responsables de estos atributos y contribuyen grandemente a las características distintivas entre las diferentes bebidas alcohólicas<sup>11</sup>. Entre estos compuestos se pueden reconocer a los terpenos que están catalogados como metabolitos secundarios de las plantas<sup>12</sup>. Desde hace siglos se sabe que las flores, frutas, hojas y raíces de muchas plantas contienen compuestos volátiles, sustancias aromáticas llamados *aceites esenciales*<sup>13</sup>. Por miles de años, estos extractos de plantas han sido utilizados como medicamentos, especias y perfumes. Químicamente los aceites esenciales consisten en gran medida de compuestos llamados **terpenos**. Los terpenos son moléculas orgánicas relativamente pequeñas con una inmensa diversidad de estructuras. Se conocen miles de terpenos diferentes; algunos son hidrocarburos, otros contienen oxígeno, algunos son moléculas de cadena abierta, otros más contienen anillos, etc.<sup>14</sup> (Tabla 1).

Tabla 1. Ejemplos de terpenos encontrados en aceites esenciales de plantas<sup>13</sup>

$\alpha$ -felandreno	Geraniol	$\alpha$ -terpineol	Farnesol
			
Monoterpeno monocíclico insaturado	Monoterpeno acíclico insaturado con un grupo alcohol primario	Monoterpeno monocíclico insaturado con un grupo alcohol primario	Sesquiterpeno acíclico insaturado con un grupo alcohol primario
Aceite de hinojo, eucalipto, etc.	Aceite de rosa, geranio, etc.	Aceite de alcanfor, neroli, etc.	Aceite de rosa, limón, neroli, etc.

Conforme a la **regla del isopreno** propuesta por Ruzicka, los terpenos pueden considerarse provenientes de uniones de cabeza-cola de unidades simples de





## CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

---

cinco carbonos del isopreno (2-metil-1,3-butadieno). Los terpenos se clasifican según el número de unidades de isopreno que contengan. Los **monoterpenos** son compuestos de 10 carbonos biosintetizados a partir de dos unidades de isopreno, los **sesquiterpenos** son moléculas de 15 carbonos formadas a partir de tres unidades de isopreno, y así sucesivamente. Los monoterpenos y sesquiterpenos se encuentran principalmente en plantas, por ejemplo el geraniol, que es un monoterpeno, y el farnesol, que es un sesquiterpeno, ambos con un grupo alcohol, se encuentran en el aceite de rosas<sup>14</sup>.

### 2.2.1 Biosíntesis de terpenos

La regla del isopreno es un formalismo conveniente que ayuda a determinar nuevas estructuras, pero el isopreno en sí no es el precursor biológico de los terpenos. En vez de ello, la naturaleza utiliza para la biosíntesis de terpenos dos "equivalentes" de isopreno, el pirofosfato de isopentenilo y el pirofosfato de dimetilalilo. Estas moléculas de cinco átomos de carbono se forman por la condensación de tres unidades de Acetil Coenzima A.

Después de una serie de reacciones químicas de tipo nucleofílicas se forma el *pirofosfato de geranilo* que es el precursor de todos los demás monoterpenos, por ejemplo, del limoneno, un monoterpeno que se halla en muchos aceites cítricos. Cuando el pirofosfato de geranilo reacciona con el pirofosfato de isopentenilo, se obtiene el *pirofosfato de farnesilo*, de 15 carbonos. Así como el pirofosfato de geranilo es el precursor de todos los monoterpenos, el pirofosfato de farnesilo es el precursor de todos los sesquiterpenos.<sup>14</sup>

### 2.3 Métodos de Extracción

Generalmente, los procesos analíticos consisten en una serie de pasos que son importantes para la obtención de resultados correctos y reproducibles. La etapa de preparación de la muestra es necesaria para aislar los compuestos de interés de la matriz de la muestra, así como para purificar y concentrar los analitos<sup>18</sup>.



## **CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES**

---

Sin embargo, existen varios problemas asociados a las técnicas tradicionales de preparación de muestras, como el uso de disolventes orgánicos típicos y el largo tiempo de análisis entre otros.

Para la extracción de terpenos en plantas se han utilizado diferentes técnicas, como la extracción con fluidos supercríticos<sup>15</sup>, la destilación a presión reducida y la destilación por arrastre con vapor simple o acoplada a extracción con disolventes<sup>16</sup>. La destilación por arrastre posee algunas desventajas comparada con las otras técnicas sin embargo, es el método más utilizado a nivel industrial, por ser una técnica sencilla y relativamente de bajo costo que permite obtener los aceites esenciales que están en muy baja concentración<sup>17</sup>.

Existen varias técnicas para el análisis de compuestos volátiles y semivolátiles que pueden clasificarse de acuerdo al medio de separación que utilizan. La mayoría están dentro de la siguiente clasificación: extracción por fase gaseosa (Head-Space), por membranas o por adsorbentes (Micro Extracción en Fase Sólida)<sup>18</sup>.

### **2.3.1 Destilación por Arrastre con Vapor (DAV)**

Se puede definir la destilación como la separación de dos o más sustancias, basada en la diferencia entre sus presiones de vapor. Dichas sustancias pueden ser total, o parcialmente miscibles y en algunos casos inmiscibles, comportándose de forma diferente según sus presiones de vapor en ambos casos.

Si consideramos un sistema heterogéneo formado por dos líquidos no miscibles, tales como el agua y un aceite esencial, el sistema entrará en ebullición cuando las presiones de vapor de los dos componentes se igualen. Todo líquido inmisible o miscible en cantidades muy pequeñas con el agua puede ser arrastrado por ésta. La temperatura a la cual hierve la mezcla, será inferior al punto de ebullición del componente más volátil, y si uno de los líquidos es agua, trabajando a la



## **CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES**

---

presión atmosférica, se podrá separar un componente de mayor punto de ebullición que el del agua a una temperatura inferior a 100°C. Estos arrastres reciben el nombre de codestilaciones. Por esto la codestilación acuosa se utiliza para aislar los aceites esenciales<sup>17</sup>.

### **2.3.2 Extracción Líquido – Líquido (ELL)**

En algunos casos, cuando los analitos se encuentran en concentraciones traza, como los terpenos en las bebidas alcohólicas, y se requieren separar de otros compuestos que están en mayor concentración, se recomienda utilizar la extracción líquido-líquido. La ELL como pre-tratamiento de la muestra aumenta la sensibilidad y la selectividad del método.

En el proceso de ELL participan diversos factores en la recuperación de las especies en solución:

- 1.- La fase orgánica que permite la separación de los solutos sometidos en el proceso de extracción. Normalmente se trata de un líquido orgánico cuyas principales características son su baja solubilidad y reactividad con el agua. Dentro de los disolventes más empleados encontramos hidrocarburos, alifáticos, aromáticos o disolventes clorados como el cloroformo.
- 2.- La fase acuosa que además del soluto o mezcla de solutos a separar, contiene otras sustancias, como ácidos inorgánicos para ajustar el pH o agentes salinos que favorecen la recuperación de los compuestos orgánicos.
- 3.- La agitación manual o mecánica permite acelerar el paso del soluto de la fase acuosa a la fase orgánica estableciéndose un equilibrio entre ambas fases<sup>19</sup>.

### **2.3.3 Micro Extracción en Fase Sólida (MEFS)**

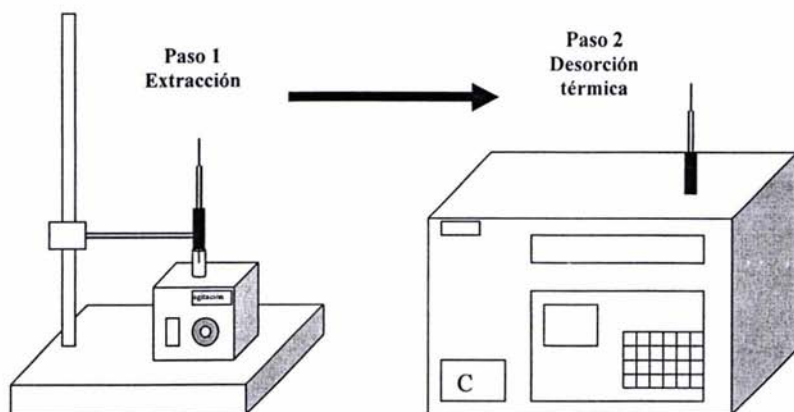
La MEFS es una técnica de extracción por adsorbentes y de preparación de muestra que no utiliza disolventes para extraer los compuestos. Consiste en dos pasos: la distribución de los analitos entre una fibra y la muestra, y la desorción de los analitos adsorbidos en un instrumento de análisis. En el primer paso, la fibra se



## CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES



expone a la muestra (no importa la naturaleza de ésta) y los analitos se extraen de la matriz de la muestra a la fibra; después, en el segundo paso, éstos se transfieren directamente al inyector del cromatógrafo de gases donde se desorben por calor (Figura 1).



**Figura 1.** Paso 1: Equilibrio de los analitos entre la fibra y la muestra. Paso 2: Transferencia de la fibra al Cromatógrafo de Gases para desorber y analizar los analitos.

Las características de la fibra, su tamaño pequeño y su geometría cilíndrica, permiten que se incorpore en un mecanismo parecido a una jeringa, el cual funciona como tal y facilita su manejo en el inyector del cromatógrafo de gases (Figura 2). La MEFS, comparada con otras técnicas de extracción por adsorbentes, es más sencilla y de bajo costo, además la automatización y el muestreo se realizan *in situ*.

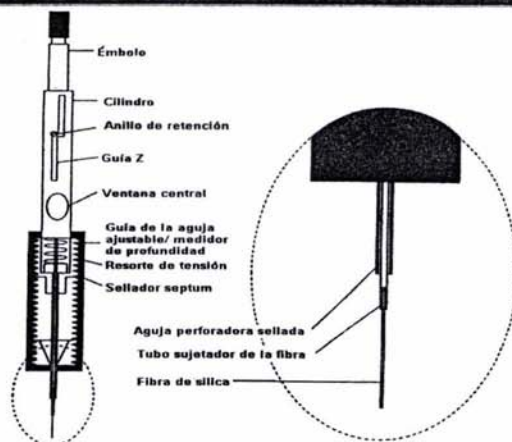


Figura 2. Diseño del mecanismo utilizado en MEFS

El principio en que se basa MEFS es la distribución de los analitos entre la matriz de la muestra y el medio de extracción, que depende de la afinidad de éstos por la fibra. Así, la cantidad de analito adsorbido por la fibra *en el equilibrio* es directamente proporcional a la concentración inicial de éste en la muestra<sup>20</sup>.

En la MEFS se tienen diferentes adsorbentes que constituyen las fibras, esto es polares, no polares y de polaridad intermedia. Se aplica el principio básico de "lo similar disuelve lo similar", y así, fibras polares de poliacrilato o carbowax adsorben compuestos polares como fenoles o ácidos carboxílicos, y fibras no polares como polidimetilsiloxano adsorben muy bien los hidrocarburos. Como existe competencia entre los analitos por la matriz de la muestra y la fibra, la afinidad de la fibra por los analitos es crucial en el muestreo por MEFS<sup>18</sup>.

La MEFS disminuye el tiempo de análisis porque combina el muestreo, la extracción, concentración e inyección en un procedimiento sencillo e ininterrumpido. Se debe de tomar en cuenta la cinética del proceso ya que los analitos pueden ser transportados desde la matriz de la muestra a la fibra en



## CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

---

inmersión (MEFS-ID) o desde la matriz de la muestra al vapor sobrenadante y de ahí a la fibra. (MEFS-HS).

Para acelerar la cinética del proceso, existen varios parámetros, si se calienta la muestra se aumenta la presión de vapor de los analitos y se le suministra la energía necesaria para que se volatilicen y al mismo tiempo aumente la velocidad de transferencia de masa<sup>20</sup>, también, se puede utilizar un sistema de agitación de manera que se facilite la difusión de los analitos hacia la superficie de la fibra, regularmente para muestras líquidas, se usan barras magnéticas agitadoras. Estos sistemas de agitación sirven para disminuir el efecto causado por la zona estática que se forma alrededor de la fibra y que disminuye la velocidad de extracción, así como para compensar los bajos coeficientes de difusión de las matrices líquidas.

Para compuestos volátiles orgánicos en agua, el muestreo por MEFS-HS es más rápido que en MEFS-ID. Si nuestros analitos tienen características volátiles, se recomienda el modo de extracción MEFS-HS que permite proteger la fibra de compuestos de elevado peso molecular, así como de otras interferencias no volátiles. Además permite modificar la matriz de la muestra, como por ejemplo variando el pH o adicionando sales como cloruro de sodio, carbonato de potasio y sulfato de amonio, sin dañar la fibra<sup>18</sup>. Figura 3.

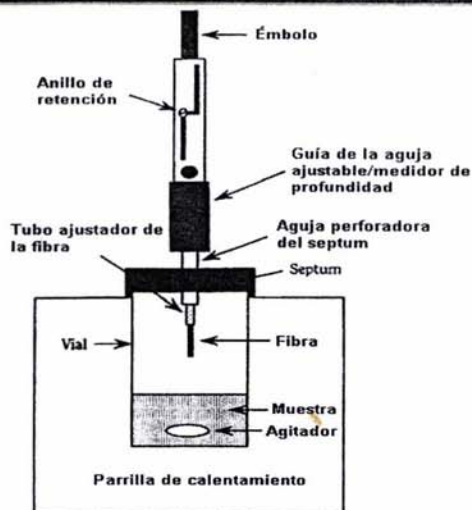


Figura 3. Análisis del vapor sobrenadante (MEFS-HS)

Para el análisis de los compuestos extraídos por esta técnica, regularmente se utiliza la cromatografía de gases, ya que la desorción térmica de los analitos adsorbidos en la fibra es muy eficiente. Al aumentar la temperatura, los coeficientes de distribución de gas/fibra disminuyen y también, la capacidad de la fibra por retener los analitos, además de que el flujo constante del gas acarreador facilita la remoción de los analitos de la fibra<sup>20</sup>.

#### 2.4 Cromatografía de Gases - Espectrometría de Masas (CG-EM)

La Cromatografía de gases es un método de separación basado en un equilibrio de distribución y elusión de la muestra entre dos fases, una estacionaria (película delgada de líquidos de alto punto de ebullición que recubren las paredes del capilar) y una móvil (gas acarreador). La separación depende del tiempo que pasan disueltos los analitos en la fase estacionaria.



## CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

La muestra se introduce a través del inyector donde se vaporiza y es transportada por el gas acarreador hacia la columna, en la cual se reparte entre la fase móvil y la estacionaria y es ahí donde se lleva a cabo la separación de los componentes; los cuales al presentar mayor afinidad por la fase estacionaria se desplazarán con mayor lentitud y eluyen a tiempos de retención mayor. Después, los solutos pasan hacia el detector donde se genera una respuesta que es proporcional a la concentración del analito presente; esta señal pasa a través de un procesador de datos que genera el Cromatograma con las áreas de los picos relacionadas con la concentración de analito en la muestra analizada. El esquema básico de un CG se ilustra en la Figura 4.

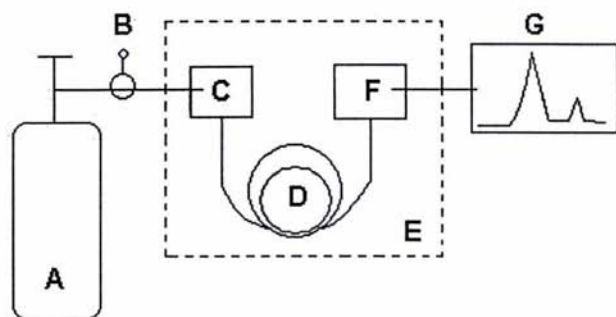


Figura 4. Partes que integran un CG: Gas acarreador (A), Regulador de flujo (B), Inyector (C), Columna cromatográfica (D), Horno (E), Detector (F) y Procesador de datos (G)

Una de las desventajas del CG es que no se puede confirmar la identidad o estructura de alguna señal cromatográfica. Los tiempos de retención están relacionados con el coeficiente de partición, pero no es característico de los compuestos. Por lo tanto, los datos del CG *por si solos* no pueden ser usados para identificar señales. Una técnica que ha sido extensamente estudiada es la cromatografía de gases directamente acoplada a un detector selectivo de masas (CG-EM)<sup>21</sup>.





## CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

---

La espectrometría de masas (EM) es un método de análisis destructivo. El principio sobre el cual opera, fue establecido por J. J. Thompson en 1913 “un haz de electrones es desviado de su trayectoria por la presencia de campos eléctricos y/o magnéticos, y el grado de desviación del haz depende de su relación de masa carga”. Entonces, la espectrometría de masas es una técnica que busca generar iones a partir de las moléculas de una muestra y posteriormente separar e identificar las distintas relaciones masa/carga ( $m/z$ ) de los iones generados por la muestra. El proceso de análisis involucra una fuente de generación de iones, un analizador o separador másico, un detector y por último alguna forma de registro que permita tener en forma permanente las señales generadas<sup>22</sup>. El diagrama de bloques de la Figura 5, esquematiza los principales componentes del espectrómetro de masas<sup>23</sup>. En los sistemas acoplados de CG-EM la forma de entrada de la muestra es por medio del CG y su objetivo es introducir una pequeña cantidad de muestra gaseosa en el EM<sup>24</sup>.

La fuente de ionización es un componente importante de la espectrómetro de masas, ya que determina qué especies pueden pasarse a estado gaseoso y ser ionizadas. En el caso de una ionización electrónica, los electrones requeridos para ionizar la muestra se emiten desde un filamento incandescente y se aceleran entre electrodos de hasta 70 eV<sup>24</sup>. La energía que se aplica en este proceso de ionización es mucho mayor que la energía necesaria para provocar la ionización, razón por la cual, las moléculas se fragmentan produciendo iones positivos y negativos, además de fragmentos neutros, y, por supuesto con relaciones  $m/z$  muy distintas. Normalmente se tienen un poco más de 99% de iones positivos, los cuales están en estado altamente excitado, por lo cual se descomponen en una variedad de fragmentos neutros y cargados, cuya naturaleza depende de la estructura de la molécula original. Por lo tanto, en un espectrómetro de masas, se analizan los iones positivos.<sup>22,23</sup>



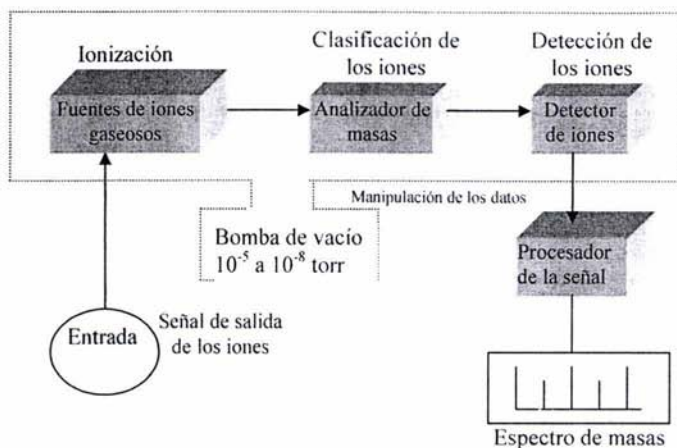


Figura 5. Componentes principales de un espectrómetro de masas

Los iones que se forman por ionización de electrones son repelidos fuera de la cámara de ionización, y acelerados por un voltaje de 1 a 10 KV, y el haz de iones formado, es alineado al pasar por una abertura selectiva a través de la cual entra al campo magnético. El resultado de esto es un abanico de rayos de iones, cada uno de los cuales está formado por iones que tienen la misma relación de masa carga ( $m/z$ ). Los rayos de iones son pasados uno a uno a través de una abertura, y enfocados hacia la placa colectora que emite un electrón por cada ion que choca con ella, formándose una corriente electrónica pequeñísima que se aumenta en un multiplicador electrónico, esta corriente recibida por el graficador nos produce el espectro de masas, en el cual el tamaño de cada pico es una medida relativa del número de iones (abundancia) de cada haz<sup>25</sup>.

Los principales tipos de iones que se registran en los espectros de masas de moléculas orgánicas son:

1.- Ion molecular. Corresponde al ion de máximo valor  $m/z$  en el espectro. Su intensidad se relaciona con la estabilidad de la estructura molecular del compuesto



## **CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES**

---

ante la carga y la deficiencia electrónica inducida. Corresponde al peso molecular del compuesto.

2.- Iones isotópicos. Todos los elementos que presentan formas isotópicas naturales, proporcionan contribuciones a los pesos moleculares, obteniéndose pequeños picos después del ion molecular en el espectro de masas que se representan como (M+1) cuando la contribución es de una unidad de masa; y (M+2), (M+4), etc., cuando la contribución isotópica corresponde a dos unidades de masa por cada halógeno o elementos como el azufre y el oxígeno. Relacionando las abundancias relativas del ion molecular con la obtenidas para las contribuciones isotópicas, se puede hacer el cálculo de la fórmula condensada del compuesto analizado.

3.- Iones fragmento. Corresponden a todos aquellos iones de masa integral y valor inferior al correspondiente ion molecular que resultan de procesos de descomposición unimolecular, dentro de la cámara de ionización y contiene la información relativa a la estructura de la molécula original<sup>22</sup>.



### 3.1 Materiales y Reactivos

Licuada Osterizer, Modelo L-21

Parrilla con agitador magnético Bornstead-Thermolyne, Modelo SPA1025B

Balanza Analítica Ohaus, Modelo AP250D

Centrífuga Clínica Internacional de 3600 rpm.

Bolsas Ziploc (Jonson, México)

Jeringas Hamilton de 100 y 500  $\mu$ L

Equipo convencional para destilación

Material de vidrio Pirex: pipetas volumétricas de 1, 3, 5 y 10 mL, matraz Erlenmeyer de 250 mL; embudo de separación de 500 mL, probeta de 250 mL, matraz aforado de 10 y 25 mL, tubos de ensaye de 16 x 20 mm con tapón de rosca

Agitador magnético (10 mm x 3 mm)

Septa de PTFE; viales de 11 mL con tapón horadado de polipropileno, fibra de Polidimetilsiloxano – divinilbenceno (PDMS-DVB, 65  $\mu$ L) y soporte de la fibra para inyección manual (Supelco, Bellefonte, PA. USA). El acondicionamiento de la fibra se realizó de acuerdo a las indicaciones del proveedor, colocándola en el inyector a 250°C durante 30 minutos.

Estándares:  $\alpha$ -felandreno,  $\alpha$ -bisabolol y nerol con 95% de pureza;  $\alpha$ -terpineno,  $\beta$ -trans-ocimeno, trans, trans-farnesol y linalol con 97% de pureza; limoneno,  $\gamma$ -terpineno y cis-nerolidol con 98% de pureza; p-cimeno, geraniol y 4-terpineol con 99% de pureza;  $\alpha$ -terpineol, mentol, eugenol y borneol grado cromatografía, Fluka CEIME AG (Suiza). Alcohol Etilico Absoluto Anhidro, Cloroformo y Tetracloruro de Carbono de 99.9% de pureza (J. T. Baker, México); Diclorometano de 99.8% de pureza (Mallinckrodt, México) y n-Hexano de 99.8% de pureza (Sigma Chemical Co, USA).

DESARROLLO



EXPERIMENTAL





**3.2 Muestras**

<b>Muestra</b>	<b>Lugar de Origen</b>	<b>Características</b>
<i>Agave tequilana</i> Weber var. azul	Tequila, Jalisco	Piña de 30 Kg. (peso aproximado)
<i>Agave angustifolia</i>	Oaxaca, Oaxaca	Piña de 25 Kg. (peso aproximado)
<i>Agave salmiana</i>	San Pablo Tecalco, Edo. de México	Piña de 30 Kg. (peso aproximado)
Tequila Blanco (100% Agave)	Tequila, Jalisco	65% Alcohol volumen
Mezcal Blanco (100% Agave)	Oaxaca, Oaxaca	40% Alcohol volumen
Pulque Natural	San Pablo Tecalco, Edo. de México	6% Alcohol volumen

**3.3 Análisis de terpenos en Agave**

**3.3.1 Preparación de las muestras de Agave**

Las piñas de las tres diferentes especies de agave, se cortaron y separaron en pequeños lotes. Para homogenizar la muestra, se molió en la licuadora cada lote por separado. Se guardaron en bolsas Ziploc selladas, etiquetadas con fecha de muestreo y nombre del lote para facilitar su manejo y se conservaron en el congelador a -14 °C.

**3.3.2 Destilación por Arrastre con Vapor**

Se pesaron aproximadamente 160 g de muestra de Agave y se destiló durante 60 minutos hasta obtener un volumen de 400 mL. Las extracciones se realizaron por triplicado.

**3.3.3 Micro Extracción en Fase Sólida – Head-Space**

Se tomaron 5 mL del destilado y se transfirieron a un vial de 11 mL conteniendo un agitador magnético. Se selló perfectamente el vial con cinta teflón y se cerró con tapón de rosca horadado y septa. Se colocó en baño maría a 60 °C con agitación



## **CAPITULO 3. DESARROLLO EXPERIMENTAL**

---

a 1200 rpm durante 20 minutos para establecer el equilibrio líquido – vapor, e inmediatamente después se insertó la fibra de PDMS/DVB y se extrajo durante 30 minutos bajo las mismas condiciones. Posteriormente, la fibra se inyectó al CG-EM y se desorbió durante 5 minutos en el inyector a una temperatura de 280 ° C. La MEFS se realizó por triplicado para cada uno de los tres destilados que se obtuvieron de cada especie de Agave.

### **3.4 Análisis de terpenos en bebidas alcohólicas**

#### **3.4.1 Extracción Líquido – Líquido**

En un embudo de separación de 500 mL se transfirieron 30 mL de muestra fría (tequila, mezcal ó pulque), 300 mL de agua destilada fría y 6 mL de solución extractante de cloroformo ( $\alpha$ -felandreno como Estándar Interno a una concentración de 1.86 mg/L). Se agitó vigorosamente durante 60 segundos. La fase orgánica se separó y filtró a través de sulfato de sodio anhidro. En el caso del Pulque, la fase orgánica se centrifugó a 3600 rpm durante 5 minutos. En todos los casos, se inyectó 1  $\mu$ L de la fase orgánica al CG-EM. Las extracciones se realizaron por triplicado.

### **3.5 Análisis Cromatográfico**

#### **3.5.1 Mezcla concentrada de estándares**

Se preparó una solución de 10 mg/L de los estándares de terpenos en etanol (Tabla 2).

#### **3.5.2 Condiciones Cromatográficas**

Para el análisis de Agave se utilizó un Cromatógrafo de Gases Hewlett Packard 5890 acoplado a un Detector Selectivo de Masas HP 5971 e inyector split/splitless. La temperatura del inyector fue de 280 °C, en modo splitless (1 min). Programa de temperatura: Temperatura inicial 40 °C durante 1 min, incrementándose a 5 °C/min hasta 210 °C, e incrementándose nuevamente a 10 °C/min hasta 280 °C durante 5 min. Columna capilar de sílice fundida ZB-5M (Zebron Phenomenex, USA) de 30





## **CAPITULO 3. DESARROLLO EXPERIMENTAL**

---

m x 0.32 mm x 0.25  $\mu$ m. Gas acarreador: Helio con flujo de 1 mL/min, La temperatura de la línea de transferencia fue de 280 °C, la de la fuente de ionización 230 °C, analizador (cuadrupolar) 150 °C. Los análisis se realizaron por impacto electrónico (70 eV). Se utilizó el modo Barrido Total del Espectro (SCAN, por sus siglas en inglés).

En el caso del análisis de las bebidas alcohólicas se utilizó un Cromatógrafo de Gases 6890N acoplado a un Detector Selectivo de Masas 5973 de Agilent Technologies utilizando la misma columna y las mismas condiciones cromatográficas.

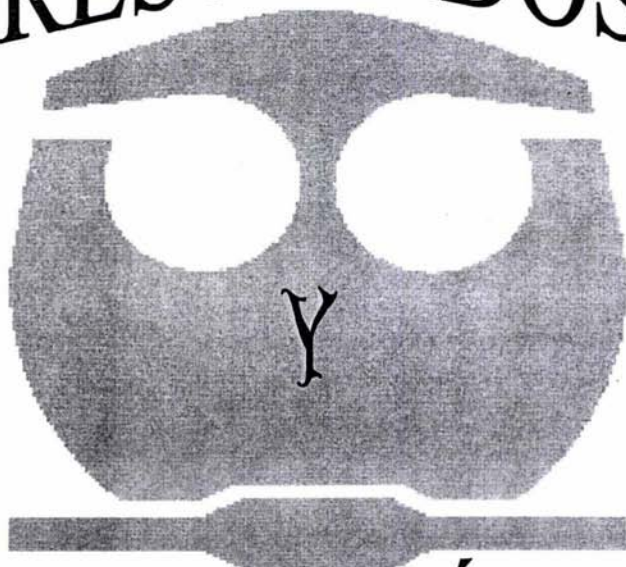
### **3.5.3 Identificación de terpenos en Agave y en bebidas alcohólicas**

La identificación de terpenos en todas las muestras se realizó comparando sus tiempos de retención y sus espectros de masas con los de los estándares, así como con la base de datos de la biblioteca NIST<sup>26</sup>. En el caso que no se contaba con el estándar sólo se comparó con el espectro de masas proporcionado por la biblioteca.

### **3.5.4 Cuantificación de terpenos**

La cuantificación de los terpenos en el Agave y en las bebidas alcohólicas se realizó mediante normalización de áreas y factores de respuesta, los cuales se calcularon inyectando 3 veces la solución estándar (10 mg/L en etanol) con los 16 terpenos.

RESULTADOS



DISCUSIÓN



## 4.1 Análisis cromatográfico de terpenos

La Figura 6 muestra el análisis por CG-EM de la mezcla estándar de terpenos y la Tabla 2 la identificación de éstos.

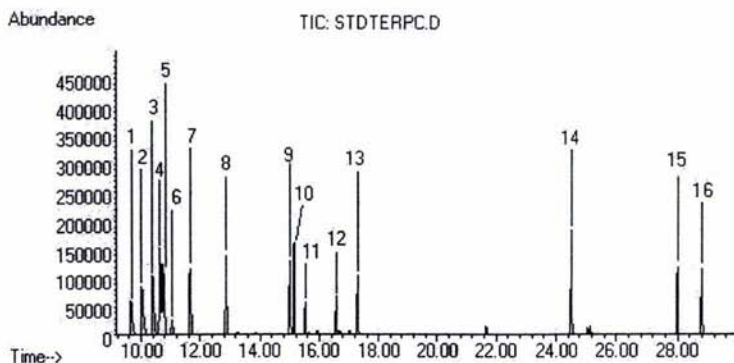


Figura 6. Cromatograma de la solución estándar de terpenos.

Condiciones cromatográficas Programa de temperatura: Temperatura inicial 40 °C durante 1 min, incrementándose a 5 °C/min hasta 210 °C, e incrementándose nuevamente a 10 °C/min hasta 280 °C durante 5 min. Columna capilar de sílice fundida ZB-5M de 30 m x 0.32 mm x 0.25 µm.

Tabla 2. Mezcla estándar de terpenos

Terpeno	Pico	Tr (min)	PM (g/mol)
$\beta$ -mirreno	1	9.654	136
$\alpha$ -felandreno	2	10.021	136
$\alpha$ -terpineno	3	10.391	136
p-cimeno	4	10.639	134
Limoneno	5	10.746	136
$\beta$ -trans-ocimeno	6	11.041	136
g-terpineno	7	11.653	136
Linalol	8	12.876	154
Mentol	9	15.005	156
4-terpineol	10	15.151	154
$\alpha$ -terpineol	11	15.521	154
Nerol	12	16.575	154
Geraniol	13	17.303	154
Cis-nerolidol	14	24.519	222
$\alpha$ -bisabolol	15	28.003	222
Trans,trans-farnesol	16	28.796	222



## CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Figura 7 ilustra un ejemplo de la identificación de terpenos. Para el *p*-cimeno se compara el espectro de masas de la muestra (A), el espectro de masas del estándar (B) y el espectro de masas propuesto por la biblioteca NIST del equipo (C) observándose que los espectros de masas coinciden con el compuesto identificado.

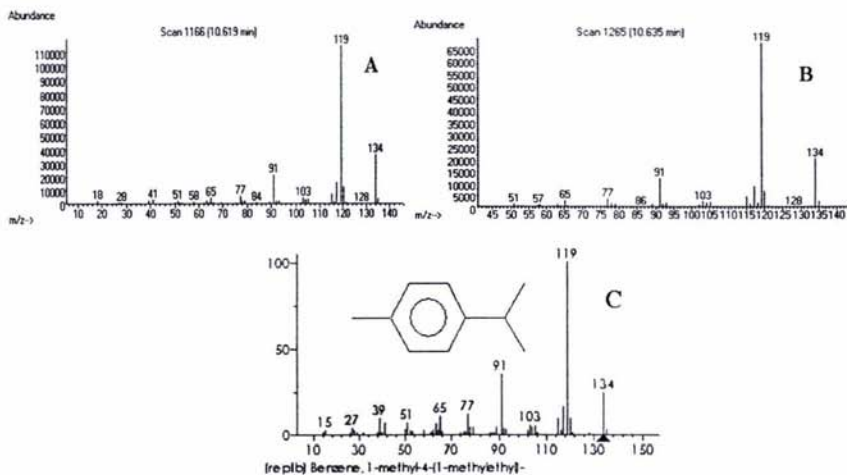


Figura 7. Espectro de masas del *p*-cimeno (A) muestra, (B) estándar, (C) biblioteca NIST

En la Figura 8 se muestra el ejemplo del *p*-ment-1-en-9-al donde sólo se compara el espectro de masas obtenido de la muestra (A) con el espectro de masas obtenido de la biblioteca NIST (C) lo cual permitió la identificación del compuesto con relativa certeza.

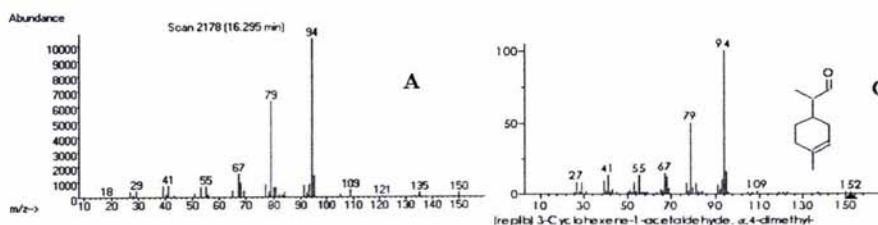


Figura 8. Espectro de masas del *p*-ment-1-en-9-al (A) muestra, (C) biblioteca NIST





### 4.2 Análisis de terpenos en Agave

#### 4.2.1 Extracción de terpenos en las diferentes especies de Agave

Debido a que en el Agave, los terpenos están en baja concentración, se utilizaron dos técnicas de extracción para su análisis: DAV (3.3.2) y MEFS-HS (3.3.3)

#### 4.2.2 Identificación de terpenos en Agave

##### 4.2.2.1 Identificación de terpenos en *Agave tequilana* Weber var azul

En la Figura 9 se muestra el Cromatograma del análisis de *Agave tequilana* Weber var. azul y la Tabla 3 muestra los terpenos identificados. En esta especie de Agave se identificaron 29 terpenos, encontrándose más monoterpenos que sesquiterpenos. Se observó que el linalol (pico 4) es el monoterpeno más abundante, y de los sesquiterpenos el trans-nerolidol (pico 22). En general, la resolución de los compuestos fue aceptable lo cual permitió una perfecta identificación de la mayoría de ellos. Sin embargo, algunos estaban en muy baja concentración con señales tan pequeñas, que dificultó una buena identificación. Por ejemplo los picos 6, 16, 18, 21 y 25 los cuales se identificaron como mono o sesquiterpenos y presentaron los iones fragmento característicos, así como el intervalo de peso molecular, permitió su clasificación.

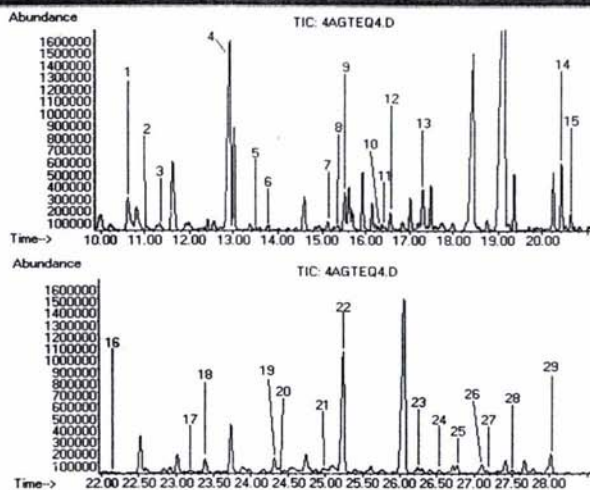


Figura 9. Cromatograma Iónico Total de *Agave tequilana* Weber var. azul.  
Las condiciones cromatográficas se indican en la Figura 6.

Debido a que existen diferentes isómeros de terpenos, esto complicó la identificación de algunos compuestos sin embargo, con una buena separación cromatográfica, un estándar y los espectros de masas de la biblioteca NIST fue posible identificar con certeza algunos terpenos como el trans-nerolidol (pico 22).

Tabla 3. Identificación de terpenos en *Agave tequilana* Weber var. azul

Terpeno	Pico	Tr (min)	PM (g/mol)	Estructura química	Terpeno	Pico	Tr (min)	PM (g/mol)	Estructura química
p-cimeno	1	10.630	134		Copaeno	15	20.635	204	
$\beta$ -trans-ocimeno	2	11.043	136		*Sesquiterpeno	16	22.139	204	
$\beta$ -cis-ocimeno	3	11.336	136		$\gamma$ -muuroloeno	17	23.179	204	
Linalol	4	12.930	154		*Sesquiterpeno	18	23.301	202	
Carveol	5	13.509	152		$\delta$ -cadineno	19	24.313	204	
*Monoterpeno	6	13.789	152		$\delta$ -selineno	20	24.370	204	
4-terpineol	7	15.137	154		*Sesquiterpeno	21	24.973	220	
p-cimen-8-ol	8	15.363	150		Trans-nerolidol	22	25.237	222	
$\alpha$ -terpineol	9	15.525	154		*Sesquiterpeno	23	26.259	222	
p-ment-1-en-9-al	10	16.296	152		Calameneno	24	26.554	222	
$\beta$ -ciclocitral	11	16.383	152		*Sesquiterpeno	25	26.777	222	
Nerol	12	16.568	154		Carotol	26	27.117	222	
Geraniol	13	17.310	154		$\delta$ -cadinol	27	27.182	222	
Ciclosativeno	14	20.430	204		Patchouli alcohol	28	27.522	222	
					$\alpha$ -bisabolol	29	28.038	222	

\*Monoterpeno no identificado

\*Sesquiterpeno no identificado



4.2.2.2 Identificación de terpenos en *Agave angustifolia*

En la Figura 10 se muestra el Cromatograma del análisis de *Agave angustifolia* y la Tabla 4 muestra los terpenos identificados. En esta especie de *Agave* se identificaron 8 terpenos. Se observó que el limoneno (pico 2) es el monoterpreno más concentrado y sólo se identificó un sesquiterpeno, el trans-nerolidol (pico 8) en una bajísima concentración. Debido a que los terpenos identificados en esta especie de *Agave* se encuentran en muy baja concentración, la identificación se realizó por medio de los iones fragmento característicos.

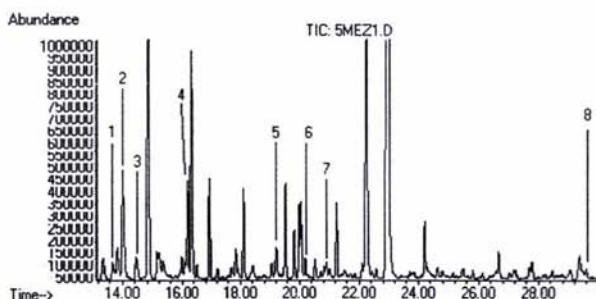


Figura 10. Cromatograma Iónico Total de *Agave angustifolia*. Las condiciones cromatográficas se indican en la Figura 6

Tabla 4. Identificación de terpenos en *Agave angustifolia*

Terpeno	Pico	Tr (min)	PM (g/mol)	Estructura química
p-cimeno	1	13.692	134	<chem>CC1=CC=C(C=C1)C(C)C</chem>
limoneno	2	13.914	136	<chem>CC1=CC(=C(C=C1)C)C=C</chem>
$\beta$ -trans-ocimeno	3	14.351	136	<chem>CC1=CC=CC=C1C=C</chem>
Linalol	4	16.097	154	<chem>CC1=CC=CC=C1C(C)C</chem>
$\alpha$ -terpineol	5	19.193	154	<chem>CC1=CC=CC=C1C(C)C</chem>
Nerol	6	20.295	154	<chem>CC1=CC=CC=C1C(C)C</chem>
Geraniol	7	20.923	154	<chem>CC1=CC=CC=C1C(C)C</chem>
Trans-nerolidol	8	29.497	222	<chem>CC1=CC=CC=C1C(C)C</chem>





### 4.2.2.3 Identificación de terpenos en *Agave salmiana*

En la Figura 11 se muestra el Cromatograma del análisis de *Agave salmiana* y la Tabla 5 muestran los terpenos identificados. En esta especie de *Agave* se identificaron 9 terpenos, de los cuales 8 son monoterpenos y un sesquiterpeno. Se observó que el linalol (pico 6) es el monoterpeno que está en mayor concentración. Aunque las señales correspondientes a  $\alpha$ -felandreno (pico 1),  $\alpha$ -terpineno (pico 2), ocimeno (pico 5) y trans-nerolidol (pico 9) están poco resueltas, debido a su baja concentración, no dificultó la identificación de los espectros de masas, pues se realizó mediante los iones fragmento característicos.

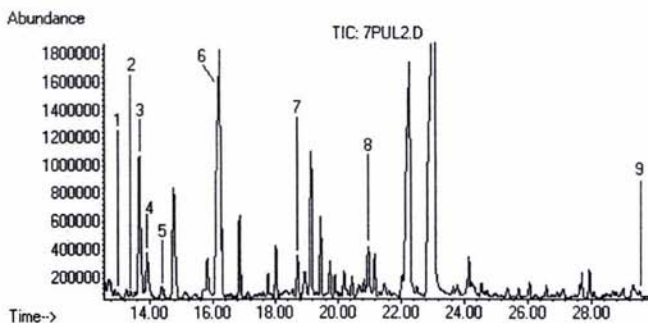


Figura 11. Cromatograma Iónico Total de *Agave salmiana*.  
Las condiciones cromatográficas se indican en la Figura 6



Tabla 5. Identificación de terpenos en *Agave salmiana*

Terpeno	Pico	Tr (min)	PM (g/mol)	Estructura química
$\alpha$ -felandreno	1	13.000	136	
$\alpha$ -terpineno	2	13.410	136	
p-cimeno	3	13.673	134	
Limoneno	4	13.916	136	
ocimeno	5	14.390	136	
Linalol	6	16.222	154	
4-terpineol	7	18.705	154	
Geraniol	8	20.950	154	
Trans-nerolidol	9	29.499	222	

#### 4.2.3 Comparación del perfil de terpenos en Agave

En la Figura 12 se muestra la comparación de los Cromatogramas del análisis de *Agave tequilana* Weber var azul (A), *Agave angustifolia* (B) y *Agave salmiana* (C), observándose que presentan un perfil cromatográfico diferente y el número de compuestos volátiles y semivolátiles que se extrajeron en *Agave tequilana* Weber var. azul es mayor que en *Agave angustifolia* y que en *Agave salmiana*. Además de los terpenos se identificaron alcoholes, aminas, aldehídos, cetonas, ácidos grasos y ésteres etílicos.

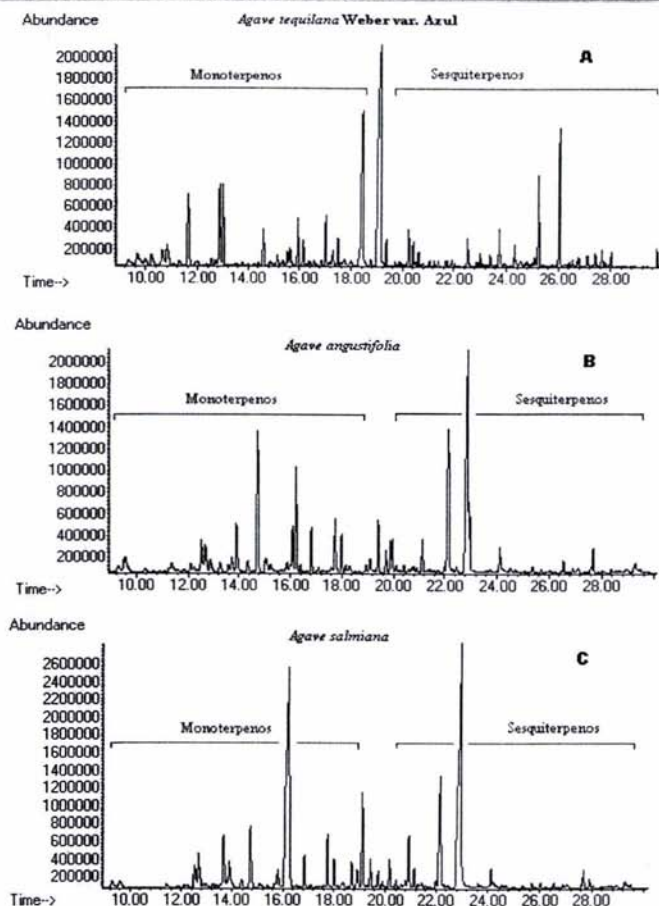


Figura 12. Cromatograma de *Agave tequilana* Weber var. azul (A), *Agave angustifolia* (B) y *Agave salmiana* (C). Las condiciones cromatográficas se indican en la Figura 6.

A fin de conocer la proporción en que se encuentran cada uno de los terpenos presentes en cada especie de *Agave* se determinó el porcentaje relativo de los terpenos en las tres especies de *Agave* estudiadas. La Tabla 6 muestra el % de Área Relativa de los terpenos identificados en cada una de las especies de *Agave* estudiadas.

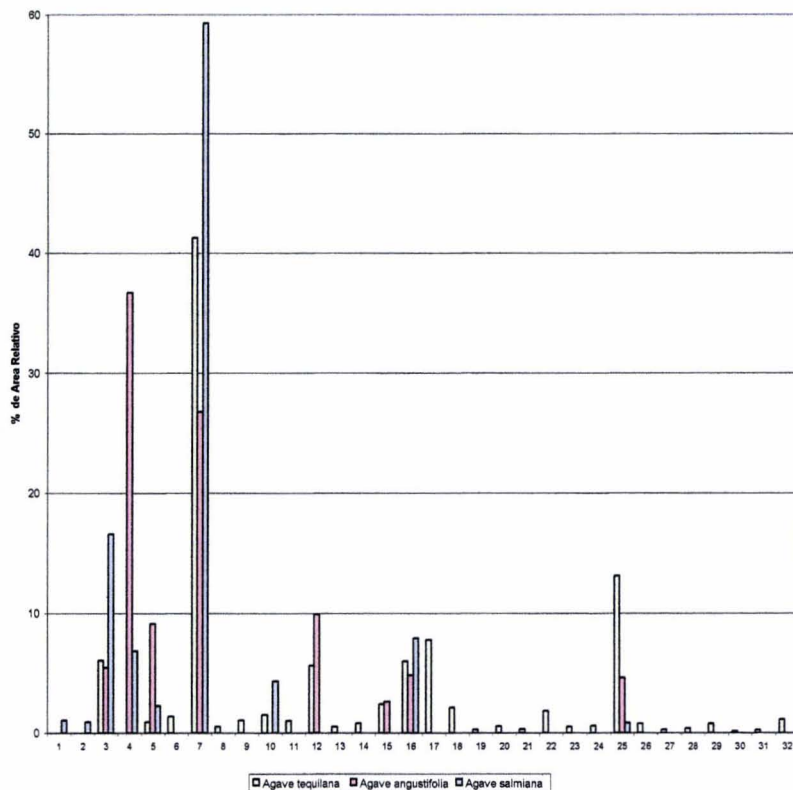


Figura 13. % de Área Relativa de terpenos en las tres especies de Agave estudiadas

Tabla 6. % de Área Relativa de terpenos en Agave

Terpeno	% de Área Relativa		
	Agave tequilana Weber var. azul	Agave angustifolia	Agave salmiana
1 α-felandreno	NI	NI	1.065
2 α-terpineno	NI	NI	0.921
3 p-cimeno	6.073	5.456	16.598
4 Limoneno	NI	36.700	6.850
5 β-trans-ocimeno	0.935	9.114	2.254
6 β-cis-ocimeno	1.391	NI	NI
7 Linalol	41.298	26.787	59.276
8 Carveol	0.512	NI	NI
9 *Monoterpeno	1.055	NI	NI
10 4-terpineol	1.518	NI	4.323
11 p-cimen-8-ol	1.005	NI	NI
12 α-terpineol	5.635	9.922	NI
13 p-ment-1-en-9-al	0.538	NI	NI
14 β-cidocitral	0.809	NI	NI
15 Nerol	2.429	2.612	NI
16 Geraniol	6.000	4.824	7.877
17 Ciclosativeno	7.788	NI	NI
18 Copaeno	2.114	NI	NI
19 *Sesquiterpeno	0.261	NI	NI
20 γ-muroleno	0.558	NI	NI
21 *Sesquiterpeno	0.308	NI	NI
22 δ-cadineno	1.840	NI	NI
23 δ-selineno	0.539	NI	NI
24 *Sesquiterpeno	0.608	NI	NI
25 Trans-nerolidol	13.103	4.586	0.836
26 *Sesquiterpeno	0.778	NI	NI
27 Calameneno	0.265	NI	NI
28 *Sesquiterpeno	0.380	NI	NI
29 Carotol	0.786	NI	NI
30 δ-cadinol	0.120	NI	NI
31 Patchouli alcohol	0.255	NI	NI
32 α-bisabolol	1.117	NI	NI

NI: No identificado





## CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

En la Figura 13 se muestra en forma gráfica la comparación del perfil de terpenos para cada especie de Agave. Observándose que el linalol es el monoterpreno más concentrado en el *Agave tequilana* Weber var azul (41.3%) y en *Agave salmiana* (59.3%); y el limoneno en *Agave angustifolia* (36.7%). De los sesquiterpenos, el trans-nerolidol es el más concentrado en las tres especies de Agave estudiadas (13.1%, 4.6% y 0.8% respectivamente). El p-cimeno se encuentra del doble de concentración en *Agave salmiana* (16.6%) que *Agave tequilana* Weber var azul (6.1%) y del triple de concentración en *Agave angustifolia* (5.5%). Por otro lado, el  $\beta$ -trans-ocimeno se encuentra poco más del triple de concentración en *Agave angustifolia* (9.1%) que *Agave salmiana* (2.3%) y diez veces más que *Agave tequilana* Weber var azul (0.9%). El 4-terpineol está aproximadamente tres veces más concentrado en *Agave salmiana* (4.3%) que en *Agave tequilana* Weber var azul (1.5%). Y el  $\alpha$ -terpineol se encuentra alrededor del doble de concentración en *Agave angustifolia* (9.9%) que en *Agave tequilana* Weber var azul (5.6%). Con respecto al contenido de geraniol, no existe diferencia significativa, entre *Agave tequilana* Weber var azul (6%), *Agave angustifolia* (4.8%) y *Agave salmiana* (7.9%).

Para conocer la variabilidad de las extracciones del método propuesto DAV-MEFS, se realizó el análisis estadístico a partir del promedio de las áreas para cada terpeno, la desviación estándar de las mismas y calculando el coeficiente de variación. Los datos se muestran en la Tabla 7.

## CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Tabla 7. % de variación de las tres especies de Agave

Terpeno	<i>Agave tequilana</i>			<i>Agave angustifolia</i>			<i>Agave salmiana</i>		
	Unidades	DE	CV	Unidades	DE	CV	Unidades	DE	CV
$\alpha$ -felandreno	NI	--	--	NI	--	--	2826400	114692	4.1
$\alpha$ -terpineno	NI	--	--	NI	--	--	2445238	265042	10.8
p-cimeno	10562137	--	53.8	3215901	3284866	102.1	44052337	13288788	30.2
Limoneno	NI	--	--	21632167	4514184	20.9	18180905	1266277	7.0
$\beta$ -trans-ocimeno	1626612	616794	37.9	5371805	859806	16.0	5981464	227626	3.8
$\beta$ -cis-ocimeno	2418655	852016	35.2	NI	--	--	NI	--	--
Linalol	71829545	10385195	14.5	15789124	723860	4.6	157321306	27992128	17.8
Carveol	891376	60842	6.8	NI	--	--	NI	--	--
*Terpeno	1834924	294313	16.0	NI	--	--	NI	--	--
4-terpineol	2640144	495195	18.8	NI	--	--	11472997	902024	7.9
p-cimen-8-ol	1748348	191835	10.9	NI	--	--	NI	--	--
$\alpha$ -terpineol	9800630	1784294	18.2	5848077	5398282	92.3	NI	--	--
p-ment-1-en-9-al	935850	24267	2.6	NI	--	--	NI	--	--
$\beta$ -ciclocitral	1406505	332564	23.7	NI	--	--	NI	--	--
Nerol	4225205	827706	19.6	1539678	425734	27.7	NI	--	--
Geraniol	10435890	2120617	20.3	2843303	89162	3.1	20906811	2810281	13.4
Ciclosativeno	13510488	2624840	19.4	NI	--	--	NI	--	--
Copaeno	3677650	637271	17.3	NI	--	--	NI	--	--
*Sesquiterpeno	453731	41951	9.3	NI	--	--	NI	--	--
$\gamma$ -muuroloeno	971282	200076	20.6	NI	--	--	NI	--	--
*Sesquiterpeno	535753	127579	23.8	NI	--	--	NI	--	--
$\delta$ -cadineno	3200416	559409	17.5	NI	--	--	NI	--	--
$\delta$ -selineno	938257	81467	8.7	NI	--	--	NI	--	--
*Sesquiterpeno	1058313	56468	5.3	NI	--	--	NI	--	--
Trans-nerolidol	22789867	3201067	14.1	2702932	160176	5.9	2218017	188734	8.5
*Sesquiterpeno	1353827	255177	18.9	NI	--	--	NI	--	--
Calameneno	461645	78623	17.0	NI	--	--	NI	--	--
*Sesquiterpeno	660548	122989	18.6	NI	--	--	NI	--	--
Carotol	1366682	208833	15.3	NI	--	--	NI	--	--
$\delta$ -cadinol	208180	15102	7.3	NI	--	--	NI	--	--
Patchouli alcohol	444363	33277	7.5	NI	--	--	NI	--	--
$\alpha$ -bisabolol	1943239	237674	12.2	NI	--	--	NI	--	--

DE: Desviación Estándar

CV: Coeficiente de variación

NI: No identificado.



## CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el análisis del *Agave tequilana* Weber var azul, la mayoría de los compuestos presentan un coeficiente de variación menor al 20%, lo cual es aceptable para análisis por MEFS de compuestos traza como son los terpenos en el Agave. Como se observa el p-cimeno (53.8%),  $\beta$ -trans-ocimeno (37.9%) y  $\beta$ -cis-ocimeno (35.2%) son los compuestos con más alto coeficiente de variación, probablemente debido a su volatilidad, ya que aumenta la susceptibilidad a desorberse de la fibra cuando ésta es transferida del vial donde está contenida la muestra al CG-EM, perdiéndose así una pequeña cantidad del compuesto, aún estando la fibra cubierta por la aguja de la jeringa. En el *Agave angustifolia*, sólo el p-cimeno (102.1%) y  $\alpha$ -terpineol (92.1%) presentan un coeficiente de variación muy elevado probablemente debido a que se encuentran en una concentración muy baja. En el *Agave salmiana*, todos los terpenos presentan un coeficiente de variación menor al 17%, excepto el p-cimeno (30.2%).

En las tres especies de *Agave* estudiadas, la variación más alta la presentó p-cimeno (53.8%, 102.1% y 30.2%). Los terpenos:  $\beta$ -trans-ocimeno (37.9%), geraniol (20.3%) y trans-nerolidol (14.1%) presentan mayor porcentaje de variación en el *Agave tequilana* Weber var azul. El limoneno (20.9%),  $\alpha$ -terpineol (92.3%) y nerol (27.7%) varía más en el *Agave angustifolia* que en el *Agave tequilana* Weber var azul. En el *Agave tequilana* Weber var azul varía más 4-terpineol (18.8%) que en *Agave salmiana* (7.9%). El linalol tiene el coeficiente de variación más alto en *Agave salmiana* (17.8%) que en *Agave tequilana* Weber var azul (14.5%) y *Agave angustifolia* (4.6%).

Después de conocer el perfil de terpenos de cada especie de *Agave* y compararlos entre sí, se continuó la investigación determinando el perfil de terpenos de cada bebida alcohólica. Cada especie de *Agave* se somete a diferentes procesos para la obtención, ya sea del tequila, del mezcal o del pulque. Según Mancilla-Margalli<sup>5</sup> algunos terpenos que se identificaron en el tequila provienen del *Agave*, otros son productos de la degradación por calor en la





## **CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

---

cocción de las "piñas". Lo mismo podría pasar con el mezcal. La fermentación juega un papel importante pues pueden producirse otros terpenos o desaparecer, bien por ser arrastrados por el CO<sub>2</sub>, por combinarse con otras moléculas, o por ser fijados a las paredes celulares de las levaduras<sup>12</sup>. En el caso de la producción del pulque, será interesante observar los resultados, pues solo se lleva a cabo la fermentación del "aguamiel".

### **4.3 Análisis de terpenos en bebidas alcohólicas**

#### **4.3.1 Extracción de terpenos en las bebidas alcohólicas**

Debido a que la concentración de etanol en estas bebidas es muy alta y la de terpenos es más baja, para la extracción de terpenos en tequila, mezcal y pulque se cambió la metodología y se utilizó ELL en lugar de DAV-MEFS debido a que la alta concentración de etanol daña la fibra y ésta se satura impidiendo la adsorción de los terpenos. Aunque en ELL se utilizaron disolventes para la extracción de terpenos, el uso adecuado de los disolventes, dependiendo de su polaridad, evitó la interferencia del etanol y permitió concentrar los terpenos. Otro problema al que se enfrentó, fue la desigualdad en las polaridades de los mismos terpenos, por lo que se probaron varios disolventes de diferentes polaridades para que se extrajeran la mayoría de éstos. Se realizaron extracciones con diclorometano, tetracloruro de carbono, n-Hexano y cloroformo, obteniéndose mejores resultados con el cloroformo debido a que se extrajeron mayor número de terpenos y compuestos volátiles y semivolátiles.

#### **4.3.2 Identificación de terpenos en bebidas alcohólicas**

##### **4.3.2.1 Identificación de terpenos en tequila**

En la Figura 14 se muestra el Cromatograma del análisis de tequila y la Tabla 8 muestra los terpenos identificados. En el tequila se identificaron 28 terpenos encontrándose 20 monoterpenos y 8 sesquiterpenos. Observándose que el monoterpeno  $\alpha$ -terpineol (pico 12) y el sesquiterpeno trans, trans-farnesol (pico 28) son los más abundantes. En general, la resolución de los compuestos es





## CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

aceptable, lo cual permitió una óptima identificación, excepto los picos 9 y 23 que fueron identificados como terpenos porque presentan los iones fragmento característicos, así como el intervalo de peso molecular, lo cual permitió clasificarlos en mono y sesquiterpeno.

Se identificaron el óxido de linalol (A), el óxido de linalol (B) y el óxido de  $\alpha$ -bisabolol los cuales no fueron identificados en el Agave fresco. Si se observa su estructura química (picos 2, 3 y 26, respectivamente), son compuestos heterocíclicos y por lo tanto, es una clara evidencia de que son productos de las reacciones de Maillard llevadas a cabo en la cocción del Agave<sup>5</sup>. En el caso del linalol, se oxida parcialmente pues sólo se ve disminuída su concentración, mientras aumenta la de sus respectivos óxidos. Sin embargo, el  $\alpha$ -bisabolol ya no se identificó bajo estas condiciones.

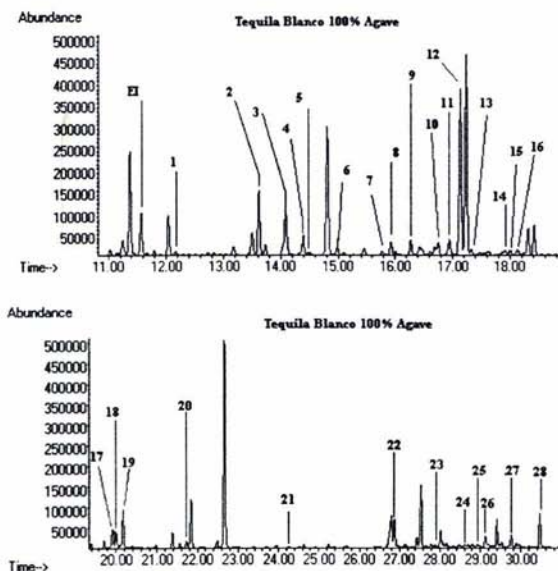


Figura 14. Cromatograma del análisis de tequila blanco 100% Agave.

Condiciones cromatográficas Programa de temperatura: Temperatura inicial 40 °C durante 1 min, incrementándose a 5 °C/min hasta 210 °C, e incrementándose nuevamente a 10 °C/min hasta 280 °C durante 5 min. Columna capilar de sílice fundida ZB-5M de 30 m x 0.32 mm x 0.25  $\mu$ m.

Tabla 8. Identificación de terpenos en tequila blanco 100% Agave

TERPENO	Pico	Tr (min)	PM (g/mol)	Estructura química	TERPENO	Pico	Tr (min)	PM (g/mol)	Estructura química
p-cimeno	1	12.161	134		β-ciclocitral	15	18.006	152	
Óxido de linalol (A)	2	13.617	170		β-citronellol	16	18.129	156	
Óxido de linalol (B)	3	14.089	170		Cuminol	17	19.917	150	
Linalol	4	14.396	154		Carvacrol	18	20.007	150	
Trans-p-2,8-metadien-1-ol	5	14.485	154		Timol	19	20.170	150	
p-ment-1-en-8-ol	6	14.988	154		Eugenol	20	21.725	164	
β-terpineol	7	15.770	154		β-farneseno	21	24.263	204	
Ocimenol	8	15.929	154		Trans-nerolidol	22	26.875	222	
*Monoterpeno	9	16.274	154		*Sesquiterpeno	23	28.018	222	
4-terpineol	10	16.756	154		γ-eudesmol	24	28.613	222	
p-cimen-8-ol	11	16.943	154		δ-cadinol	25	28.917	222	
α-terpineol	12	17.142	154		Óxido de bisabolol (II)	26	29.119	238	
γ-terpineol	13	17.328	154		Farnesol (+2H)	27	29.752	224	
p-ment-1-en-9-al	14	17.915	152		Trans, trans-farnesol	28	30.456	222	

\*Monoterpeno no identificado

\*Sesquiterpeno no identificado

## CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



En la Tabla 9 se muestra una comparación de los terpenos identificados en *Agave tequilana* Weber var azul y el tequila. Como puede observarse de los 29 terpenos que se identificaron en el *Agave tequilana* Weber var azul sólo 9 se encontraron en el tequila.

Tabla 9. Comparación de los terpenos identificados entre el tequila y el *Agave tequilana* Weber var azul

Tequila	<i>Agave tequilana</i> Weber var. azul	Tequila	<i>Agave tequilana</i> Weber var. azul
p-cimeno	✓	β-ciclocitral	✓
Óxido de linalol (A)	NI	β-citronellool	NI
Óxido de linalol (B)	NI	Cuminol	NI
Linalol	✓	Carvacrol	NI
Trans-p-2,8-metadien-1-ol	NI	Timol	NI
p-ment-1-en-8-ol	NI	Eugenol	NI
β-terpineol	NI	β-farneseno	NI
Ocimenol	NI	Trans-nerolidol	✓
*Monoterpeno	NI	*Sesquiterpeno	NI
4-terpineol	✓	γ-eudesmol	NI
p-cimen-8-ol	✓	δ-cadinol	✓
α-terpineol	✓	Óxido de bisabolol (II)	NI
γ-terpineol	NI	Farnesol (+2H)	NI
p-ment-1-en-9-al	✓	Trans, trans-farnesol	NI

✓terpeno identificado en ambas muestras

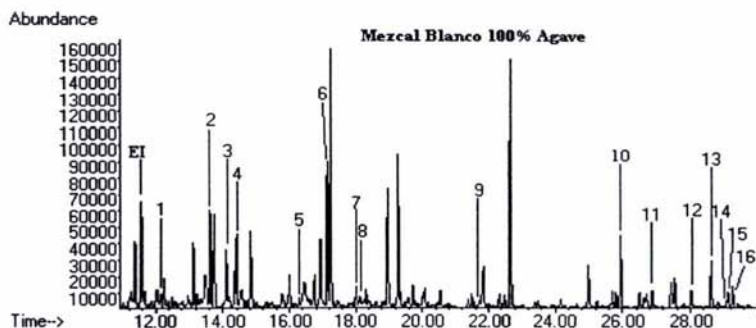
NI: terpeno no identificado en el Agave

Los terpenos no identificados en el tequila y que se identifican en Agave, probablemente se originen a partir de las reacciones químicas durante la cocción del Agave o por las reacciones bioquímicas llevadas a cabo por las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* durante la fermentación.



**4.3.2.2 Identificación de terpenos en mezcal**

En la Figura 15 se muestra el Cromatograma del análisis de mezcal y la Tabla 10 muestra los terpenos identificados. En el mezcal se identificaron 16 terpenos: 9 monoterpenos y 7 sesquiterpenos, los monoterpenos están en mayor concentración. Se observó que el  $\alpha$ -terpineol (pico 6) es el monoterpeno más concentrado y de los sesquiterpenos, el 2-metil-5-(2,6,6-trimetil-1-ciclohexen-1-il)-2,3-pentanediol (pico 10). En general la resolución de los 16 terpenos identificados fue aceptable, excepto los picos 5 y 12 que fueron identificados como terpenos porque presentan los iones fragmento característicos, así como el intervalo de peso molecular, lo cual permitió clasificarlos en mono y sesquiterpeno.



**Figura 15. Cromatograma del mezcal blanco 100% Agave.**  
Las condiciones cromatográficas se indican en la Figura 14



## CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Tabla 10. Identificación de terpenos en mezcal blanco 100% Agave

TERPENO	Pico	Tr (min)	PM (g/mol)	Estructura química
p-cimeno	1	12.154	134	
Oxido de linalol (A)	2	13.617	170	
Oxido de linalol (B)	3	14.089	170	
Linalol	4	14.394	154	
*Monoterpeno	5	16.294	136	
$\alpha$ -terpineol	6	17.131	154	
$\beta$ -ciclocitral	7	18.011	152	
$\beta$ -citronellol	8	18.124	156	
Eugenol	9	21.720	164	
2-metil-5-(2,6,6-trimetil-1-ciclohexen-1-il)-2,3-pentanediol	10	25.943	240	
Trans-nerolidol	11	26.872	222	
*Sesquiterpeno	12	28.017	222	
$\gamma$ -eudesmol	13	28.611	222	
$\beta$ -eudesmol	14	29.063	222	
$\alpha$ -eudesmol	15	29.118	222	
Eudesmol (+2H)	16	29.256	224	

\*Monoterpeno no identificado

\*Sesquiterpeno no identificado

## CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



En la Tabla 11 se muestra una comparación de los terpenos identificados en *Agave angustifolia* y el mezcal. Como puede observarse de los 16 terpenos que se identificaron en el *Agave angustifolia* sólo 4 se encontraron en el mezcal.

Tabla 11. Comparación de los terpenos identificados entre *Agave angustifolia* y el mezcal

Mezcal	<i>Agave angustifolia</i>	Mezcal	<i>Agave angustifolia</i>
p-cimeno	✓	Eugenol	NI
Oxido de linalol (A)	NI	2-metil-5-(2,6,6-trimetil-1-ciclohexen-1-il)-2,3-pentanediol	NI
Oxido de linalol (B)	NI	Trans-nerolidol	✓
Linalol	✓	*Sesquiterpeno	NI
*Monoterpeno	NI	$\gamma$ -eudesmol	NI
$\alpha$ -terpineol	✓	$\beta$ -eudesmol	NI
$\beta$ -ciclocitral	NI	$\alpha$ -eudesmol	NI
$\beta$ -citronellol	NI	Eudesmol (+2H)	NI

✓ terpeno identificado en ambas muestras

NI: terpeno no identificado en el Agave

Al igual que en el tequila, en la producción del mezcal se llevan a cabo las etapas de cocción y fermentación lo cual probablemente influya en la presencia o ausencia de terpenos en el mezcal y no así en el Agave fresco.

### 4.3.2.3 Identificación de terpenos en pulque

Para el análisis del pulque se utilizó la misma técnica de extracción que para el tequila y el mezcal sin embargo, se extrajeron pocos compuestos volátiles y no se extrajeron terpenos. Una posibilidad puede ser que el pulque es una bebida alcohólica totalmente diferente de las anteriores, y, principalmente no es una bebida destilada. Se realizaron algunas modificaciones a la técnica para tratar de extraer y concentrar los terpenos, como centrifugar la muestra y aumentar el volumen de muestra pero no se logró mejorar la extracción. Como se observa en la Figura 16, el compuesto más abundante se identificó como el feniletíl alcohol

## CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



(pico 6). En la Tabla 12 se muestran algunos compuestos identificados que se encuentran en muy baja concentración.

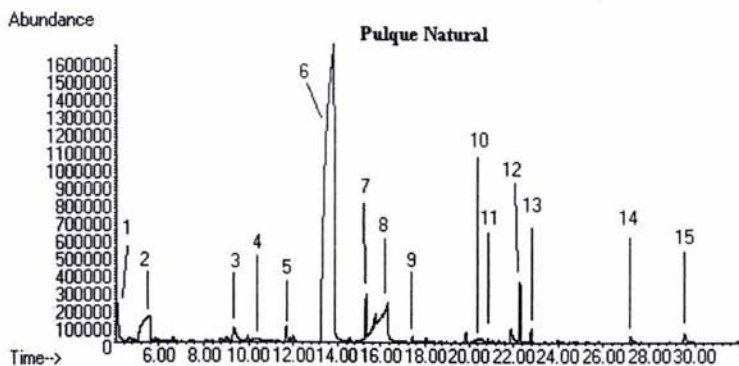


Figura 16. Cromatograma del pulque natural.  
Las condiciones cromatográficas se indican en la Figura 14

Tabla 12. Identificación de compuestos en el pulque

COMPUESTO	PICO	Tr (min)	PM (g/mol)
1-pentanol	1	4.12	88
N-nitro-1-butamina	2	5.54	118
3-(metilitio)-1-propanol	3	9.39	106
Ácido hexanoico	4	10.45	116
Etil 2-hidroxi-4-metilpropanoato	5	11.68	160
Feniletíl alcohol	6	13.74	122
Dietil éster del ácido butanedioico	7	15.35	174
Monoetil éster del ácido butanedioico	8	16.25	146
2-feniletíl acetato	9	17.41	164
Ácido decanoico	10	20.56	172
Etil 9-decenoato	11	20.87	198
4-hidroxifeniletíl alcohol	12	21.92	138
2-feniletílmoxi acetato	13	22.79	194
Ácido (4-hidroxi-3-metoxifenil)acético	14	27.19	182
3-(2-hidroxietyl)indol	15	29.55	161



Por lo tanto se infiere que el aroma de esta bebida no se ve influenciada por la presencia de terpenos, sino que existen otros compuestos que le dan el aroma y sabor característico pero muy distinto al tequila y al mezcal. Por otro lado, los terpenos que se encontraron en el *Agave salmiana* probablemente se utilizaron en la fermentación<sup>13</sup>, para dar lugar a otros compuestos.

### 4.3.3 Comparación del perfil de terpenos en Bebidas Alcohólicas

La Figura 17 muestra la comparación de los perfiles del análisis del tequila (A), mezcal (B) y pulque (C). Observándose mayor número y concentración de compuestos volátiles y semivolátiles en el tequila.



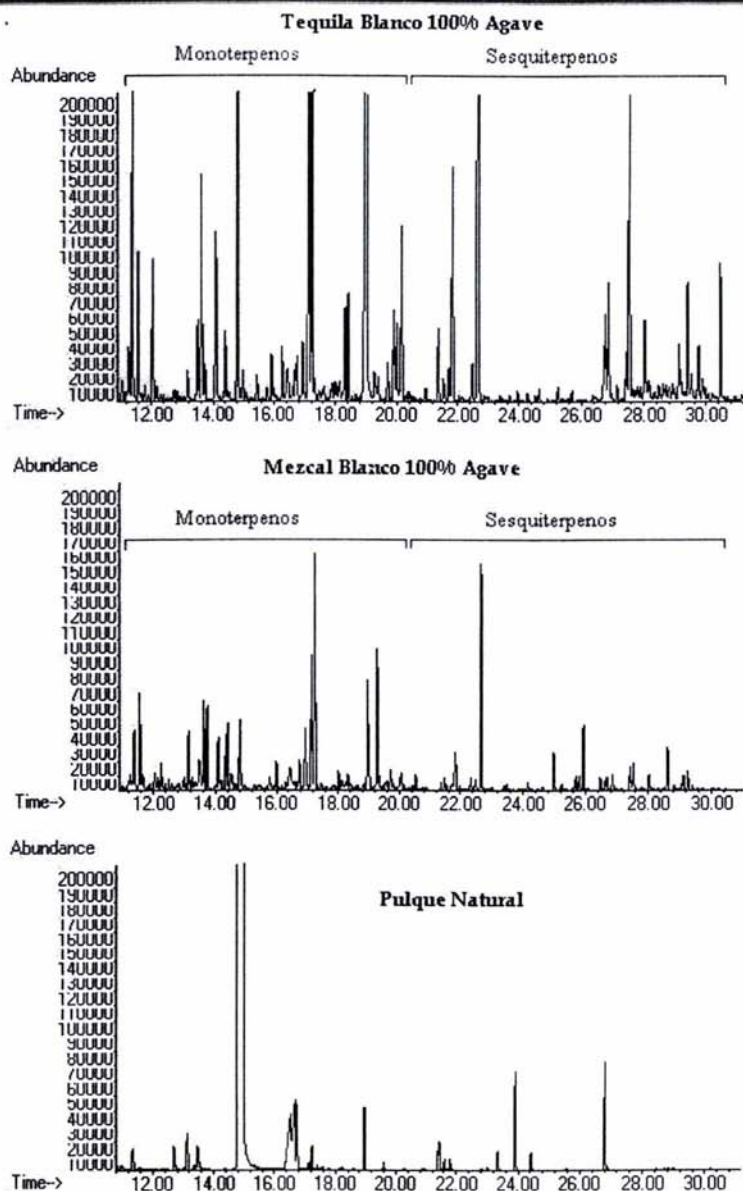


Figura 17. Cromatograma de las tres bebidas alcohólicas estudiadas.  
 Las condiciones cromatográficas se indican en la Figura 14.



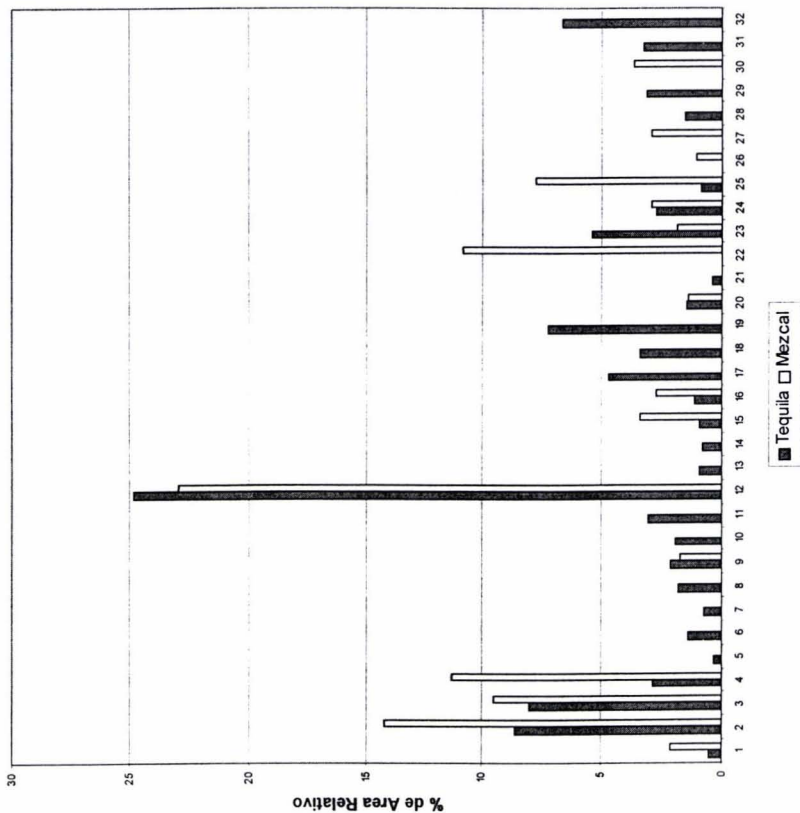
Para tener un orden de magnitud de la cantidad de terpenos presentes, se determinó el % de Área Relativa de los terpenos en las bebidas alcohólicas. La Tabla 13 muestra la comparación de los terpenos identificados en el tequila y en el mezcal.

La Figura 18 ilustra claramente que el  $\alpha$ -terpineol es el terpeno más abundante en el tequila (24.8%) y en el mezcal (22.9%). También el óxido de linalol (A) y el óxido de linalol (B) se encuentran en concentraciones relativamente altas en el tequila (8.6% y 8%) y en el mezcal (14.2% y 9.5%). El linalol es mucho más abundante en el mezcal (11.3%) que en el tequila (2.8%). Tomando en cuenta el tiempo de retención y el espectro de masas del Monoterpeno(\*), probablemente sea el mismo que se encontró en el tequila como en el mezcal. En el caso del 2-metil-5-(2,6,6-trimetil-1-ciclohexen-1-il)-2,3-pentanediol, es un sesquiterpeno abundante en el mezcal (10.8%) que se encuentra casi a la misma proporción que el linalol (11.3%). Este compuesto no se encuentra en el tequila. Otra diferencia probablemente importante entre el tequila y el mezcal es el grupo de isómeros del eudesmol ( $\alpha$ -eudesmol,  $\beta$ -eudesmol, y dihidro-eudesmol) que solamente se identificaron en el mezcal. El  $\gamma$ -eudesmol se encuentra en pequeña cantidad en el tequila (0.9%) pero está aproximadamente diez veces más concentrado en el mezcal (7.7%).

**Tabla 13. % de Área Relativa de terpenos en las bebidas alcohólicas.**

No de Pico	TERPENO	Tequila	Mezcal
1	p-cimeno	0.532	2.105
2	Oxido de linalol (A)	8.571	14.239
3	Oxido de linalol (B)	7.988	9.471
4	Linalol	2.809	11.341
5	Trans-p-2,8-metadien-1-ol	0.321	NI
6	Mircenol	1.364	NI
7	β-terpineol	0.747	NI
8	Ocimenol	1.750	NI
9	Monoterpeno	2.117	1.675
10	4-terpineol	1.890	NI
11	p-cimen-8-ol	3.008	NI
12	α-terpineol	24.838	22.952
13	γ-terpineol	0.903	NI
14	p-ment-1-en-9-ol	0.774	NI
15	β-citocetral	0.930	3.344
16	β-citronelol	1.142	2.661
17	Cuminal	4.656	NI
18	Carvacrol	3.312	NI
19	Timol	7.192	NI
20	Eugenol	1.457	1.388
21	β-farneseno	0.385	NI
22	2-metil-5-(2,6,6-trimetil-1-ciclohexen-1-il)-2,3-pentadienol	NI	10.843
23	Trans-nerolidol	5.347	1.856
24	*Sesquiterpeno	2.674	2.912
25	γ-eudesmol	0.882	7.709
26	β-eudesmol	NI	1.038
27	α-eudesmol	NI	2.886
28	β-cadinol	1.505	NI
29	Oxido de bisabolol (II)	3.060	NI
30	Eudesmol (+2H)	NI	3.562
31	Farnesol (+2H)	3.202	NI
32	Trans, trans-farnesol	6.639	NI

NI: No identificado



**Figura 18. % Relativo de terpenos en tequila y el mezcal (ambos tipo blanco y 100% Agave)**



### 4.3.4 Cuantificación de terpenos en las Bebidas Alcohólicas

La cuantificación de terpenos se realizó para el tequila y el mezcal. Ésta se llevó a cabo por medio de los factores de respuesta relativos que se muestran en la Tabla 14 y Tabla 15.

Tabla 14. Factores de Respuesta Relativos (n=3)

TERPENO	C <sub>s</sub> (mg/L)	C <sub>s</sub> rel	A <sub>x</sub> rel	Fr <sub>r</sub>
α-felandreno (EI)	1.860			
Linalol	1.471	0.791	0.541	0.684
4-terpineol	1.347	0.724	0.616	0.851
α-terpineol	1.358	0.730	0.367	0.503
Eugenol	1.421	0.764	0.460	0.602
Cis-nerolidol	1.458	0.784	0.435	0.555
Tran,trans-farnesol	1.652	0.888	0.250	0.281

Con los valores anteriores se calculó la concentración de cada uno de los terpenos en el tequila y en el mezcal. Los datos se muestran en la Tabla 15 y la Tabla 16.

Tabla 15. Cuantificación de terpenos en tequila blanco 100% Agave.

Terpeno	A <sub>x</sub> rel	C <sub>x</sub> rel (mg/L)	C <sub>x</sub> (µg/L)
Linalol	0.333	0.905	75.4 ± 0.023
4-terpineol	0.168	0.367	30.6 ± 0.022
α-terpineol	4.406	16.308	1359.0 ± 0.129
Eugenol	0.267	0.825	68.8 ± 0.018
Trans-nerolidol	0.677	2.268	189.0 ± 0.073
Trans,trans-farnesol	1.161	7.675	639.5 ± 0.371

Tabla 16. Cuantificación de terpenos en mezcal blanco 100% Agave.

Terpeno	A <sub>x</sub> rel	C <sub>x</sub> rel (mg/L)	C <sub>x</sub> (µg/L)
linalol	0.489	1.330	155.2 ± 0.016
4-terpineol	--	--	NI
a-terpineol	1.355	5.015	585.0 ± 0.100
eugenol	0.077	0.236	27.6 ± 0.015
trans-nerolidol	0.123	0.414	48.3 ± 0.028
(E,E)-farnesol	--	--	NI

NI. No identificado





Con estos datos se compararon las concentraciones de los terpenos en cada bebida alcohólica, los resultados se muestran en forma gráfica en la Figura 19.

El terpeno más abundante en las dos bebidas alcohólicas es el  $\alpha$ -terpineol. Observándose que el tequila (1718.7  $\mu\text{g/L}$ ) contiene aproximadamente el doble de la concentración que el mezcal (739.9  $\mu\text{g/L}$ ). El linalol resultó estar más concentrado en el mezcal (115.2  $\mu\text{g/L}$ ) que en el tequila (75.4  $\mu\text{g/L}$ ). El trans-nerolidol está cuatro veces más concentrado en el tequila (247.3  $\mu\text{g/L}$ ) que en el mezcal (63.2  $\mu\text{g/L}$ ). Aunque la concentración del eugenol es muy baja comparada con los otros terpenos cuantificados, el tequila contiene un poco más del doble (94.3  $\mu\text{g/L}$ ) que el mezcal (37.8  $\mu\text{g/L}$ ). Por otro lado, el mezcal no contiene 4-terpineol ni trans,trans-farnesol. Éste sesquiterpeno está en una concentración relativamente alta en el tequila.

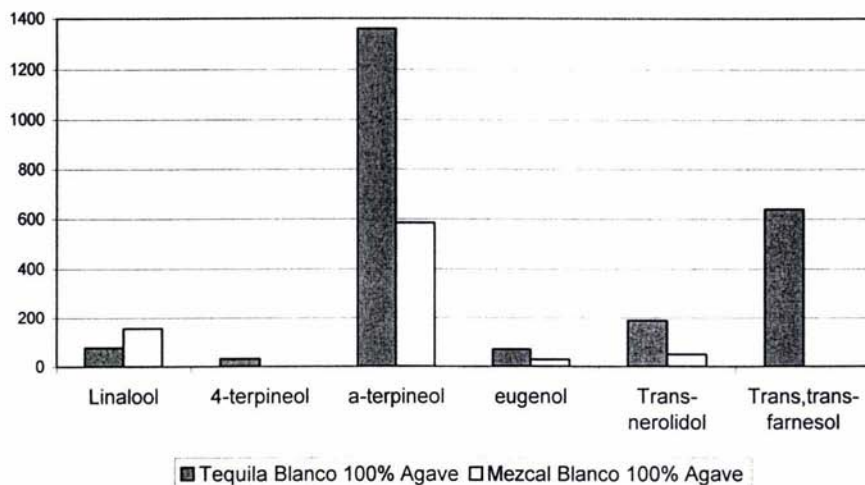


Figura 19. Comparación de la concentración de terpenos en tequila y mezcal.

En el caso del tequila y del mezcal, los óxidos de los terpenos que se encontraron (linalol y  $\alpha$ -bisabolol) demuestran que en la cocción, debido a las altas



## **CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

---

temperaturas, se favorecieron las reacciones de oxidación. Debido a que en el pulque, las especies de levaduras que se utilizan para la fermentación del aguamiel, son diferentes a las usadas en la producción de tequila y mezcal (*Saccharomyces cerevisiae*), la fermentación puede ser un punto crítico para la desaparición de los terpenos.

# CONCLUSIONES





## CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES

---

1. Con este trabajo se logró proponer un método de análisis y obtención del perfil de terpenos: DAV-MEFS para el *Agave tequilana* Weber var. azul, el *Agave angustifolia* y el *Agave salmiana* (materia prima), y otro método por ELL para el tequila, el mezcal y el pulque (producto final), los cuales presentaron principalmente dos ventajas, la extracción y concentración de la mayoría de los terpenos, y la facilidad del manejo para el análisis por CG-EM. Es importante mencionar que las NOM-006-SCFI-1994 para tequila y NOM-070-SCFI-1994 para mezcal no tienen contemplados dichos métodos en los parámetros de control de calidad. Por lo tanto, estos resultados podrían colaborar tanto a nivel científico como industrial, en el estudio de dichas especies y bebidas alcohólicas.
2. El perfil de terpenos de las tres especies de *Agave* estudiadas es diferente: en *Agave tequilana* Weber var. azul se identificaron 29 terpenos, en *Agave angustifolia* 8 terpenos, y en *Agave salmiana* 9 terpenos.
3. El p-cimeno,  $\beta$ -trans-ocimeno, linalol, geraniol y trans-nerolidol se encuentran en las tres especies de *Agave* pero a diferente concentración.
4. El perfil de terpenos del tequila y del mezcal es diferente: en el tequila se identificaron 28 terpenos y en el mezcal 16 terpenos.
5. El p-cimeno, óxido de linalol (A), óxido de linalol (B), linalol,  $\alpha$ -terpineol,  $\beta$ -ciclocitral,  $\beta$ -citronelol, eugenol, tras-nerolidol,  $\gamma$ -eudesmol, monoterpene\* y sesquiterpene\* se encuentran en tanto en el tequila como en el mezcal aunque a diferente concentración. Y el 2-metil-5-(2,6,6-trimetil-1-ciclohexen-1-il)-2,3-pentanediol (sesquiterpene) sólo se identificó en el mezcal.
6. En el pulque no se identificaron terpenos, probablemente se hayan perdido en la fermentación.
7. De los 29 terpenos que se identificaron en el *Agave tequilana* Weber var. azul, 9 se identificaron en el tequila. Estos son: p-cimeno, linalol, 4-terpineol, p-cimen-8-ol,  $\alpha$ -terpineol, p-ment-1-en-9-al,  $\beta$ -ciclocitral, tras-nerolidol y  $\delta$ -cadinol.
8. De los 8 terpenos identificados en el *Agave angustifolia*, 4 terpenos se identificaron en el mezcal: p-cimeno, linalol,  $\alpha$ -terpineol y trans-nerolidol.



# BIBLIOGRAFÍA





- (1) Granados, D, S. Los Agaves en México. Universidad Autónoma de Chapingo, 1ª Edición. México, 1993.
- (2) López, M. G. Tequila Aroma. *Flavor Chemistry of Ethnic Foods*; Shaidi, F., Ho, C.-T., Eds.; Plenum: Nueva York, 1999; pp 211-217.
- (3) Cedeño, M. Tequila Production. *Crit. Rev. Biotechnol.* 15, 1-11. 1995.
- (4) Benn, S. M. & Peppard, T. L. Characterization of Tequila Flavor by Instrumental and Sensory Analysis. *J. Agric. Food Chem.* 44, 557-566, 1996.
- (5) Mancilla-Magali, N.A. & López, M. G. Generation of Maillard Compounds from Inulin during the Thermal Processing of *Agave tequilana* Weber var. Azul. *J. Agric. Food Chem.* 50, 806-812, 2002
- (6) Bobadilla, A. Tesis de maestría (en revisión). UNAM, México, D. F.
- (7) Norma Oficial Mexicana. NOM-006-SCFI-1994. Bebidas Alcohólicas. Tequila. Especificaciones.
- (8) García, M. A. Con sabor a maguey. Instituto de Biología, UNAM. México, 1998. p. 8-22.
- (9) Norma Oficial Mexicana. NOM-070-SCFI-1994, Bebidas alcohólicas-Mezcal-Especificaciones.
- (10) El maguey: árbol de las maravillas. Coedición: Gobierno del Edo. de Hidalgo e Instituto Nacional Indigenista, México, 1988. p. 61-100, 121-130.
- (11) García-Garibay, M, López-Munguía, A., Ramírez-Quintero, R. Biotecnología Alimentaria, Limusa, 1ª edición, México, 1993. p. 263-266.
- (12) Suomalainen H., Lehtonen, M. The production of aroma compounds by yeast, *J. Inst Brew*, 85, 149, 1979.
- (13) Pinder, A. R. The Chemistry of the Terpenes. Chapman & Hall Ltd, 1a edición, Londres, 1960. p. 1-7
- (14) McMurry J. Organic Chemistry. Brooks / Cole Publishing Company, 3ª Edición, U.S.A., 1992. p. 1066-1070.



- (15) Díaz, M., Pérez, M., Cabezudo, M. Supercritical carbon dioxide extraction of volátiles from spices. Comparison with simultaneous distillation-extraction. *J. Chrom A*, Vol 947, Issue 1, 23-29, 2002.
- (16) Ayra Jayatilaka, *Analítica Química Acta*, Vol 302, Issues 2-3, 147-162, 1995.
- (17) Viveros, J. A. Aplicación de la técnica por destilación con arrastre de vapor de agua a pétalos de rosa. Tesis Licenciatura, UNAM, México, D. F., cap. 4, 2002
- (18) Zhang, Z., Yang, M. J., Pawliszyn, J. Solid-Phase Microextraction. *Analytical Chemistry*, Vol 66, No. 17, 1994.
- (19) Rojas, I. S. Microextracción líquido-líquido para la cuantificación de compuestos fenólicos en agua por cromatografía de gases. Tesis Licenciatura, UNAM, México, D.F., p. 21- 24. 1998.
- (20) Pawliszyn, J. Solid Phase Microextraction. Wiley-VCH, Inc., 1a Edición, U.S.A., 1997.
- (21) McNair, H. M. & Miller, J. M. Basic Gas Chromatography. John Wiley & Sons, Inc. 1a Edición. U. S. A, 1998.
- (22) Jáuregui, J. F. Mass Spectrometry Techniques and Applications. Ed John Wiley & Sons Inc., USA, 1971, p. 35-45.
- (23) Skoog, D. A., Holler, F. J., Nieman, T. A. Principios de Análisis Instrumental, McGraw-Hill, 5ª Edición, España, 2001. p. 271-272, 274-275.
- (24) Rubinson, K. A. & Rubinson, J. F. Análisis Instrumental, Ed Prentice Hall, España, 2001. p. 548-549.
- (25) Silverstein, R. M., Clayton, G., Basseley, E. Spectrometric Identification of Organic Compounds, 5a ed. Ed. John Wiley & Sons Inc., USA, 1991, p. 159-161.
- (26) National Institute of Standards and Technology

ANEXO







Foto 1. Siembra del Agave. Códice *Tonalmatlnahuatl*



Foto 2. Cultivo de *Agave tequilana* Weber var. azul. Jalisco

ANEXO

---

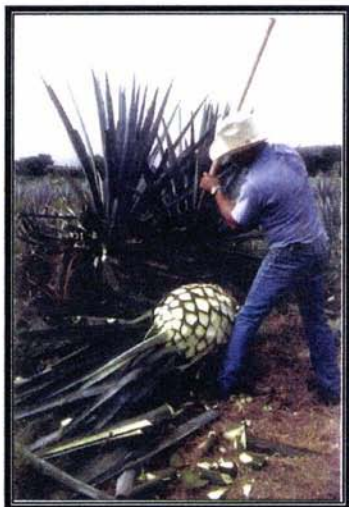


Foto 3. "Jima" del *Agave tequilana* Weber var. azul

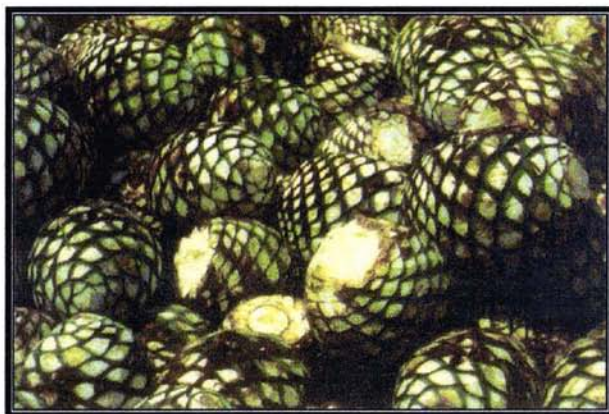


Foto 4. "Piñas" de *Agave tequilana* Weber var. Azul

## ANEXO

---



Foto 5. Alambiques de destilación. Tequila Sauza

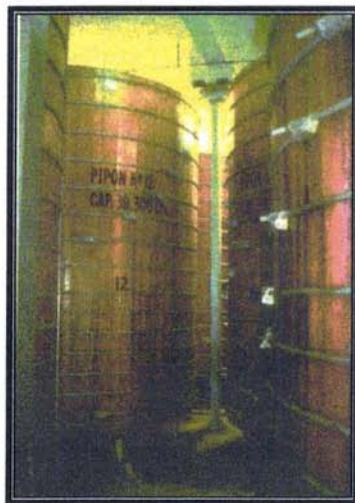


Foto 6. Barricas de roble para añejamiento. Tequila Sauza

## ANEXO

---



Foto 7. Cultivo de *Agave angustifolia*. Oaxaca



Foto 8. "Piñas" de *Agave angustifolia*



## ANEXO

---



Foto 9. Horno revestido de piedras para cocer las piñas de *Agave angustifolia*



Foto 10. Tinas de fermentación. Oaxaca

## ANEXO

---



Foto 11. Alambique de destilación. Oaxaca



Foto 12. Cultivo de *Agave salmiana*. Hidalgo

ANEXO

---



Foto 13. Cara del *Agave salmiana* para extraer el "aguamiel"



Foto 14. Raspado del tronco para formar el "cajete"

ANEXO

---



Foto 15. Extracción del aguamiel con "acocote"



Foto 16. "Tinacal", lugar donde se fermenta el aguamiel



## ANEXO

---

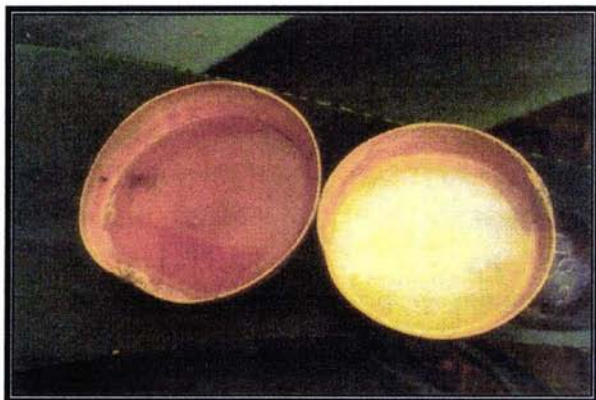


Foto 17. Aguamiel y pulque en jícaras tradicionales