

00550



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN  
CIENCIAS QUÍMICAS**

**TEMA DE TESIS**

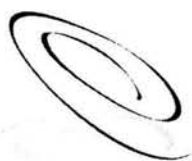
“Caracterización de terpenos en el *Agave tequilana* Weber variedad azul y su evolución en la producción de tequila”.

TESIS  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA**

**Q.A. ANDRÉS ADRIAN BOBADILLA PONCE**



Ciencias  
Químicas

TUTOR: M. en C. SANTIAGO CAPELLA VIZCAÍNO. 2004



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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: Dra. Luz Elena Vera Ávila  
Vocal: Dr. José Mariano García Garibay  
Secretario: Dr. Baldomero Esquivel Vázquez  
1er. Suplente: Dr. Mariano Martínez Vázquez  
2do. Suplente: Dra. Martha Patricia García Camacho


### Sitio donde se desarrollo el tema:

Facultad de Química, Edificio B, UNAM.

Tutor:

  
\_\_\_\_\_  
M. en C. Santiago Capella Vizcaíno.

Alumno:

  
\_\_\_\_\_  
Q.A. Andrés A. Bobadilla Ponce.

El presente trabajo de tesis se realizó en el laboratorio 101 de la División de Estudios de Postgrado, edificio B, de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México. Teniendo como tutor al M. en C. Santiago Capella Vizcaíno y con el apoyo del Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y de la dirección General de Estudios de Postgrado (DGEP).



## Índice

<b>I. Resumen</b>	3
<b>II. Introducción</b>	4
<b>III. Antecedentes</b>	5
<b>1. Agave</b>	5
1.1. Clasificación taxonómica	5
1.2. Descripción	6
1.3. Fitogeografía	8
1.4. Cultura y utilización del Agave	9
<b>2. Tequila</b>	10
2.1. Historia del tequila	10
2.1.1. Origen y época colonial	10
2.1.2. Siglo XIX	12
2.1.3. Porfiriato	13
2.1.4. Siglo XX	15
2.2. Proceso de producción del tequila	16
2.2.1. Cocimiento	16
2.2.2. Molienda y extracción de mieles	19
2.2.3. Fermentación	20
2.2.4. Destilación	22
2.3. Aspectos socio-económicos	24
2.3.1. Económicos	24
2.3.2. Legales	28
<b>3. Compuestos volátiles responsables del aroma en los alimentos</b>	31
3.1. Importancia	31
3.2. Principales compuestos	32
3.3. Estrategias de análisis	32
<b>4. Terpenos</b>	34
4.1. Definición y clasificación	34
4.2. Biosíntesis	36
4.3. Técnicas de extracción	41
4.4. Cromatografía de gases	48
<b>IV. Objetivos</b>	50
<b>V. Desarrollo experimental</b>	51
<b>1. Materiales y equipo</b>	51
1.1. Reactivos y muestras	51
1.2. Equipos	52

<b>2. Métodos</b>	53
2.1. Separación cromatográfica de terpenos	53
2.2. Determinación de los Índices de Kóvats	54
2.3. Espectrometría de masas	55
2.4. Técnicas de extracción de terpenos	55
2.4.1. Agave	55
2.4.1.1. Extracción por arrastre de vapor (EAV)	55
2.4.1.2. Extracción con disolvente (ED)	56
2.4.1.3. Micro – Extracción en Fase Sólida (MEFS)	56
2.4.1.4. Extracción por arrastre de vapor (EAV) y Micro – Extracción en Fase Sólida (MEFS)	57
2.4.1.5. Extracción por arrastre de vapor (EAV) y Extracción Líquido – Líquido (ELL)	57
2.4.2. Optimización del método de extracción	57
2.4.2.1. Determinación del tiempo de extracción por arrastre de vapor	57
2.4.2.2. Determinación del tipo de fibra	58
2.4.2.3. Determinación del tiempo de equilibrio (líquido – vapor) y de la temperatura de extracción	58
2.4.2.4. Determinación del tiempo de extracción en “Headspace” y el tiempo de desorción térmica	59
2.4.3. Mosto	60
2.4.3.1. Determinación del tiempo de extracción en Headspace	60
2.4.4. Mosto muerto	61
2.4.4.1. Determinación del tiempo de extracción en Headspace	61
2.4.5. Ordinario	62
2.4.5.1. Micro – Extracción en Fase Sólida - Headspace (MEFS- HS)	62
2.4.5.2. Micro – Extracción en Fase Sólida - Inmersión Directa (MEFS-ID)	62
2.4.5.3. Extracción Líquido – Líquido (ELL)	62
2.4.6. Tequila	63
2.4.6.1. Procedimientos	63
 <b>VI. Resultados</b>	 65
<b>VII. Conclusiones</b>	93
<b>VIII. Recomendaciones</b>	94
<b>IX. Referencias bibliográficas</b>	95
<b>X. Anexos</b>	100

## I. Resumen

El tequila es un fruto del sincretismo de dos culturas: la prehispánica y la europea. Actualmente, el tequila es un producto ampliamente reconocido y aceptado en el mundo, por lo que se pudo obtener la denominación de origen..

Uno de los puntos críticos en la denominación de origen, es la caracterización de su sabor, al igual que es importante definir su origen. Para esto se puede uno basar en las materias primas que se utilizan, en este caso sólo se permite utilizar el *Agave tequilana* Weber variedad azul. Los terpenos al presentarse en la mayoría de las plantas (Hans-Walter 1997) pueden ser utilizados para dar un perfil del sabor y como posibles marcadores de origen, que en este caso se trata del agave.

Se probaron varias técnicas de extracción para obtener la mayor cantidad de terpenos presentes en el agave. La mejor combinación encontrada fue la técnica de extracción por arrastre de vapor en conjunto con la microextracción en fase sólida del “headspace” o espacio de cabeza (MEFS-HS), utilizando la fibra de PDMS/DVB. Para el proceso de elaboración del tequila se monitoreo el mosto y mosto muerto utilizando la técnica de MEFS-HS, utilizando la misma fibra. Para los destilados (el ordinario y el tequila) se utilizó la extracción líquido-líquido con diclorometano. Para la separación y caracterización de los terpenos se utilizó un cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas, estándares de terpenos e índices de Kóvats. Para el *Agave tequilana* Weber variedad azul se identificaron 28 terpenos, de los cuales 13 corresponden a monoterpenos y 15 corresponden a sesquiterpenos. También se pueden dividir en hidrocarburos (19) y oxigenados (9), éstos últimos presentan mayor interés por las características sensoriales. Para el caso del mosto y mosto muerto la cantidad de terpenos detectados fue menor, pero se identificó el farnesol, el cual no se había detectado en el agave. Para los destilados la cantidad de terpenos que se pudieron identificar fueron 8; apareciendo 2 terpenos que no se habían detectado antes, los óxidos de linalol, los cuales se formaron durante el proceso de destilación. Los terpenos de mayor interés son: el linalol, sus óxidos (I y II), 4-terpineol,  $\alpha$ -terpineol, nerolidol y el farnesol, ya que nos pueden indicar el origen del destilado.

## II. Introducción

En nuestro país existen pocas industrias con tanto arraigo y tradición como la industria tequilera, que es considerada como pionera de la región occidental del país (Luna-Zamora 1991).

El tequila fue el primer producto que trascendió las fronteras de México como uno de los productos de mayor reconocimiento a nivel mundial, cuya aceptación ha ido creciendo, tanto en el mercado nacional como en el internacional (Luna-Zamora 1991).

Con la aceptación de la denominación de origen por varios países, se ha vuelto cada vez más urgente hacer una caracterización fisicoquímica completa de esta bebida.

Existen pocos estudios publicados sobre los compuestos volátiles del tequila y su relación con los aspectos sensoriales del producto (ver referencias en Benn y Peppard 1996).

En otras bebidas alcohólicas se han podido identificar varios compuestos, no obstante que al estar presentes en muy pequeñas cantidades tienen una influencia importante en el aspecto sensorial (Arrhenius *et al.* 1996). La presencia y concentración de estos compuestos volátiles depende del tipo y calidad de la materia prima, las condiciones del proceso, el tipo de equipo, la cepa de levadura utilizada, las condiciones de maduración y el almacenamiento, entre otros parámetros (Escudero y Etievant 1999). En particular se ha encontrado en estudios realizados para varios tipos de bebidas, que el tipo de levadura y las condiciones de fermentación son los factores más importantes en la formación de compuestos volátiles en las bebidas alcohólicas (Ferreira *et al.* 1999).

El tequila tiene ahora muchas oportunidades en el mercado internacional, sin embargo, su composición no ha sido estudiada a profundidad -y aún menos la influencia de las condiciones de fabricación- en contraste con otras bebidas alcohólicas como el vino. El no conocer con precisión la composición química del tequila y los efectos de las variables de su elaboración pueden impedir la creación de regulaciones adecuadas y la definición clara del producto.

### III. Antecedentes

#### 1. Agave

Los científicos coinciden en afirmar que Mesoamérica y en particular México fue el escenario del origen, evolución, dispersión y cultura del agave. Ellos se basan en dos puntos principales:

- 1) En esta región los agaves se encuentran en estado silvestre, son mas primitivos, es decir, presentan formas menos evolucionadas.
- 2) En esta región existe el mayor número de variedades de esta planta.

A lo largo y ancho de nuestro país esta planta se ha utilizado desde tiempos prehispánicos. Debido a sus cualidades el agave ha servido para satisfacer y complementar una serie de necesidades básicas: alimentación, medicamentos, material de construcción, vestido, forraje, etc. (MNCP 1988, Luna-Zamora 1991, Granados-Sánchez 1993).

Cabe resaltar que de esta planta se obtienen bebidas embriagantes, dentro de las cuales sobresalen el mezcal, el tequila y el pulque. Este último tiene un registro que data de 300 años a. de J.C. (Granados-Sánchez 1993).

##### 1.1. Clasificación taxonómica

La clasificación taxonómica del género *Agave* ha propiciado muchas confusiones ya que para los botánicos es difícil situarlo en una sola familia. Esto se debe a las características que consideran que tienen mayor importancia (ej. La ubicación del ovario) por lo que existen varias referencias bibliográficas que lo incluyen en otras familias (ver referencias en Granados-Sánchez 1993). En la actualidad se le reconocen 136 especies, 26 subespecies, 29 variedades y 7 formas (Gentry 1982).

Una de las últimas clasificaciones taxonómicas del *Agave tequilana* Weber están basadas en varios estudios, principalmente en los de Gentry (1982), esta se describe en la tabla 1:

División	Angiospermae
Clase	Monocotiledoneae
Orden	Liliales
Familia	Agavaceae
Subfamilia	Agavoideae
Genero	<b>Agave</b>
Subgenero	Euagave
Grupo o sección	Rigidae
especie	<i>Agave tequilana</i> Weber
variedad	Azul

**Tabla 1.** Clasificación taxonómica del *Agave tequilana* Weber variedad azul.

## 1.2. Descripción



Figura 1. Plante de Agave.

Descripción botánica del *Agave tequilana* Weber (1902).

Es una planta surculosa\* que se extiende radialmente de 1.2 a 1.8 metros. Su tallo es grueso y corto de 30 a 50 cm de altura al madurar. Las hojas miden de 90 a 120 cm y son lanceoladas\*, acuminadas\* y de fibras firmes, casi siempre rígidamente estiradas, cóncavas de ascendentes a horizontales. Lo más ancho de las hojas se encuentran hacia la mitad y son angostas y gruesas hacia la base, generalmente de color glauco azulado a verde grisáceo. El margen de las hojas es recto a ondulado o repando\*; los dientes generalmente son de tamaño regular y espaciados irregularmente, en su mayoría de 3 a 6 mm de largo a la mitad de la hoja. Los ápices\* de los dientes son delgados, curvos o flexos\* desde poca altura de la base piramidal. Los dientes son de color café claro a oscuro, de 1 a 2 cm de separación; rara vez son remotos o largos. La espina por lo general es corta de 1 a 2 cm de largo, rara vez larga achatada o abiertamente surcada de arriba, su base es ancha, café oscura decurrente\* o no decurrente. La inflorescencia\* es una panícula\* de 5 a 6 metros de altura y densamente ramosa a lo largo, con 20 a 25 umbelas\* largas difusas de flores verdes y estambres rosados. Las flores son de 68 a 75 mm de largo con

bracteolas\* sobre los pedicelos\* de 3 a 8 mm de longitud. El ovario es de 32 a 38 mm de largo, cilíndrico con cuello corto, inconstrico\*, casi terminado en punta sobre la base. El tubo floral es de 10 mm de ancho, funeliforme\* y surcado. Los pétalos son desiguales de 25 a 28 mm de longitud por 4 mm de ancho, lineales, erectos pero rápidamente decaen en la anthesis\*, cambiando entonces a un color café y seco. Los filamentos miden de 45 a 50 mm de largo doblados hacia adentro junto al pistilo, insertos de 7 a 5 mm cerca de la base del tubo; las anteras\* son de 25 mm de largo. El fruto es una cápsula ovada\* a brevemente cuspidada\*\* (Gentry 1982).

No existe un consenso general sobre las variedades y especies afines al *Agave tequilana* Weber. Desde 1887 se tiene una clasificación, en la cual se mencionan que los agaves con que se producía el tequila eran diferentes y que se conocían con los nombres de: “mezcal chino”, “mano larga”, “zopilote”, “pie de mula”, “azul”, “xigüín”, “moraleño”, “Chato o saguayo”, “Bermejo” y otros más (Valenzuela-Zapata 1994). Después de un siglo Gentry en 1982 consideró incompletos los estudios y a todos los agrupó en *Agave tequilana* Weber. Granados-Sánchez en 1985 en sus estudios sobre citogenética de los agaves, pudo distinguir las siguientes variedades dentro del *Agave tequilana* Weber, estas son:

Variedad azul: la característica distintiva es el intenso color azul de su roseta. Esta variedad es la única permitida por la norma oficial para la elaboración de tequila y además, es la preferida por los productores, debido a ser prolífica en hijuelos de rizoma y sobre todo por sus magníficas cualidades para la elaboración de tequila (Valenzuela-Zapata 1994).

Variedad Sigüín (Xigüín): la cabeza es mas pequeña que la azul y de forma redondeada, en general las hojas son mas angostas, su base es alargada en el cuello y tiene un distintivo color esmeralda, además el número de hojas en la planta es menor (Valenzuela-Zapata 1994).

Moraleño: en ocasiones parece brillar en tono plateado, su tamaño es parecido al azul pero tiene una cabeza más alta, con más hojas pero menos largas y muy lanceoladas; la armadura de esta especie es café muy oscuro, la espina tiene una pequeña joroba casi

---

\* Ver anexo A



imperceptible y la inflorescencia es más grande y más densa que la azul (Valenzuela-Zapata 1994).

Chato o Saguayo: tiene una roseta grande, extendida, de hojas largas, gruesas, carnosas y anchas de color verde pálido - glauco, además tiene pocas hojas. La característica indeseable es la resistencia de sus fibras que causan problemas en la molienda durante el proceso industrial (Valenzuela-Zapata 1994).

Bernejo: es la variedad de mayor porte, cuya cabeza es la más pesada y alta, es difícil encontrarlo en las plantaciones actuales y rarísimo en las ya adultas, las características de su qurote casi nadie las conoce por ser tardío y escaso en las plantaciones (Valenzuela-Zapata 1994).

Estas plantas tienen un metabolismo crasuláceo ácido (CAM), la humedad, la radiación fotosintéticamente activa (RFA) y la temperatura son los factores principales que regulan el crecimiento de esta planta y conforme avanza en edad adquiere un mayor porcentaje de peso seco en la cabeza. El *Agave tequilana* tiene la mayor productividad dentro de las plantas CAM (Valenzuela-Zapata 1994).

### 1.3. Fitogeografía

Son plantas adaptadas a condiciones de aridez. Dentro de sus principales características son las siguientes: raíces someras y ramificadas, cutícula gruesa, estomas hundidos, metabolismo fotosintético y metabolismo de crasuláceas ácido (Granados-Sánchez 1993). El nombre de agave fue acuñado por el botánico Carlos Linneo. El nombre proviene de la raíz griega *agavus* que significa admirable o ilustre, ésta descripción no solo se refiere a su apariencia o forma en que vive en un medio semidesértico, sino también debido algunas de sus características como la floración, que ocurre sólo una vez en la vida de la planta (MNCP, 1988).

Dentro de los botánicos que se han dedicado al estudio a definir el origen de esta planta se pueden citar a los siguientes:

En 1915 se propone que México es el centro de origen del género *Agave* y que su distribución se localiza al norte, principalmente en las zonas áridas y semiáridas de México y Norteamérica y al sur donde el límite conocido es Colombia.



Algunos investigadores en los años de 1895 y 1936 opinan que la distribución del subgénero *Euagavea* se extiende hasta zonas con climas cálidos y secos como el correspondiente a la cadena isleña del Caribe y norte de Sudamérica.

Otro investigador en 1920 con base en sus expediciones por estas regiones propone como centro de distribución de este género a la Altiplanicie Mexicana. El menciona que la zona que abarca este género va de los 34° de latitud norte hasta los 6° de latitud sur.

Por último un investigador en 1983 ubica al Valle de la zona de Tehuacán como el centro de origen del género debido a las especies endémicas que hay en esta zona como el *Agave karwinskii* (referencias tomadas de Granados-Sánchez 1993).

#### **1.4. Cultura y utilización del Agave**

Según los códigos Nutall, Laud, Florentino y Mendocino, las tribus indígenas hallaron diferentes usos para el agave y sus subproductos, por ejemplo: alimentos, hilos, agujas para coser, calzado, techos para casas, ropa, clavos, punzones, armas de guerra, papel, entre otros objetos (MNCP 1988).

Las interrelaciones establecidas de los grupos étnicos de Mesoamérica con el agave, datan desde hace aproximadamente unos 10000 años (MNCP 1988 y Granados-Sánchez 1993). Los indígenas seleccionaban para cultivar las especies más dulces; cocinaban las partes más suaves por medio de fuego directo o con agua caliente, los lugares que se ocupaban para cocinarlos tenían una apariencia semejante a la de un rosticero. Existe otro método mas sofisticado para cocinarlo y es muy común en el norte del país, el llamado “horno de tierra”, que se basa en hacer un hoyo en la tierra donde son calentadas rocas basálticas con fuego. Posteriormente las piñas del agave se colocan en él para su cocimiento, cubierto todo con hojas, hierbas y suficiente tierra, para evitar la salida del vapor. Una vez cocinadas las piñas son cortadas en pedazos para comerse o almacenarse para su posterior uso (Granados-Sánchez 1993).

En tiempos de la conquista, en los estados de Jalisco, Colima, Nayarit y Aguascalientes, los indios ticuila o tiquilinos elaboraban un aguardiente de la planta del agave, mismo que bebían en fiestas y ceremonias religiosas. Cuando los españoles lo probaron, fueron conquistados por Mayahuel y adquirieron la costumbre de beberlo en la punta de un cuerno de vaca (Luna-Zamora 1991).

Existen varias especies de agave, cuyo jugo puede ser fermentado y destilado para la producción de bebidas alcohólicas, sin embargo, el *Agave tequilana* Weber en su variedad azul es el único autorizado para la elaboración del tequila. El cultivo de esta planta requiere de la combinación de numerosos factores como:

- La altitud, preferentemente a 1500 metros sobre el nivel del mar.
- Las condiciones de la tierra, favorablemente suelo volcánico, arcilloso, permeable y abundante en elementos derivados del basalto y riqueza en fierro.
- Pluviosidad, cerca de un metro anual.
- Temperatura constante de clima semi-seco que oscile alrededor de los 20°C.
- Importante la exposición al sol, ya que se considera favorable que existan nublados entre 65 y 100 días del año.

Sólo una región de aproximadamente 209 km<sup>2</sup> en el estado de Jalisco reúne las mejores condiciones para la reproducción del *Agave tequilana* Weber variedad azul: la famosa región de Tequila.

## 2. Tequila

### 2.1. Historia del tequila

#### 2.1.1. Origen y época colonial

Las sociedades prehispánicas cultivaban el agave tequilero y lo utilizaban para obtener azúcar. También se obtenían varios tipos de bebidas machacando las pencas y poniéndolas a macerar en agua hasta que se produjera la fermentación y se formara una especie de vino, a esas bebidas solo les faltaba la destilación para ser aguardiente; este proceso fue justamente el aporte de los españoles. Su utilización como bebida destilada expresa un sincretismo cultural. Quizás como ningún otro producto del agave, el tequila es por excelencia un producto de la mezcla de la cultura indígena y española (Luna-Zamora 1991).

“Su origen se presenta oscuro debido a que todo el proceso de su génesis y el inmediato mecanismo para ingresar al mercado tuvo que desarrollarse en la clandestinidad...No obstante, en 1621 ya se habla en el corregimiento de Tequila de abundante cosecha de mezcal, y en el abasto a Guadalajara del llamado vino de mezcal cuyo uso se iba generalizando....Reiteradas prohibiciones contribuyen a dar fe de que el delito de su producción era un hecho, hasta que Juan Canseco y Quiñones, presidente – gobernador de 1636 a 1640, decidió reglamentar la fábrica y comercio del vino mezcal y dispuso se creara el estanco correspondiente...”(tomado de Luna-Zamora 1991).

El surgimiento del tequila en la época colonial como un producto de consumo puede considerarse modesto, su escasa difusión en este periodo no es casual, ya que en pleno auge del dominio español era un producto marginal respecto a la agricultura europea, su prohibición fue la misma que sufrieron otras bebidas regionales ya que se buscaba favorecer la importación de caldos, vinos y aguardientes españoles. Además el cultivo del agave y la producción del tequila no tenían tanta importancia como la de los cultivos tradicionales de la agricultura indígena como el maíz, frijol e incluso el pulque, el cual presentaba una mayor tradición y arraigo en las culturas prehispánicas (Luna-Zamora 1991).

Para finales del siglo XVIII la agroindustria del tequila se desarrolló en forma más acelerada, ya se había superado el mercado local y ya había alcanzado una buena fama, llegando incluso a comercializarse en la ciudad de México.

La industria tequilera tuvo un origen artesanal, sin embargo, a diferencia de los obrajes y talleres, el tequila surgió con tres características distintivas: en primer lugar, a pesar de que su manufactura no requería grandes sumas de inversión fue promovido por poderosos hacendados; en segundo lugar, surgió y se consolidó en un espacio rural dando pie al nacimiento de una región que muy pronto se especializaría; por último, su desarrollo y consolidación se dio gracias a la vinculación con tres tipos de mercados: los centros mineros, el mercado urbano y el rural (Luna-Zamora 1991).

El surgimiento del proceso de destilación del tequila, se asocia frecuentemente al nombre de don Pedro Sánchez de Tagle, uno de los personajes mas encumbrados de la élite española, no solo en Nueva Galicia (Jalisco) en donde poseía enormes extensiones de tierra, sino en todo el virreinato de la Nueva España. Entre sus propiedades se

encontraba la hacienda de Cuisillos, que abarcaba terrenos desde las faldas del cerro de Tequila hasta las orillas de la ciudad de Guadalajara, estas tierras posteriormente constituirían la región tequilera de Jalisco. Don Pedro fue el introductor del cultivo de agave en el valle de Tequila, aun cuando no existen documentos de primera mano en los que se asiente que haya sido el introductor del proceso de destilación del tequila, lo cierto es que diversas fuentes historiográficas del siglo pasado y antepasado lo mencionan como el “padre del tequila” (Luna-Zamora 1991).

La abundancia de agua ha sido uno de los factores fundamentales para el establecimiento de las destilerías, fue sin duda la villa de Tequila la que tuvo una mayor expansión que sus vecinos del Arenal y Amatitán debido a la mayor abundancia de este líquido vital (Luna-Zamora 1991).

Dentro de las primeras destilerías de que se tiene registro para el siglo XVIII, se cuenta desde luego, la del gran hacendado don Pedro Sánchez de Tagle, fundada en el primer cuarto del siglo; también se encuentra la del señor Nicolás Rojas (posteriormente conocida como la Rojeña) que data de la primera mitad de ese siglo. Asimismo, para 1758 la familia Cuervo y Montañó fundó una destilería en la Hacienda de Arriba y, finalmente, figura otra destilería denominada La Chorrera, ubicada en el rancho de San Juan de Dios de las Chorreras, fundada por don Malaquíás Cuervo (Luna-Zamora 1991).

### 2.1.2. Siglo XIX

La industria tequilera se desarrolló de manera *sui generis* dentro del contexto socioeconómico del siglo XIX y hasta antes del Porfiriato. Esto es, si bien parece claro que durante el siglo XVIII las primeras destilerías estuvieron en manos de hacendados como Sánchez de Tagle, Cuervo y Montañó y algunos otros de menor alcurnia, a inicios del siglo XIX nos encontramos con la existencia de industriales poco o nada ligados al dominio territorial (Luna-Zamora 1991).

En este siglo se puede establecer un segundo periodo que presenta dos características primordiales: 1) la vinculación de sectores sociales medios a la actividad tequilera, los cuales quedaron inmersos en su fase industrial aún sin contar con dominios territoriales, que probablemente se debiera al cambio de ubicación de las destilerías, ya que en el siglo XVIII éstas se encontraban en las haciendas y ranchos, y para el siglo XIX la mayor parte

de ellas se asentaron en la villa de Tequila y 2) la enorme inestabilidad de la industria, ya que no existió una sola destilería que no cambiara de dueño, la causa mas probable de inestabilidad en el funcionamiento de las destilerías de esa época no parece radicar en la escasez de materia prima, sino en la fuerte competencia que existía entre un número considerable de pequeñas destilerías en el restringido mercado regional, así como los escasos y difíciles mercados extrarregionales. (Luna-Zamora 1991).

Un ejemplo que ilustra muy bien la formación de industriales tequileros desligados del dominio territorial, es el caso de don Cenobio Sauza, originario de Tecolotlán, Jalisco, quien en 1858 se trasladó a radicar a la villa de Tequila. El señor Sauza se vinculó a la actividad tequilera inicialmente como empleado en la destilería de don José Antonio Gómez Cuervo (que posteriormente gobernaría el estado de Jalisco de 1867 a 1868), situada en la hacienda de San Martín; durante algunos años fue administrador de dicha destilería y mas tarde trabajó por su cuenta en la distribución de vino – mezcal, para lo cual adquirió cinco carros tirados por mulas para colocar el tequila en varios puntos de Jalisco y estados circunvecinos. No sería sino hasta 1870 cuando se inició como industrial tequilero, arrendando la destilería propiedad del licenciado Lázaro J. Gallardo (posteriormente conocida como la Gallardeña). El arrendamiento de esta destilería la realizó el señor Sauza antes de poseer terreno alguno. En 1873 don Cenobio adquirió la primera destilería de su propiedad: La Antigua Cruz. A partir de ese año don Cenobio iniciaría un acelerado proceso de compra y venta de terrenos y destilerías que lo colocarían mas tarde como uno de los empresarios tequileros mas acaudalados de la región (Luna-Zamora 1991).

### ***2.1.3. Porfiriato***

Hacia finales del siglo XIX y muy a tono con la época, los destiladores y comerciantes del tequila habían obtenido tal margen de ganancias que les permitió tener una mayor concentración de la tierra, y controlar de esta forma todo el proceso productivo del tequila y, aún mas, diversificar sus excedentes de acumulación invirtiendo en otras ramas productivas y en otros espacios fuera de la región tequilera. Los ahora hacendados empresarios contaban con la abundante mano de obra existente en la región y con dinero líquido para comprar y acumular extensos territorios, anteriormente propiedad

de las comunidades indígenas y quizás de manera más importante, de otros medianos y pequeños propietarios que no incursionaron paralelamente en las ventajas de la industria y el comercio (Luna-Zamora 1991).

No cabe duda de que la experiencia centenaria acumulada en torno a la actividad tequilera – agrícola e industrial – dotaba de importantes ventajas a los empresarios tequileros de finales del siglo XIX, frente a los pequeños mezcaleros que se iniciaban en otras regiones del país (Luna-Zamora 1991).

Además del desarrollo de los sistemas productivos, y a una probable acumulación de capital que se acrecentó de generación en generación. Los empresarios tequileros contaban con tres factores claves antes de la llegada del ferrocarril: 1) la asimilación por parte de la población trabajadora de lo que bien podríamos llamar una “cultura tequilera” tanto en lo agrícola como en lo industrial; 2) un mercado de consumo formado por el estado con mayor población en el país y 3) el que Guadalajara constituyera en varios sentidos el centro más importante de toda una vasta y densamente poblada región llamada occidente mexicano. Estos factores no se presentaron para los productores de aguardiente de mezcal de otras regiones (Luna-Zamora 1991).

Con todos estos factores a su favor, la llegada del ferrocarril permitió a los empresarios tequileros, acrecentar la industria y la complejidad de sus negocios y fortunas de manera inusitada, para consolidarse como grupo económico dominante en la región (Luna-Zamora 1991).

Una de las innovaciones que benefició la primera fase del proceso industrial fue la invención e instalación del llamado “horno de mampostería”, que reemplazó a los antiguos hornos bajo tierra. La introducción de este horno solucionó un problema que estaba haciendo crisis con el antiguo sistema: los hornos mal contruidos, como generalmente lo estaban, consumían cantidades considerables de leña, artículo que día a día escaseaba, por lo mismo su adquisición costaba más. Al reducir los costos en los insumos y mano de obra también se intensificó el proceso productivo, ya que ahora el tiempo de suministro de vapor era de 24 horas mas 12 horas de reposo, por lo que se pudo intensificar la cocción del agave y de ese modo aumentar los rendimientos y la productividad de la fábrica, con sus consecuentes beneficios económicos (Luna-Zamora 1991).



#### 2.1.4. Siglo XX

Con la Revolución mexicana de 1910 se inició la formación de un nuevo sistema político y una nueva reestructuración económica, este proceso duraría casi treinta años. A partir de la década de los cuarentas, el país vivió en todos los sentidos un periodo de transición hacia la industrialización y el desarrollo urbano (Luna-Zamora 1991).

Las destilerías establecidas para finales del siglo XIX y principios del XX, sufrieron una crisis de sobreproducción en los primeros años de 1900, esto, aunado a la inestabilidad política subsecuente, condujo a la quiebra de muchas de ellas. No obstante, el mercado del tequila se recuperó sensiblemente, aunque por un corto tiempo (mediados de los años 10) probablemente este impulso de la industria tequilera fue solo coyuntural y obedeció a la demanda generada por la primera Guerra Mundial, y a la fuerte epidemia de influenza conocida como “la gripe española”, que azotó los estados de San Luis Potosí y Zacatecas en el año de 1918. “Para combatir la gripe, los médicos empezaron a recomendar un tratamiento a base de tequila y sal que si no la curaba realmente si servía para tener a los enfermos más contentos, y aún más a los tequileros que, gracias a ello lograron incrementar muchísimo las ventas” (tomado de Luna-Zamora 1991).

En este periodo, de las 87 destilerías de tequila existentes en Jalisco hacia 1910, solo lograron mantenerse en pie un tercio de ellas. Uno de los motivos fue la disputa por los mercados de consumo y otro motivo más importante fue el reparto agrario. Según el censo agrícola y ganadero de 1940, la superficie ocupada con agave disminuyó a 2603 hectáreas, con una población de cuatro millones de agaves, es decir, apenas el 35 por ciento de los existentes 10 años antes. La disminución es más drástica si tomamos en cuenta que para finales del siglo XIX se contaba con plantaciones de aproximadamente setenta millones de agaves (Luna-Zamora 1991).

Es indudable que para varios de los industriales tequileros, el reparto agrario representó un duro golpe a sus expectativas económicas, algunos se desligaron completamente de la actividad agrícola, pero los que se mantuvieron buscaron diversificar sus inversiones, una de ellas fue la compra y venta de bienes raíces urbanos en Guadalajara que para los años cuarentas fue todo un *boom* (Luna-Zamora 1991).

Para 1940 se exportaban 21 621 litros, entre 1940 y 1946 se incrementó la exportación a 4 374 468 litros; terminando la guerra (1948) las exportaciones cayeron hasta 8 794 litros (Luna-Zamora 1991).

A raíz del reparto agrario surge la confrontación entre los empresarios y los agricultores por establecer el precio del agave. Los empresarios tuvieron el apoyo de parte del gobierno, al poder adulterar oficialmente el tequila, utilizando otros azúcares de diferente origen al agave para su fabricación; sin embargo, los agricultores tuvieron a su favor la aguda escasez del agave, lo cual propició un cambio en la política de financiamiento y control de las plantaciones por parte de los empresarios. El sector tequilero se fue institucionalizando, generando cámaras regionales, normas oficiales, etc. Uno de los puntos mas importantes fue el conseguir la denominación de origen (Luna-Zamora 1991).

## **2.2. Proceso de producción del tequila**

### **2.2.1. Cocimiento**

Las crónicas indican que los indígenas cocían el agave en hornos bajo tierra, después de lo cual le agregaban agua para dejarlo fermentar, es decir, el jugo se fermentaba entremezclado con la parte de la materia fibrosa del agave. Los hornos utilizados para la cocción del mezcal – tequila durante los siglos XVIII y hasta entrado el siglo XIX, parecen no haber sido muy diferentes de éstos, ya que eran hoyos de aproximadamente 2.5 m de profundidad. Estos se encontraban a ras de suelo con forma cónica y la base estaba hacia arriba. La hoquedad u hoyo estaba revestido ligeramente en toda su superficie por piedra refractaria llamada “china”. Se llenaba todo el horno con leña y después se cubría con estas piedras; al centro se dejaba un vacío que ocupaba toda la altura del relleno, conducto que hacia las veces de chimenea que servía para encender el horno y como toma de aire para la combustión. Se vigilaba que la combustión se realizara lentamente, de manera uniforme y regular. Esta operación de preparación del horno tardaba de 8 a 10 horas; a medida que la leña se iba consumiendo, la bóveda de piedras se hundía poco a poco hasta llegar al fondo del hoyo, en donde formaba un piso ardiente. Hecho lo anterior el horno se llenaba de piña de mezcal en un número que oscilaba entre 500 y 1000 cabezas – dependía del tamaño del horno –. Se tenía el cuidado de dejar un



agujero al centro para que sirviera de filtro o chimenea de oxígeno, al igual que cuando se preparó el horno. Una vez que el horno se llenaba hasta unos dos metros sobre el nivel del suelo y que se le había entremezclado leña al centro y en las orillas de la cavidad, se cubría con una capa de 50 centímetros de grosor de una mezcla de yerbas, tierra y hojas de maguey, de tal manera que interceptara el aire. En la hoquedad o chimenea central que se había dejado, se vertía un poco de agua para que al contacto de las piedras calientes se evaporara instantáneamente, llenando los intersticios, lo cual favorecía el proceso bioquímico de conversión de los polisacáridos, a la vez que templaba la acción de las piedras calientes (Tapia 1990, Luna-Zamora 1991).

Una vez cubierto perfectamente el horno, se colocaba un grueso tronco en el vértice que servía como tapón de la chimenea. La acción del calor duraba unas 24 horas, durante las cuales se tenía el cuidado de reparar las grietas de tierra, pues el contacto del aire con las piñas, ocasionaba pérdidas en el rendimiento de los azúcares a consecuencia de la oxidación. Un día después de iniciada la “tatemación” del mezcal, se destapaba el horno levantando el tronco o tapón de la chimenea y se le vertía un poco de agua, a la vez que se revisaba que la cocción marchara uniforme para todas las piñas. Al cabo de 30 horas o 40 horas las cabezas tomaban un color moreno, señal de tatemación completa; se vertían, entonces, dos o tres cubetas de agua para bajar la temperatura, hasta que cesara la evaporación. Finalmente, se destapaba el horno y se dejaba enfriar un día más hasta que se pudieran extraer las piñas, después se llevaban a su trituración o machacado. El solo proceso de cocción de la piña llevaba cuatro días para prepararlo y desocupar completamente un horno (Tapia 1990, Luna-Zamora 1991, Valenzuela-Zapata 1994).

En las últimas décadas del siglo XIX, se introdujeron los hornos de mampostería, representaron un importante beneficio para el proceso de producción del tequila; León Diguet describe dichos hornos en los siguientes términos: “ El aparato de torrefacción consiste en una cámara rectangular de mampostería... en la parte anterior de esa construcción hay una puerta que se puede cerrar herméticamente, y que sirve para cargar y descargar el horno... (en la parte posterior y abajo) hay dos fogones independientes que tienen por objeto calentar un lado del horno cada uno. Los gases calientes de la combustión, después de penetrar por todas partes en la carga del horno salen por una

chimenea que hay comúnmente en la parte superior de la construcción” (Luna-Zamora 1991).

En el horno de mampostería la cocción se realizaba por medio de vapor, y no al contacto directo con las piedras, porque originaba pérdidas a causa de la carbonización de una parte de la materia. El vapor necesario para la reacción salía de la cabeza misma del mezcal, por lo que no había necesidad de recurrir a su inyección. El jugo azucarado que desprendían las piñas al calentarse se recogía en un receptor, mientras que con el horno bajo tierra se quemaba y vaporizaba. Con el nuevo sistema, el calor se repartía de manera uniforme y regular, además de que era controlable la temperatura a través de las claraboyas. Contaba también con un termómetro colocado en el interior del horno. Los fogones, estaban ubicados de tal manera, que se podía reducir o activar la temperatura a voluntad. Los inventores de este tipo de horno fueron el señor Gabriel Castaño y la señora Guadalupe López de Lara. Hasta la fecha estos hornos de mampostería se siguen usando en todas las fabricas pequeñas, e incluso en algunas grandes; solo se les han agregado aditamentos que los hacen más efectivos; por ejemplo, el sellado de la puerta ahora se hace con hule y no con bagazo o “marrana” (fibra de la piña o cabeza del agave cocido) y se utilizan mejores sistemas de inyección de vapor con calderas mas eficientes. Hacia 1960 el horno de mampostería se cambio por los llamados “autoclaves”, de acero inoxidable, los que pueden alcanzar grandes presiones; los hay de 25 a 75 toneladas. Su forma es cilíndrica y se encuentran cubiertos por fuera de una capa de asbesto que les sirve de aislante. Disponen de dos puertas, una para cargar y otra para descargar. Estos hornos están equipados con instrumentos de alta precisión y su diseño es tal, que permite una perfecta distribución del vapor. Antes de abrir los hornos se observa el color de las mieles escurridas, el color ámbar de las mismas indica que el cocimiento ha llegado a punto, y solamente entonces se abre el autoclave. Si se acelera el cocimiento del agave o se pasa el límite de cocción señalado por el color ámbar de las mieles, el agave despidе compuestos tóxicos como el metanol. (Tapia 1990, Luna-Zamora 1991, Valenzuela-Zapata 1994).

Este proceso tiene la finalidad de hidrolizar (mediante el calor) los azúcares complejos, como la **inulina** (polisacárido formado por unidades de fructosa, en el

extremo terminal presenta un residuo no reductor de D – glucopiranososa, es decir, sacarosa); en la mayoría de las plantas que contienen inulina, presentan una serie de oligosacáridos con fórmula general  $G - F - [F]_n$ , donde [G] es glucosa y [F] es fructosa; cuando  $n$  es igual a cero se habla de la sacarosa y cuando  $n$  es alrededor de 35 ya se habla de la inulina. En el caso del *Agave veracruz* la inulina presenta una alta proporción de ramificaciones, las uniones son del tipo 2→1 y 2→6. (Davies *et al.* 1969)

La función principal de conversión de los polisacáridos en moléculas de carbohidratos simples es para que las levaduras puedan efectuar la fermentación.

### **2.2.2. Molienda y extracción de mieles**

Antiguamente, pasados tres días de cocimiento, las cabezas se molían en la tahona o molino chileno, el cual consistía en una hoquedad realizada en el piso, de unos 70 a 80 centímetros de profundidad, de forma circular con un diámetro aproximado de dos y medio metros. Constaba de una piedra circular de aproximadamente 4 toneladas con un eje central, ésta era movida por animales (bueyes) que circulaban en torno al hoyo (Tapia, 1990).

En ese hoyo, se introducían las cabezas de agave para que la piedra las vaya machacando. Una vez hecha la trituration, se llevan en cubetas a una tina, en donde se realizaba la maceración, de la cual se encarga un hombre semidesnudo para terminar de desprender el bagazo con pies y manos, de tal manera que agregándole agua, vaya en mejores condiciones a la tina de fermentación (Tapia, 1990).

Aunque con muy poca aceptación y difusión, hacia 1900 también se desarrolló una nueva técnica para la trituration del agave, orientada a sustituir la tahona por un “machacador”; sus creadores fueron la señora Guadalupe López de Lara y el señor Gabriel Castaño. Consistía en una cubeta cónica de fierro fundido, que descansa sobre un zócalo de mampostería. Contra las paredes de esa cubeta ruedan tres rodillos pesados de fierro, que tienen forma cónica para adaptarse perfectamente a la superficie de la cubeta; mueve a dichos rodillos un árbol central que a su vez recibe movimiento de la fuerza motriz de la fabrica (motor de vapor) que machaca y convierte en pasta las piñas de agave, hechas pequeños pedazos antes, y echados al machacador – batidor automático. Entre los rodillos cónicos, y formando parte del mismo sistema rotativo, hay unas paletas

que agitan y diluyen la pulpa en una corriente de agua, cuya cantidad está arreglada de manera que separa el jarabe que se escapa del aparato en forma continua. No quedan mas que los desechos o bagazo, que después de agotados completamente, son arrojados a unos carritos (Tapia, 1990, Luna-Zamora 1991, Valenzuela-Zapata 1994).

Para los años cincuentas del siglo XX, fue cuando se sustituyó el viejo sistema de tahona por el molino de banda sin fin, del mismo tipo de los usados por algún tiempo en la molienda de la caña de azúcar en los ingenios. Esta desgarradora es una máquina donde el agave cocido es molido en una polea de 22 navajas y luego es exprimido mediante rodillos. El bagazo es exprimido por segunda vez después de haber sido mezclado con agua. Este procedimiento hace que el contenido de grados brix del agave al finalizar el cocimiento descienda de 18° a 10° brix (Tapia, 1990).

Para extraer las mieles del agave cocido, se aplica agua a presión al bagazo y luego se exprime en bandas transportadoras. Las mieles son entonces separadas para continuar el proceso industrial, mientras que el bagazo exprimido sale del mismo. Alrededor de 55 a 60 kg de bagazo son desechados para la producción de un litro de tequila. Las mieles extraídas del agave cocido, son recolectadas en depósitos y transportadas por tuberías a las tinas de formulación o de fermentación, según sea el caso. La formulación consiste en mezclar las mieles de agave con un preparado de otras mieles, en especial de caña de azúcar, para posteriormente ser fermentadas. Mientras que las mieles para elaborar tequila cien por ciento de agave, no requieren de ésta formulación y se dirigen directamente hacia la fermentación. La formulación es, por lo tanto, un procedimiento que solo se lleva a cabo con los tequilas que se preparan con una mezcla de azúcares y que, según la norma oficial, puede tener una proporción de 51 por ciento de agave y 49 por ciento como máximo de otras mieles. El bagazo actualmente se le da varios usos, ejemplo: como material de relleno. (Valenzuela-Zapata 1994).

### **2.2.3. Fermentación**

La fermentación tiene por objeto transformar los azúcares reductores contenidos en el jugo del agave (mosto) en alcohol etílico. Este proceso se da por medio de la reacciones bioquímicas, que permite el desdoblamiento de los azúcares, gracias a la acción de la levadura preparada con el mismo mosto. La antigua tina de fermentación era

de madera, y tenía una capacidad de aproximadamente 1 500 litros. Hoy día las tinas de fermentación son de acero inoxidable con capacidad de 20 000 litros. En el siglo antepasado y la primera mitad del pasado, en los meses de invierno se colocaban entre las tinas de fermentación, pequeñas filas de carbón encendido para que el ambiente se calentara, y de ese modo se podría acelerar el proceso de fermentación. Tardaba 12 días en verano y hasta 18 en invierno. Se agregaba también aproximadamente medio kilogramo de sal por tina, para que se “calentara” los mostos, ya que la sal tenía la finalidad de “alimentar” a las bacterias que realizan el desdoblamiento del azúcar en alcohol. Actualmente, en vez de sal se utilizan otros productos químicos en bajas dosis para activar el proceso de fermentación, tales como sulfatos y urea. En la actualidad se tienen diferentes variedades de levaduras, las cuales pueden llevar acabo la fermentación en 72 horas (Luna-Zamora 1991).

Hoy en día el proceso es el siguiente: al mosto se le agrega agua, levaduras y nutrimentos para que se pueda llevar a cabo la fermentación. Las cepas de levaduras son preparadas previamente y crecidas bajo condiciones controladas, para después multiplicarlas en grandes volúmenes. Las levaduras encontradas en la fermentación corresponden al género *Saccharomyces*, siendo la especie *cerevisae* la mas comúnmente utilizada. Sin embargo, puede considerarse que las cepas tequileras son diferentes según el adiestramiento y desarrollo que les da cada compañía tequilera. El proceso de la fermentación tiene un perfil similar a la curva de desarrollo de cualquier microorganismo (Valenzuela-Zapata 1994).

Los productos de cualquier fermentación son: alcohol, bióxido de carbono, agua y energía que se desprende en forma de calor. El mosto en plena fermentación es efervescente y el movimiento cesa cuando las levaduras han terminado su trabajo, en ese momento la fermentación termina y se acostumbra decir que el mosto está muerto, es decir, las levaduras han terminado con la conversión de los azúcares en alcohol (Valenzuela-Zapata 1994). Mientras la mezcla no alcance las 72 horas de reposo, al mosto se le llamará mosto vivo, al cabo de ese tiempo se le llamará mosto muerto, y no deberá tener más de un grado brix; la temperatura de fermentación del mosto es de 28 a 30°C (Valenzuela-Zapata 1994).



#### 2.2.4. Destilación

El objeto de la destilación es el de separar o aislar por medio del calor, y dentro de recipientes cerrados, la parte volátil del mosto muerto, que en este caso se le llama cuerpo; lo que no se llegue a destilar se le llaman vinazas. Para realizar este proceso se utiliza un aparato llamado alambique (Léaute 1990, Valenzuela-Zapata 1994).

El alambique es un tipo de reactor, donde se vierte el mosto muerto. Los antiguos alambiques se calentaban a fuego directo; hoy en día se hace con vapor. Originalmente en ésta última etapa, que como hemos dicho fue introducida por los españoles, se realizaba en alambiques u ollas de barro. En el siglo XVIII se introdujeron nuevas ollas metálicas cubiertas con capiteles de madera en la parte superior. Bajo el alambique se encendía una pequeña hoguera, la cual calentaba el mosto muerto para realizar la evaporación de los compuestos volátiles contenidos en la mezcla, estos compuestos pasaban a través de un tubo delgado llamado serpentín (que podía ser de carrizo o metálico) el cual lo atravesado un sistema de enfriamiento para condensar el vapor. En la década de los ochentas del siglo XIX, los viejos alambiques de acero fueron sustituidos por los de cobre. Existen alambiques conocidos como “de columna”, los cuales son los mas utilizados por la mayoría de los tequileros, ya que estos tienen la ventaja de rectificar los alcoholes a voluntad, a través de columnas empacadas que funcionan como filtros, es decir, se puede obtener el grado de pureza deseado, claro está que esto influye en el sabor del tequila. Recientemente, algunos industriales introdujeron alambiques de destilación continua, lo que permitió agilizar este proceso con un aumento en la productividad, y un manejo mas libre del tipo de aguardiente que se desea obtener en cuanto a su sabor y pureza (Léaute 1990, Luna-Zamora 1991, Valenzuela-Zapata 1994).

Los alambiques constan comúnmente de tres partes: la olla o caldera, donde se deposita el mosto muerto para su calentamiento, la columna o capitel que recoge y conduce los vapores, y el serpentín en el que se enfrían y condensan los vapores. Los puntos de ebullición, los diferentes volúmenes y presiones de los diversos compuestos en el alambique, ayudan a la separación de gases que se condensan en productos de mayor riqueza alcohólica. Para la elaboración del tequila son necesarias dos destilaciones, la primera es llamada destrozamiento y la segunda rectificación. Al tequila recibido del destrozamiento o primera destilación se le llama “tequila ordinario”, y al que termina la

segunda destilación o rectificación es considerado ya como “tequila blanco”. Con la rectificación se incrementa la riqueza alcohólica, y se eliminan los productos indeseables, obteniendo un producto de mayor pureza. (Léaute 1990, Valenzuela-Zapata 1994).

El primer destilado del alambique rompe a 50° Gay Lussac (G.L.), es decir, los primeros volúmenes que se obtienen de la destilación presentan un 50% de alcohol; y se corta a 10° G.L., es decir, se suspende la destilación, cuando los volúmenes del destilado presentan un valor del 10% de alcohol. El ordinario tiene en promedio de 28 a 30° G.L. Efectuando la destilación, normalmente se recupera el 12 % de cada litro de mosto muerto. La segunda destilación o rectificación en promedio dura 1.5 hr. El destilado rompe a 78° G.L. y se corta a los 45° G.L. Para obtener un promedio de 55° G.L. se necesita de seis a siete kilos de agave bruto (Léaute 1990, Valenzuela-Zapata 1994).

El tequila se puede transportar en barricas de encino de capacidad de 33 litros. Para cuando se quiere madurar o añejar el tequila, se utilizan barricas o toneles de roble blanco. Por lo general éstas barricas ya se habían utilizado para añejar *bourbon* de Kentucky, whisky Escocés o brandy, finalmente son reutilizadas para añejar el tequila. Esto obedece, a que el tequila es mas penetrante y sustrae todas las resinas de la madera, a diferencia de los alcoholes de la uva que son menos penetrantes, por lo que es muy conveniente utilizar barricas ya tratadas con otras bebidas alcohólicas (Tapia, 1990).

Además de las vinazas existen otros subproductos del inicio y final de la destilación, conocidos como cabeza y colas, respectivamente. Estos subproductos son fuertes disolventes orgánicos que son controlados en la producción del tequila (Léaute 1990, Valenzuela 1994).

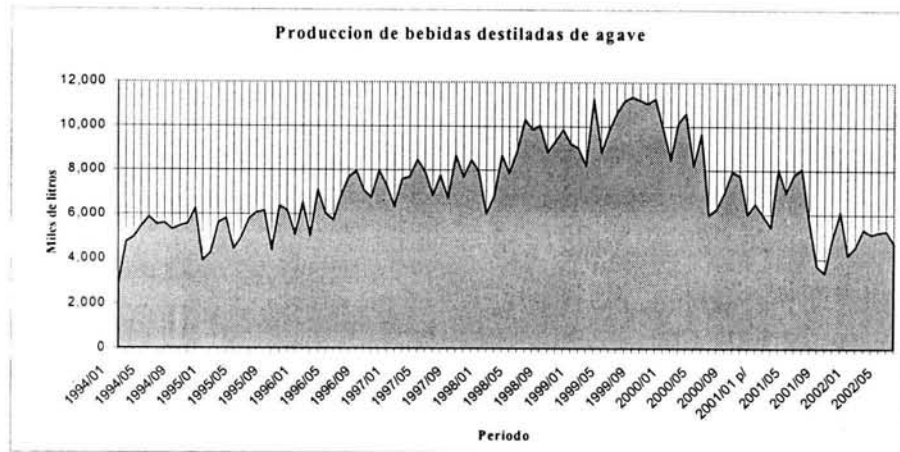
### 2.3. Aspectos socio-económicos

En los últimos 30 años, el tequila ha pasado de ser una bebida regional a una bebida de aceptación nacional, siendo una de las bebidas con mayor reconocimiento y crecimiento en los mercados de exportación (principalmente a los Estados Unidos de Norteamérica y Europa). A raíz de la globalización de la economía mundial, surge el interés del gobierno Mexicano, de transferir al sector privado funciones que venía desempeñando en la normalización, verificación y certificación de la calidad del tequila, por lo que se generó un Consejo Regulador del Tequila (CRT) que fue instaurada por todos los empresarios tequileros del país. Uno de los puntos que buscaron con suma importancia fue obtener la denominación de origen, ya que esta no se tenía. Es muy importante para los empresarios tener la denominación de origen, porque le da mayor valor agregado a su producto, como por ejemplo: el Jerez, Champaña o Cognac.

#### 2.3.1. Económicos

La producción de tequila ha tenido un importante repunte debido a la mayor aceptación que se ha presentado en el extranjero. El precio también ha presentado un alza inusitada debido principalmente a la escasez de la materia prima, es decir, del *Agave tequilana* Weber variedad azul. A continuación se muestra en la gráfica (1a) la producción de bebidas destiladas de agave en litros producidos, como se puede observar se tiene un máximo de producción en agosto de 1999 con 11 355 000 litros, esto corresponde seguramente a la cosecha de agaves, pero posteriormente dio inició la crisis del agave, ya que disminuyó la producción. Si vemos los ingresos totales obtenidos de bebidas destiladas de agave, se observa en la gráfica 1b, una clara tendencia a la alza, existiendo un máximo en mayo del 2000 con alrededor de 610 millones de pesos. En cuanto al precio unitario (por litro) en la gráfica 1c se ve claramente una tendencia a la alza. Entre 1994 a 1999 el precio presentaba pequeños incrementos por año pero entre 2000 al 2002 se dispara el precio, teniendo un máximo en enero del 2002, con lo que se puede ver claramente que los productores de tequila aprovecharon la crisis del agave para subir los precios. En la gráfica 2 se muestra que todavía la mayor parte de la producción se dedica a la exportación del tequila en comparación al consumo nacional.





Gráfica 1a. Producción de bebidas destiladas de agave, periodo en función de litros producidos. (datos tomado del INEGI)

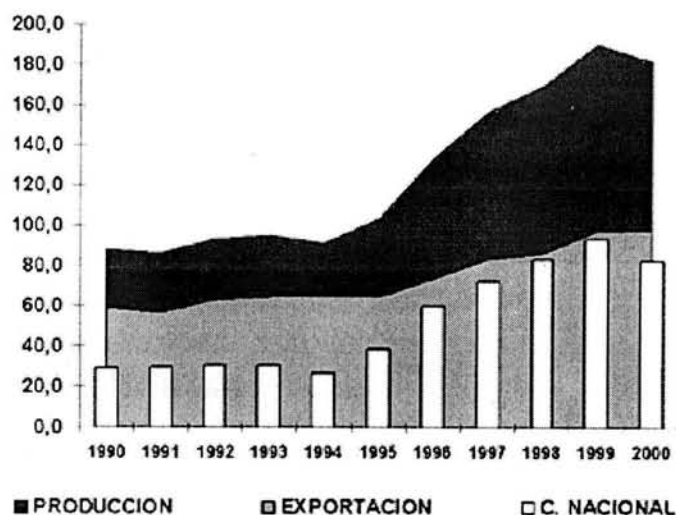


Gráfica 1b. Producción de bebidas destiladas de agave, periodo en función de pesos (miles). (datos tomado del INEGI)



Gráfica 1c. Precio promedio de la bebidas destiladas de agave por litro, periodo en función de pesos. (datos tomado del INEGI)

**PRODUCCION-EXPORTACION Y CONSUMO NACIONAL  
DE LA INDUSTRIA TEQUILERA ANUAL (Litros a 40% Alcoh. vol.)**



**Grafica 2.** Producción, exportación y consumo nacional de la industria tequilera anual en función de litros de tequila al 40% de alcohol (millones de litros).

Año	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000
PRODUCCION	87.9	86.1	93.5	95.6	91.4	103.3	133.3	156.5	169.8	190.6	181.6
EXPORTACION	58.9	56.7	62.8	65.0	65.0	65.0	73.4	84.4	86.5	97.3	98.8
C. NACIONAL	29.0	29.4	30.7	30.5	26.4	38.2	59.9	72.1	83.2	93.3	82.8

**Tabla 2.** Datos de la producción, exportación y consumo nacional de la industria tequilera anual en función de litros de tequila en millones (litros al 40% Alc.Vol.)

**INFORME ESTADISTICO**

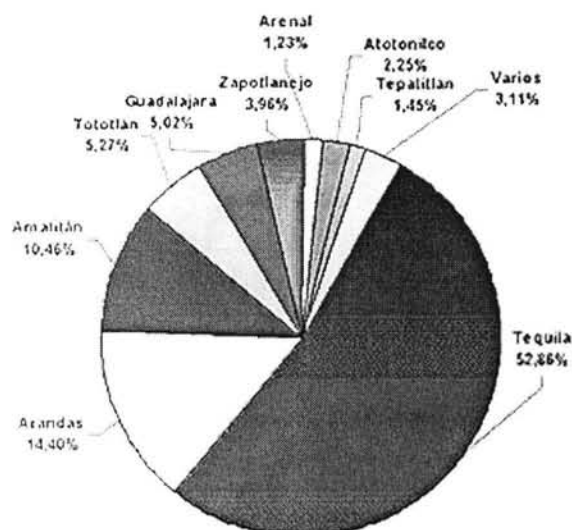
	DICIEMBRE 2000		DICIEMBRE 1999		VARIACION UN PERIODO A OTRO	
	%	LITROS	%	LITROS	%	LITROS
EXPORTACION	96.60%	9,063,607	48.95%	8,991,239	0.80%	72,368
CONSUMO NACIONAL APARENTE	3.40%	319,227	51.05%	9,376,909	-96.60%	-9,057,682
PRODUCCION	100.00%	9,382,834	100.00%	18,368,909	-48.92%	-8,985,314

**Tabla 3.** Datos comparativos del último mes entre el año 2000 vs 1999 de la producción, exportación y consumo nacional de la industria tequilera en función de litros de tequila (litros al 40% Alc.Vol.)

## ACUMULADO A DICIEMBRE

	ENERO A DICIEMBRE 2000		ENERO A DICIEMBRE 1999		VARIACION UN PERIODO A OTRO	
	%	LITROS	%	LITROS	%	LITROS
EXPORTACION	54.41%	98,813,993	51.07%	97,335,864	1.52%	1,478,130
CONSUMO NACIONAL APARENTE	45.59%	82,793,824	48.93%	93,265,142	-11.23%	-10,471,317
PRODUCCION	100.00%	181,607,818	100.00%	190,601,005	-4.72%	-8,993,188

Tabla 4. Datos comparativos acumulados al último mes entre el año 2000 vs 1999 de la producción, exportación y consumo nacional de la industria tequilera en función de litros de tequila (litros al 40% Alc.Vol.)

 PRODUCCION ACUMULADA POR MUNICIPIOS  
 DICIEMBRE DEL 2000


	LITROS	%
TEQUILA	95,994,630	52.86%
ARANDAS	26,151,098	14.40%
AMATITAN	19,001,509	10.46%
TOTOTLAN	9,572,727	5.27%
GUADALAJARA	9,114,588	5.02%
ZAPOTLANEJO	7,186,290	3.96%
ATOTONILCO	4,083,687	2.25%
TEPATITLAN	2,630,169	1.45%
ARENAL	2,230,349	1.23%
*TESISTAN	1,814,322	1.00%
*NO SOCIOS	1,225,495	0.67%
*JESUS MARIA	1,040,820	0.57%
*CAPILLA DE GUADALUPE	637,009	0.35%
*TLAJOMULCO DE ZUÑIGA	382,983	0.21%
*ACATLAN	310,384	0.17%
*ANTONIO ESCOBEDO	171,170	0.09%
*EL SALTO	49,785	0.03%
*GUANAJUATO	10,806	0.01%
*VALLE DE GUADALUPE	0	0.00%
*HOSTOTIPAQUILLO	0	0.00%
TOTAL	181,607,818	100.00%

\* *Varios*

Tabla 5. Datos comparativos acumulados al último mes del año 2000 de la producción de la industria tequilera de las diferentes regiones productoras (litros al 40% Alc.Vol.)

En la tabla 2, podemos observar que la exportación del tequila de 1990 al 2000 se ha duplicado, pero el consumo nacional se ha triplicado. Aun así, la exportación del tequila es mayor en comparación al consumo nacional. En la tabla 3, se tiene un comparativo al mes de diciembre de los dos últimos años, donde la exportación presentó un ligero incremento pero el consumo nacional y la producción total presentó un déficit. En la tabla 4, se tiene un acumulado de cada uno estos años, y la tendencia es muy parecida al mes de diciembre.

En esta tabla 5 se puede ver que el municipio de Tequila sigue siendo el principal productor del tequila, abarcando un total del 52.86% en el año del 2000 y Arandas (de la región de los Altos) es el segundo lugar de producción del tequila con el 14.4% en el mismo año. Jalisco es el estado que produce más del 95% del tequila, siendo que existen otros estados autorizados para la producción.

### *2.3.2. Legales*

#### Denominación de origen

Se entiende por denominación de origen el nombre de una región geográfica del país que sirve para designar un producto originario de ese lugar, y cuya calidad o característica se deba exclusivamente al medio geográfico comprendido en éste, con los factores naturales y humanos propios.

#### Acuerdo

En 1997 el gobierno de México y la Comunidad Europea firmaron el acuerdo "México-Comunidad Europea sobre Bebidas Espirituosas", para el reconocimiento mutuo y la protección de las denominaciones en el sector de las bebidas espirituosas, entre las que se encuentran el Mezcal y el Tequila.

En el Acuerdo se establecen las disposiciones de aplicación bilateral sobre no discriminación y reciprocidad. En la Comunidad quedan como denominaciones protegidas mexicanas la del Mezcal y la del Tequila, mismas que sólo podrán ser utilizadas en las condiciones previstas en la legislación y reglamentación mexicana.

El acuerdo culminó un periodo de negociaciones entre las dos partes que se inició desde hace más de 10 años, y representa un importante instrumento que garantizará a los productores de Mezcal y Tequila el reconocimiento y origen distintivo de estas

denominaciones, en los 15 países miembros de la Comunidad Europea y en los países miembros del arreglo de Lisboa. En este sentido los productores mexicanos tendrán mayores incentivos para exportar a Europa las bebidas con las denominaciones Mezcal y Tequila, producidas mediante los procedimientos, y en las regiones geográficas de México indicados en las respectivas declaraciones de protección como denominaciones de origen.

Se podrán utilizar únicamente estas denominaciones en las condiciones establecidas en sus respectivas legislaciones; no se permitirán el uso de denominaciones o de términos tales como "Clase", Tipo", "Estilo", "Imitación", o "Modo", que puedan causar confusión con respecto al origen de los productos, y será posible extender la protección establecida en este acuerdo, a otras denominaciones de bebidas espirituosas de interés para cualquiera de las dos partes.

#### Acreditamiento CRT.-

El Consejo Regulador del Tequila (CRT) es un organismo acreditado para verificar y certificar el cumplimiento de la Norma Oficial Mexicana NOM-006-SCFI-1994, Bebidas Alcohólicas-Tequila-Especificaciones; para lo cual cuenta con el Acreditamiento de la Entidad Mexicana de Acreditación UVNOM 002 con referencia No. 99UV0016 como Unidad de Certificación y con el No. 05 con oficio 312.16.98.055 como Organismo de Certificación (acreditado por SECOFI).

#### NOM.

Esta Norma Oficial Mexicana (NOM) se refiere a la Denominación de Origen TEQUILA, cuya titularidad corresponde al Estado Mexicano en los términos de la Ley de la Propiedad Industrial. La emisión de esta NOM es necesaria, de conformidad con el punto 2 de la Declaración General de Protección a la Denominación de Origen "TEQUILA", publicada en el Diario Oficial de la Federación el 13 de octubre de 1977 (en lo sucesivo referida como "la Declaración") y con la fracción XV del artículo 40 de la Ley Federal sobre Metrología Normalización.

El objetivo de esta NOM es establecer las características y especificaciones que deben cumplir los usuarios autorizados para producir, envasar y/o comercializar tequila. Cabe

resaltar que dentro de estas especificaciones las clasificaciones o categorías son un punto muy importante para definir el origen de cada uno de los tequilas, por lo que se mencionan a continuación:

Clasificación,(categorías).

De acuerdo al porcentaje de los azúcares provenientes del agave que se utilicen en la elaboración del tequila, éste se puede clasificar en una de las categorías siguientes:

**Tequila 100% de agave o Tequila 100% puro de agave.-**

Producto que se obtiene de la destilación y rectificación de mostos, preparados directa y originalmente del material extraído, dentro de las instalaciones de la fábrica, derivado de la molienda de las cabezas maduras de agave, previa o posterior hidrolizadas o cocidas, y sometidos a fermentación alcohólica con levaduras, cultivadas o no. Para que este producto sea considerado como “Tequila 100% de agave” o “Tequila 100% puro de agave”, debe ser embotellado en la planta de envasado que controle el propio fabricante, misma que debe estar ubicada dentro de la zona de denominación de origen.

**Tequila.-**

Producto que se obtiene de la destilación y rectificación de mostos, en cuya formulación se han adicionado hasta una proporción no mayor del 49% de azúcares distintos a los derivados de la molienda, extraídos dentro de las instalaciones de la fábrica, de las cabezas maduras del agave, previa o posterior hidrolizadas o cocidas y sometidos a fermentación alcohólica con levaduras, cultivadas o no, en la inteligencia que no están permitidas las mezclas en frío.

**Especificaciones.-**

La graduación alcohólica en el tequila se estableció como mínimo un 38% y como máximo un 55%. Para la dilución debe ser usada agua potable destilada o desmineralizada (desionizada). La NOM ha considerado una modificación en la graduación, estableciendo un 35% como mínimo.



	Tipo I Tequila Blanco		Tipo II Tequila abocado		Tipo III Tequila reposado		Tipo IV Tequila añejo	
	mínimo	máximo	mínimo	máximo	mínimo	máximo	mínimo	máximo
Grado alcohólico real a 15 % en la escala Gay Lussac.	38.00	55.00	38.00	55.00	38.00	55.00	38.00	55.00
Extracto seco (g / L)		0.20		5.00		5.00		5.00
Valores expresados en mg / 100 mL referidos a alcohol anhidro.								
Alcoholes superiores (en alcohol amílico)	0.00	400.00	0.00	400.00	0.00	400.00	0.00	400.00
Metanol	0.00	300.00	0.00	300.00	0.00	300.00	0.00	300.00

Tabla 6. Especificaciones de análisis fisicoquímicos establecidas por la NOM para el tequila.

En la tabla 6, se establecen los parámetros que se pueden medir para diferenciar los diferentes tipos de tequilas. El tipo I corresponde al tequila blanco, el II al tequila abocado, es decir, aquel que no a sufrido procesos de maduración y se le ha adicionado algún colorante natural, el tipo III corresponde al tequila reposado y el tipo IV al tequila añejo. Como se puede observar no existe ningún parámetro que se pueda medir (entiéndase algún tipo de análisis fisicoquímico) para diferenciar un tequila del otro.

### 3. Compuestos volátiles responsables del aroma en los alimentos

#### 3.1. Importancia

El sabor es una sensación muy compleja que involucra la combinación de los sentidos químicos del gusto y del olfato, además de un efecto denominado en inglés como “trigeminal” (factor desencadenante), el cual considera otro tipo de sensaciones que no involucran a ninguno de los dos sentidos anteriores; por ejemplo, la respuesta a la pungencia de las especias y la frescura del mentol (Umano *et al.*, 1999).

El sentido del olfato es el que detecta el **aroma**, el cual es una sensación muy compleja. Se estima que hasta 10,000 compuestos podrían estar involucrados para un solo aroma. Esta sensación es detectada en una pequeña área por medio de vellosidades microscópicas que se encuentran en la zona nasal; mediante receptores específicos se generan señales que son transmitidas al cerebro, el cual lo interpreta como una sola respuesta (Umano, *et al.*, 1999).

### 3.2. Principales compuestos

Los principales compuestos que integran el aroma se pueden dividir por grupos funcionales.

Hidrocarburos: pueden ser saturados o insaturados como el 1,3-*trans*-5-*cis*-undecatrieno.

Alcoholes: los saturados se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza como el metanol, etanol, 3-octanol, etc., pueden ser ramificados como el alcohol isoamílico, 2,6-dimetil-2-heptanol, etc. Dentro de los insaturados se encuentra el *trans*-2-hexen-1-ol.

Aldehídos y acetales: los acetales derivan de los aldehídos alifáticos y contribuyen al aroma alcohólico de las bebidas; uno de los problemas de éstos compuestos es que son poco estables. Como ejemplo de aldehídos están el hexanal, octanal, *trans*-2-hexenal.

Cetonas: son las que en menor proporción se han encontrado en las fragancias de los alimentos. Como ejemplo se tiene a la acetoina (3-hidroxi-2-butanona) y el diacetilo (2,3-butanediona).

Ácidos y ésteres: Los ácidos saturados como el C<sub>3</sub> proporcionan notas de frutas pero los C<sub>4</sub> y C<sub>6</sub> dan notas a queso. Dentro de los compuestos más comunes que dan el aroma son los ésteres y los aldehídos, ejemplos: acetato de etilo y butirato de isoamilo.

Compuestos azufrados y nitrogenados: dentro de este grupo de compuestos se encuentran los responsables del aroma a cebolla, ajo y mostaza; ejemplo: alil isotiocianato.

Terpenos: los terpenos se pueden dividir en acíclicos y cíclicos, y para cada una de estas divisiones se pueden encontrar todas las antes mencionadas, es decir, hidrocarburos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ácidos, ésteres, compuestos azufrados y nitrogenados, además de encontrarse otras variantes como bicíclicos, tricíclicos, lactonas, etc. También se pueden encontrar compuestos aromáticos con el mismo número de divisiones (Ho *et al.*, 1993, Jella *et al.*, 1998).

### 3.3. Estrategias de análisis

Por la amplia diversidad de compuestos que integran el aroma es necesario tener varias estrategias de análisis (Umano *et al.*, 1999).



Para poder implementar una estrategia o metodología de análisis de los compuestos volátiles, es importante definir primero cual es el objetivo del análisis del aroma. Para esto se puede agrupar de la siguiente manera:

1. Obtener el aroma “completo”, es decir, poder realizar una extracción cuantitativa y cualitativamente exacta, de todos los compuestos que constituyen el aroma en el alimento. No es posible obtener el aroma completo, sino un perfil muy cercano, debido a las dificultades ya mencionadas. En este caso se tiene que recurrir a más de una técnica de extracción para poder obtener el más amplio intervalo de compuestos que sean posibles. Una buena combinación de técnicas sería utilizar el método de purga y trampa para los compuestos más volátiles, y la extracción con disolventes para los demás compuestos. El perfil podría estar sesgado en la parte cuantitativa por lo que es necesario utilizar patrones internos. Idealmente el mejor método es utilizar marcadores isotópicos puros, los cuales son monitoreados por espectrometría de masas.
2. Compuestos clave que contribuyen en las propiedades sensoriales. Para esto se debe tener un extracto que represente el aroma. En este punto no se realizará un estudio completamente analítico sino un estudio combinado, se da un mayor peso a la parte sensorial. Al obtener el extracto representativo del aroma, se procederá a realizar varias diluciones, con el fin de definir cuales son los compuestos clave del aroma; al mismo tiempo se realizan los análisis en cromatografía para ir definiendo los principales compuestos.
3. Identificación de notas aromáticas indeseables. El método es un poco más sencillo, ya que se parte del extracto del aroma del alimento fresco y se compara con el extracto del aroma del alimento modificado. En esta identificación se puede recurrir a métodos sensoriales y/o analíticos.
4. Determinar perfiles de aroma para predecir respuestas sensoriales. En este punto no se requiere obtener un perfil exacto del aroma, sino obtener el perfil de los principales compuestos responsables del aroma. La comparación se realiza por correlación estadística. Este método se utiliza principalmente para monitoreo de control de calidad, en la mayoría de los casos es más sencillo que los otros métodos.

Una vez elegida una estrategia de análisis, se definen las técnicas de extracción a utilizar, las cuales se basan en las características fisicoquímicas de los compuestos responsables del aroma (Kataoka, *et. al.*, 2000; Sides, *et.al.*, 2000). Algunas de estas técnicas son:

Por volatilidad: “headspace” estático, “headspace” dinámico, destilación molecular, extracción por arrastre de vapor, purga y trampa, microextracción en fase sólida.

Por solubilidad: extracción con disolventes, extracción con fluidos supercríticos, la extracción en fase sólida.

La cromatografía es la técnica mas utilizada para poder separar, identificar y cuantificar los compuestos de un extracto.

## 4. Terpenos

### 4.1. Definición y clasificación

Este grupo de compuestos denominados como **terpenos** se encuentra ampliamente distribuidos en plantas y animales. La palabra deriva de “turpentina” (trementina), que es la fracción volátil obtenida de la oleoresina que exuda de la superficie de un corte del pino resinero (Davies *et al.*, 1969).

Estrictamente el término terpeno se debe utilizar sólo para los compuestos hidrocarbonados, y cuando se trata de compuestos oxigenados, como alcoholes, aldehídos, cetonas, ácidos, etc., se deben llamar *terpenoides*, aunque los dos términos se han utilizado indistintamente. En las plantas se han caracterizado alrededor de 29 000 de estos compuestos, que asumen un sinnúmero de papeles en su metabolismo (McCaskill y Croteau 1998). Los terpenos tiene un origen biosintético en común, están formados por una o más unidades de isopreno, o bien por una variación de esta misma unidad. Entonces en términos generales a los terpenos también se les suele llamar isoprenoides (Hans-Walter, 1997).

La isomería es muy común entre los terpenoides, y cuando se aíslan de las plantas, se pueden obtener pares de isómeros como es el caso del geraniol y el nerol. Los terpenos pueden ser alicíclicos o cíclicos. Generalmente en los cíclicos de seis carbonos la estructura se encuentra en forma de silla, aunque puede haber diferentes conformaciones

geométricas, según sean los sustituyentes que tenga el anillo. Por lo tanto, la estereoquímica de los terpenoides cíclicos a veces es muy difícil de determinar. Además debe recordarse que la isomerización y las modificaciones estructurales dentro de la molécula pueden llevarse a cabo rápidamente, aun bajo condiciones moderadas de reacción, por lo que la formación de otras sustancias siempre es posible que se lleve a cabo durante los procesos de aislamiento y de separación (Swain 1966; Miller, 1973).

Según Ruzicka, quien ha estudiado ampliamente este tipo de compuestos, las moléculas de isopreno o isopentano se unen cabeza-cola, como lo publicó en su “Regla del isopreno biogénico”, pero se han encontrado casos de moléculas en los que los arreglos no son cabeza-cola. Sin embargo, la regla del isopreno sí es válida en la mayoría de los casos (Swain 1966; Miller, 1973). Debido a la unidad que forma estos compuestos, la clasificación se basa en moléculas que contienen átomos de carbono en un número múltiplo de cinco, lo que da lugar a la siguiente clasificación:

Nombre	Número de carbonos	Ejemplo
Hemiterpenos	5 (1 x 5)	Reguladores del crecimiento
Monoterpenos	10 (2 x 5)	Aceites esenciales
Sesquiterpenos	15 (3 x 5)	Aceites esenciales
Diterpenos	20 (4 x 5)	Resinas ácidas
Sesterpenos	25 (5 x 5)	Resinas ácidas
Triterpenos	30 (6 x 5)	Saponidas
Tetraterpenos o carotenoides	40 (8 x 5)	Pigmentos
Politerpenos	( n x 5), n > 8	Hule

Tabla 7. Clasificación de los terpenos en función del número de carbonos, algunos ejemplos de cada uno.

Es frecuente asociar la palabra terpeno con el término aceite esencial. Como podemos ver en la tabla 7 los monoterpenos y sesquiterpenos son los principales compuestos que se encuentran en dichos aceites (Swain 1966; Miller, 1973).

#### *Monoterpenos.*

El punto de ebullición de la mayoría de estos compuestos es de aproximadamente 140 a 180°C, y pueden dividirse en tres grupos: en acíclicos como el geraniol, monocíclicos como el limoneno y en bicíclicos como  $\alpha$  y  $\beta$  pineno. Dentro de cada grupo, los

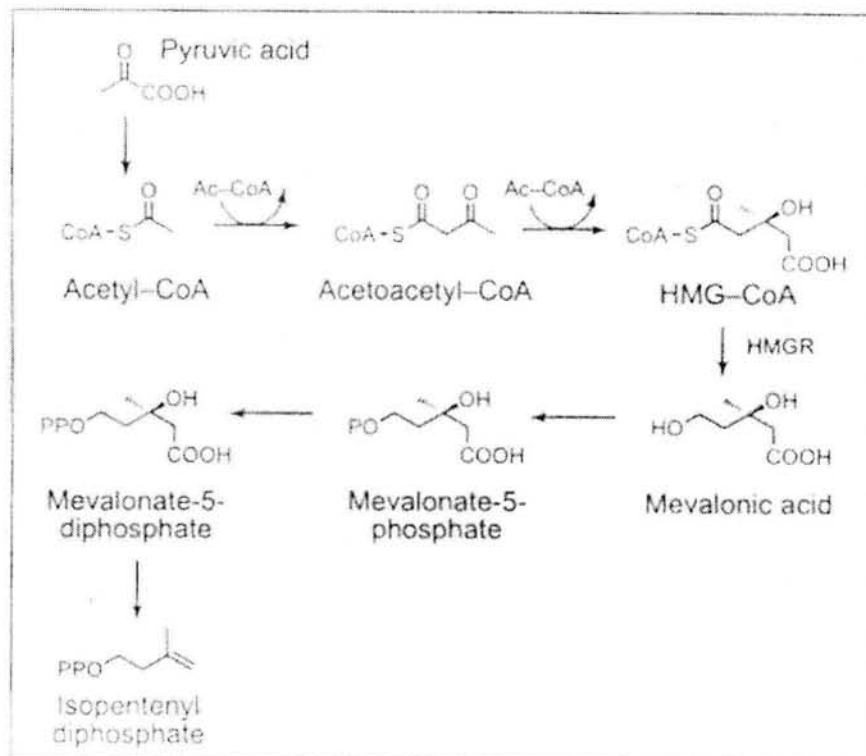
monoterpenos pueden ser hidrocarburos no saturados o saturados, también pueden presentar algún grupo funcional (Swain 1966; Miller, 1973).

#### *Sesquiterpenos.*

El punto de ebullición de la mayoría de éstos, está por arriba de los 200°C, y forman la fracción de punto de ebullición mas alto de los aceites esenciales. Los compuestos pueden presentar insaturaciones con estructuras tan diversas como son: acíclicos, monocíclicos, bicíclicos y tricíclicos. El compuesto más frecuente de los sesquiterpenos acíclicos es el farnesol. Muchos de los sesquiterpenos monocíclicos tienen un esqueleto común que varia en la localización de dobles ligaduras y grupos funcionales. Los sesquiterpenos bicíclicos se pueden dividir en grupos como: el del naftaleno y el del azuleno, según sean las estructuras aromáticas que se producen por deshidrogenación. La destilación a baja temperatura es suficiente para convertir a algunos terpenoides azulogénicos en azuleno, y se cree que estos se encuentran libres en la naturaleza (Swain 1966; Miller, 1973).

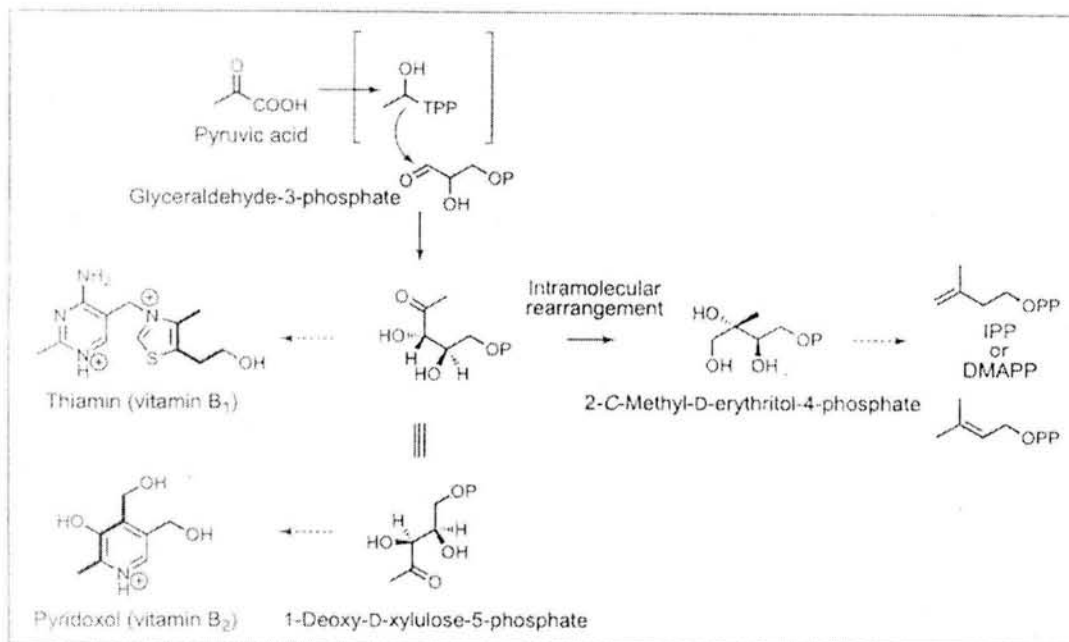
#### **4.2. Biosíntesis**

El conocimiento fundamental de los aspectos químicos de los terpenoides fue elucidado por los trabajos realizados por Wallach y Ruzicka, con su “Regla del isopreno biogenético”, pero esta teoría no explica como se realiza la biosíntesis ya que el isopreno no es la molécula que interviene en esta reacción *in vivo*. La ruta biosintética de los isoprenoides fue descubierta por Konrad Bloch y Lynen. Encontrando que el precursor de la biosíntesis de los terpenoides es el isopentil pirofosfato y que a su vez su precursor es la acetil CoA (Swain 1966).



**Figura 2.** Ruta del acetato – mavelonato, para la biosíntesis del precursor de los terpenos en el citoplasma (tomado de McCaskill y Croteau 1998).

La ruta de síntesis del isopentil pirofosfato es conocida como la del acetato-mavelonato (figura 2) y está demostrado que esta ruta es exclusiva para la biosíntesis del isopentil pirofosfato en todos los organismos y en particular para el reino animal. Aunque en estudios recientes utilizando como marcador carbono 13 ( $C^{13}$ ) se ha demostrado la existencia de una ruta no acetato-mavelonato para la biosíntesis de terpenos, en eubacterias y plantas primitivas (como: el *Ginkgo biloba*). La ruta inicia con el gliceraldehído-3-fosfato (GAP) que se forma a partir de ácido pirúvico, por lo que la ruta se denomina GAP-piruvato, teniendo como lugar de síntesis un plástido dentro de la célula (figura 3).



**Figura 3.** Ruta de la GAP – piruvato, para la biosíntesis del precursor de los terpenos en plastidos (tomado de McCaskill y Croteau 1998).

Las plantas presentan múltiples rutas paralelas para la biosíntesis de los terpenos, al mismo tiempo que múltiples lugares de reacción. En un momento dado se podría definir que la ruta del acetato-mavelonato se realiza en el citoplasma de la célula y es la responsable principalmente de la síntesis de esteroides y sesquiterpenoides, mientras que la ruta dentro de los plástidos es para la síntesis de isopreno, carotenoides, monoterpenos y diterpenos; también se ha reportado que en las mitocondrias se puede llevar a cabo la biosíntesis. (figura 4) (Heldt, 1997, McCaskill y Croteau 1998).



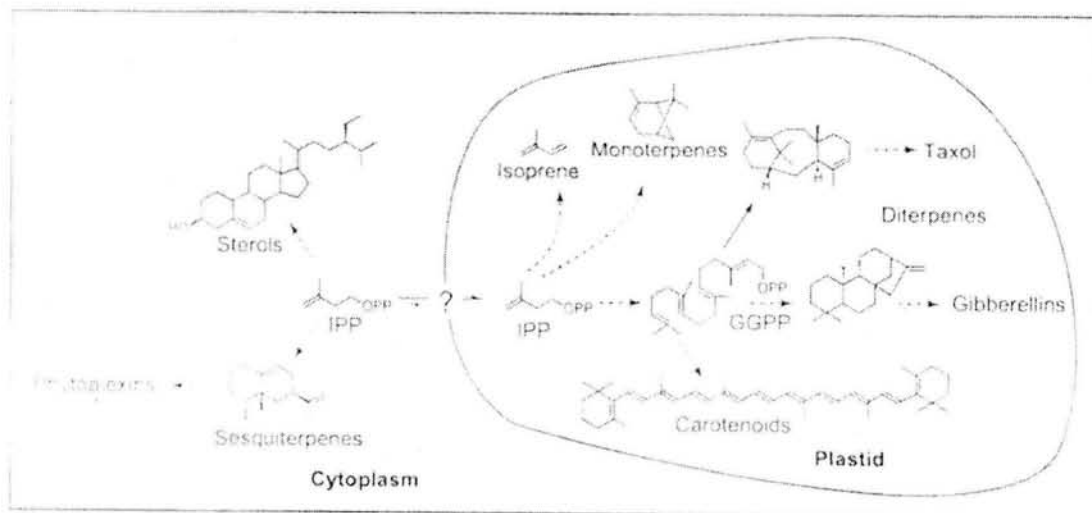


Figura 4. Ejemplo de cómo se pueden llevar a cabo las rutas de biosíntesis de los terpenos dentro de una célula. (tomado de McCaskill y Croteau 1998).

Por isomerización del isopentil pirofosfato se puede generar el dimetilalil pirofosfato, que mediante una enzima denominada prenil transferasa se lleva a cabo la elongación de la cadena para generar los monoterpenos, sesquiterpenos, etc. En la tabla 8 se muestran los diferentes precursores de cada una de las clases de terpenos (Heldt, 1997).

Precursor	Clase	Ejemplo	Función
C5:Dimetilalil-PP	Hemiterpeno	Isopreno	Protección del aparato fotosintético en contra del calor.
C5: Isopentil-PP	Monoterpenos	Cadenas laterales de la citoquina	Reguladores del crecimiento
C10:Geranil-PP	Monoterpenos	Linalol Pino	Atractante Sustancia de defensa
C15:Farnesil-PP	Sesquiterpenos	Capsidiol	Fitoalexina
C20:Geranilgeranil-PP	Diterpenos	Giberilina Forbol	Hormona de la planta Sustancia de defensa
C30: 2Farnesil-PP	Triterpenos	Colesterol Sitosterol	Constituyente de membrana Constituyente de membrana
C40: 2Geranilgeranil-PP	Tetraterpenos	Carotenoides	Pigmentos fotosintéticos
Geranilgeranil-PP o Farnesil-PP	Poliprenoles	Dolicol	Transportador de glicosidos

Tabla 8. Diferentes precursores de terpenos en plantas superiores (tomado de Heldt, 1997)

La hidrólisis del geranil-PP da como resultado a su alcohol correspondiente el geraniol que es el constituyente principal del aceite de rosas. El geraniol es la típica esencia de geranios recién cortados. Acompañado de un rearrreglo la hidrólisis del geranil-PP puede producir linalol que es una sustancia aromática que se encuentra en varias flores (Heldt, 1997).

Por ejemplo, en la síntesis del limoneno por la limoneno sintetasa, el limoneno presenta un 94 % de rendimiento pero también llegan a formarse otros productos como el mirceno,  $\alpha$ -pineno y el  $\beta$ -pineno con un rendimiento del 2 % de cada uno. Por lo que una misma enzima pueden sintetizar una variedad de terpenos (Heldt, 1997).

El farnesil pirofosfato es el precursor para la formación de sesquiterpenos. El número posible de productos que se pueden formar a partir de la ciclización del farnesil pirofosfato es enorme: se han podido identificar a más de 200 diferentes estructuras de anillo. El proceso de biosíntesis es similar al mecanismo de ciclización del geranil-PP. (Heldt, 1997).

### ***Funciones fisiológicas***

Los triterpenos como el colesterol y sitosterol pueden formar parte de las membranas celulares. Otra clase son los esteroides denominadas saponinas que funcionan como toxinas para los herbívoros. Estos compuestos se encuentran generalmente unidos a cadenas de oligosacáridos que pueden estar formados por glucosa, galactosa, xilulosa y otras hexosas. También los terpenos pueden encontrarse unidos a lípidos como es el caso de la plastoquinona que necesita una cadena isoprenoide como anclaje a la membrana. Recientemente se han encontrado un sinnúmero de proteínas que se encuentran enlazadas a cadenas de terpenos (Heldt, 1997).

Los aceites esenciales o volátiles tienen propiedades fisicoquímicas diferentes de los aceites fijos o fracción lipídica de la planta. Con excepción del aceite esencial de almendras amargas y el de mostaza, que se producen por hidrólisis de glucoterpenos, los aceites volátiles ya se encuentran como tales en las plantas y son secretados por las células en ductos, cavidades y pelos glandulares. Algunas veces los aceites esenciales están en glándulas especiales en la superficie de las hojas, mientras que los carotenoides están asociados con los cloroplastos en las hojas y los cromoplastos en los pétalos de las flores (Miller 1973).

Frecuentemente estos aceites se encuentran asociados a otras sustancias, y tienden a resinificarse por exposición al aire. El olor y el sabor de los aceites esenciales están determinados principalmente por sus constituyentes oxigenados, ya que presentan un grupo polar que puede favorecer su solubilidad en medios acuosos (Miller 1973).

Los terpenoides tienen diferentes funciones dentro de las plantas. Como metabolito primario sus funciones son: transportador de electrones, constituyente de membranas, pigmentos fotosintéticos (los carotenoides contribuyen al color de las plantas y también actúan como pigmentos accesorios en la fotosíntesis), fitohormonas (dos de los principales reguladores de crecimiento son las abscisinas sesquiterpenoides y las giberelinas) y como acarreadores de grupos glucosil en las reacciones de glicosilación que está involucrado el crecimiento celular. Como metabolito secundario están presentes como: resinas, látex, aceites esenciales, agentes tóxicos para los herbívoros, antibióticos (que protegen a la planta contra micro-organismos patógenos). También varios de ellos funcionan como agentes de inhibición de la germinación y el crecimiento de plantas que puedan generar competencia por los nutrientes, y otros terpenoides forman parte de esencias, las cuales atraen los insectos y estos a su vez distribuyendo el polen o semillas de las plantas (Goodwin y Mercer 1974, Heldt 1997).

Se tiene muy pocos estudios sobre el catabolismo de los terpenos en las plantas. Los derivados con actividad biológica, como las fitohormonas, son convertidas con la adición de un grupo hidróxilo y una posterior glicosilación para generar una sustancia inactiva, que finalmente es depositada en una vacuola. Algunos afirman que pueden sufrir un reciclaje pero muchos cuestionan esta posibilidad. Algunos isoprenoides son muy estables. Un gran número de ellos se han encontrado como “reliquias” en los fósiles de organismos simples en los sedimentos de las rocas y en el petróleo. Los isoprenoides probablemente sean constituyentes de muchas formas simples de vida (Heldt, 1997).

### **4.3. Técnicas de extracción**

Aunque no es exclusivo, los aceites esenciales se encuentran principalmente en glándulas específicas de las hojas o pétalos de las plantas. La determinación de los aceites esenciales se puede realizar para cualquier otro tejido vegetal.

Los criterios que se utilizan para seleccionar la técnica de extracción son:

- Estado físico y composición de la matriz
- Distribución del aceite por toda la matriz de la muestra
- Cantidad del aceite que puede ser aislado
- Susceptibilidad de rearrreglos de los componentes (por calor, agua, etc.)
- Polaridad de los componentes
- Índice de volatilidad / punto de ebullición de los componentes
- Propósito del análisis: cualitativo vs cuantitativo

Primero hay que definir el tipo de matriz, para esto se puede recurrir a la literatura o realizar un análisis proximal. Es muy importante saber cual es la composición de la matriz donde se encuentran los terpenos, ya que pueden existir interacciones muy fuertes con los demás componentes presentes. Afortunadamente en la mayoría de los casos los aceites esenciales no presentan mucha dificultad para extraerse de la matriz, ya que la mayoría son poco lábiles y comúnmente se encuentran en cantidades de 0.1 a 5%.

Lo más adecuado es obtener la mayor cantidad de aceite esencial para definir un perfil muy cercano al que se presenta en la muestra. Hay que definir en que parte de la muestra es donde se encuentra el aceite esencial; en el caso de las plantas este se encuentra en las hojas y/o en los pétalos. También es importante saber si en el proceso de extracción puede o no involucrarse calor, ya que esto puede generar interferencias o descomposición de los terpenos; esto va en relación con su volatilidad, ya que se puede utilizar la destilación como método de extracción. También la polaridad de los componentes presentes en la matriz pueden ayudar a definir el tipo de disolventes que se utilizarán para realizar las extracciones. Todas esto va orientando hacia el tipo de análisis que se quiere realizar, ya sea cualitativo o cuantitativo.

### ***Extracción por arrastre de vapor***

Esta es la técnica de extracción más utilizada para los aceites esenciales. También se le conoce como hidrodestilación a presión atmosférica. El sistema de extracción debe contar con una sección donde se genere el vapor, este se conecta directamente con otra sección separada donde se encuentra el material biológico, aquí debe existir una salida para el vapor, el cual debe pasar por una sección donde se realice la condensación, y por último, una sección donde se recolecte el destilado. Dentro de los diferentes equipos

utilizados para este propósito, el llamado Clevenger es el más común. Esta técnica se utiliza para la separación de sustancias inmiscibles o poco solubles en agua, y son ligeramente más volátiles que los demás compuestos presentes. En la destilación de dos líquidos no miscibles, las cantidades relativas en peso de los líquidos que se recogen en el colector son directamente proporcionales a: 1) las presiones de vapor de los líquidos a la temperatura de destilación y 2) a sus pesos moleculares. Estos son los principios que constituyen la base de la purificación y separación de sustancias por arrastre en corriente de vapor. Existen muchos compuestos orgánicos de punto de ebullición relativamente alto, que con agua codestilan en una cantidad en peso lo suficientemente grande, para ser destilados con cierta rapidez por debajo de 100°C.

Una de las variantes de esta técnica es la hidrodestilación a baja presión. Dentro de las ventajas de esta técnica con respecto a la realizada a presión atmosférica, es que el extracto no se somete a temperaturas altas y por lo tanto los compuestos son menos susceptibles de sufrir descomposición térmica. Si se tiene una presión de 50 mmHg en el sistema, se podría destilar a una temperatura de uno 20° C. Con ésta técnica se puede generar “espuma” durante la destilación, por lo que se debe tener mucho cuidado. También se debe contar con un sistema de trampas donde las temperaturas estén por debajo de los 0° C, ya que al trabajar a baja presión, se puede perder mayor cantidad de los compuestos volátiles.

### ***Extracción con disolventes***

Para la extracción con disolventes de medios sólidos, el método más utilizado es el Soxhlet, que ha demostrado ser una técnica muy fácil y reproducible. Para la extracción de medios acuosos, se necesita utilizar disolventes de punto de ebullición bajo, como: el dietil éter, isopentano, hexano, cloruro de metileno o freón 11. Cuando se trata de una disolución acuosa muy diluida, la extracción líquido – líquido en continuo, es la que se prefiere debido a la capacidad de concentración que presenta.

Se utilizan generalmente tres tipos básicos de extracción líquido – líquido, que son:

- Extracción en lote (batch): consiste en la extracción del soluto en un solo paso.
- Extracción en continuo: se tiene un flujo continuo del disolvente extractante sobre la disolución del soluto. Este método se aplica particularmente cuando la relación

de distribuciones es relativamente pequeña, es decir, que se necesitaría varias extracciones sucesivas para realizar una buena extracción.

- Extracción continua en contracorriente: es similar al método anterior. Se tiene un flujo continuo del disolvente extractante sobre la disolución del soluto que tiene otro flujo constante pero en dirección contraria.

### ***Microextracción en fase sólida***

La microextracción en fase sólida (MEFS) es una técnica de preparación de muestra, fue desarrollada alrededor de 1990 por J. Pawliszyn y colaboradores. Como se puede ver en la figura 5, se describen las partes que componen el aparato para la MEFS; se tiene una fibra de sílice fundida que se encuentra recubierta por una fase estacionaria. Los analitos son directamente extraídos de la muestra y concentrados sobre la fibra. Esta novedosa técnica se puede utilizar en análisis de rutina en conjunto con la cromatografía de gases. Presenta varias ventajas frente a otros métodos de extracción, como: la extracción se puede realizar en muestras sólidas, líquidas o gaseosas, el tiempo total del análisis es relativamente corto, no se necesita utilizar disolvente, por lo que esto también implica una disminución en los costos del análisis. Su aplicación se da principalmente en compuestos volátiles o semivolátiles de cualquier procedencia.

El procedimiento de la microextracción se observa detalladamente en la figura 6. La microextracción en “headspace” (espacio vacío) se utiliza para compuestos volátiles donde la matriz a estudiar se encuentra principalmente en estado sólido, en estado líquido con compuestos de alto peso molecular, o donde la fibra se pueda ensuciar al entrar en contacto directo.



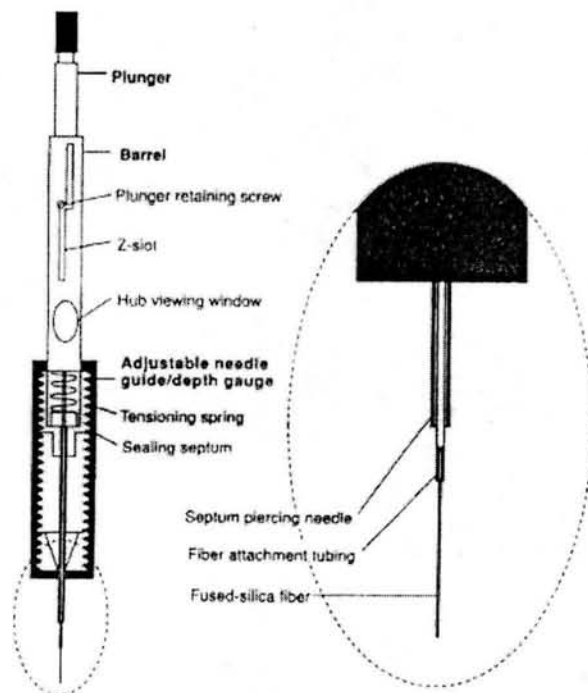


Figura 5. Aparato para realizar la microextracción en fase sólida (MEFS) (tomado de Kataoka, *et al.*, 2000)

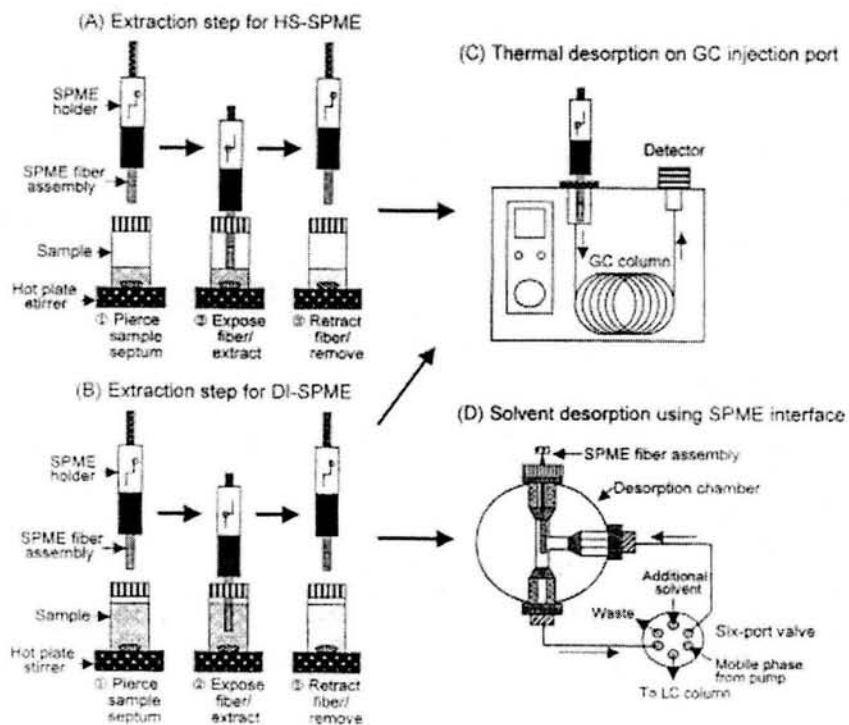


Figura 6. Microextracción en fase sólida (MEFS), a) en modo de Headspace (HS), b) en modo de inmersión directa (ID). En cualquiera de los dos formas se puede utilizar posteriormente para cromatografía de gases o de líquidos (tomado de Kataoka, *et al.*, 2000).

Otra opción es la inmersión directa, pero en este caso se debe de trabajar con matrices líquidas que se encuentren relativamente “limpias”. En cualquiera de las dos opciones se desorben los analitos en un cromatógrafo de gases o de líquidos.

El equilibrio de los analitos entre la matriz y la fase estacionaria de la fibra ,está sujeto principalmente a los principios de transporte de materia por difusión y convección. Esto se debe de tomar en cuenta para definir el tiempo destinado a la extracción.

Dentro de las diferentes fases que se encuentran actualmente en el mercado están: polidimetilsiloxano (PDMS) en tres diferentes espesores (7, 30 y 100  $\mu\text{m}$ ), poliacrilato (PA) con un espesor de 85  $\mu\text{m}$ , polidimetilsiloxano / polidivinilbenceno (PDMS/DVB), polietilenglicol / polidivinilbenceno (Carbowax/DVB), y polietilenglicol / resina templada y polidivinilbenceno (Carbowax/TR), estas tres fases tienen un grosor de 65  $\mu\text{m}$ , y por último carbón activado / polidimetilsiloxano (CA/PDMS) de 75  $\mu\text{m}$  de espesor. En la figura 7 se muestran en forma esquemática las características de polaridad y retención de cada una de las fases (Pawliszyn 1997).

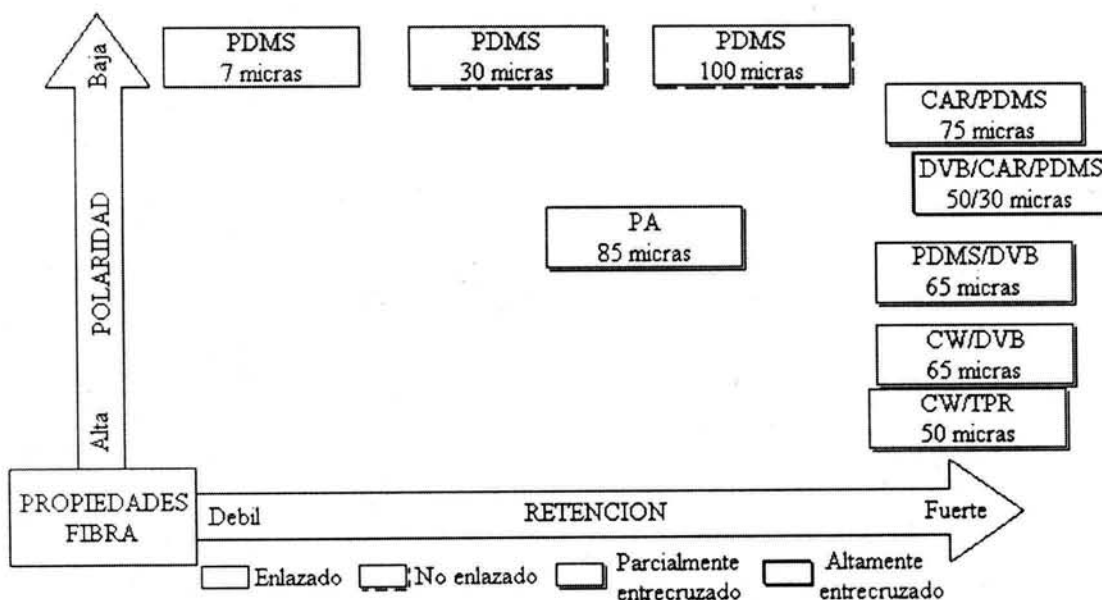


Figura 7. Fases de la fibra de la microextracción en fase sólida (MEFS) (tomado de Kataoka, *et al.*, 2000).

### ***Extracción en fase sólida***

Esta técnica de preparación de muestras es de las más utilizadas en los últimos años, debido a que puede acoplarse en línea con la cromatografía, se puede realizar una concentración previa de la muestra, etc.; además se puede automatizar todo el proceso.

Los principios en los que se basa son los mismos a la cromatografía de líquidos. Durante el desarrollo de una corrida cromatográfica, la fase móvil (líquido) transporta los analitos de la muestra a través de una fase estacionaria; en este proceso los diferentes analitos presentan interacciones que son selectivas con las fases, permitiendo separar los analitos de interés del resto de la muestra. Para esta técnica existe en el mercado una gran variedad de fases, al igual que en cromatografía de líquidos (Hennion, 1999).

### ***Purga y trampa***

Esta técnica de extracción también se conoce como “headspace” dinámico. La muestra se purga con un gas inerte como el nitrógeno o el helio; el cual realiza la extracción de los compuestos volátiles. Esta técnica se basa en los diferentes valores de presión de vapor de cada uno de los compuestos, que pueden ser removidos de la matriz por la fase móvil; estos compuestos pasan a través de una trampa que tiene una fase estacionaria donde se concentran los analitos, que posteriormente serán removidos al calentarse la trampa; los analitos al final son introducidos a un cromatografo de gasses. La fase estacionaria de la trampa puede ser: Tenax: la cual tiene poca afinidad por los compuestos polares y una alta afinidad por los compuestos no polares; carbón activado: es la que presenta una alta afinidad por todos los compuestos que constituyen el aroma. Para el caso de analitos que se encuentran a niveles de trazas, con solo 1 – 10 mg de carbón, se puede realizar la purga de una muestra, haciéndole pasar hasta 1000 litros de gas. Este tipo de trampas presenta una mayor eficiencia para compuestos aromáticos; por último está la trampa criogénica: es menos selectiva que las otras porque puede atrapar el agua que se encuentra en la muestra, y esto puede interferir con la cromatografía.

Esta técnica se basa en un primer equilibrio, entre las presiones de vapor de los constituyentes de la muestra y el gas acarreador, y en un segundo equilibrio, entre la capacidad de adsorción y retención de los compuestos volátiles y la fase estacionaria de la trampa.

### ***Extracción con fluidos supercríticos***

En esta técnica se utiliza un “disolvente” en condiciones de presión y temperatura por arriba del punto crítico. En estas condiciones el “disolvente” o fase móvil presenta la capacidad de solvatación de un líquido y las propiedades de transporte de un gas. El gas más comúnmente utilizado es el CO<sub>2</sub>, que en condiciones normales de presión y temperatura se volatiliza, obteniéndose así un extracto limpio de disolvente. Para el CO<sub>2</sub> la temperatura y presión del punto crítico son de 31.06°C y 7.38 MPa (73.8 bar). Los compuestos que se quieren extraer se deben disolver en el CO<sub>2</sub>. Los compuestos que se pueden extraer con esta técnica son no polares o poco polares.

### ***Destilación molecular***

Es un proceso en el cual los compuestos más volátiles se evaporan de la superficie del líquido, atravesando una distancia relativamente corta, y posteriormente se condensan sobre la superficie de un “dedo frío” bajo condiciones de alto vacío. Esto es el procedimiento ideal que se usa para remover los compuestos volátiles del aceite libre de agua de una muestra oleosa. Para mayor profundidad sobre el uso de esta técnica se puede encontrar en las publicaciones de Bemelmans (1981) y Schreier (1984).

#### ***4.4. Cromatografía de gases***

La cromatografía de gases es un método de separación que se utiliza en el análisis cualitativo y cuantitativo de compuestos volátiles. En este método los compuestos de una muestra, pasan de un estado líquido a un estado gaseoso, debido al incremento de la temperatura, y se separan entre sí como consecuencia del reparto, entre una fase móvil que en este caso se trata de un gas, y una fase estacionaria que se encuentra a lo largo de la columna; al final los compuestos pasan por un detector para su determinación.

Dentro de las características que deben tener los analitos para introducirse en un cromatógrafo de gases son: termoestables, de fácil evaporación y que presenten alguna afinidad por la fase estacionaria. Para este tipo de equipos se cuenta con un gran número de detectores, como: el de ionización de flama, que es considerado universal ya que

puede detectar los compuestos orgánicos o todos los que pueden ser flamables; el de captura de electrones, que es un detector muy selectivo y mas sensible; los sistemas acoplados, cromatografía de gases - masas o gases – infrarrojo, estos se complementan muy bien para realizar la identificación de los analitos, ya que adicional a las ventajas cromatográficas, se dispone también de la información espectroscópica de cada compuesto separado. Para la interpretación de los resultados espectroscópicos se cuenta con el apoyo computacional, que permite la comparación de los espectros (Skoog y West, 1989).

## IV. Objetivos

### General:

Determinar el perfil de los **compuestos terpénicos** en los productos de las diferentes etapas de la elaboración del tequila partiendo desde la materia prima.

### Específicos:

1. Establecer una metodología para el tratamiento de cada una de las muestras, apropiada para el análisis cromatográfico.
2. Optimizar todos los parámetros cromatográficos para el análisis de las muestras.
3. Determinar cualitativamente los compuestos terpénicos en el agave, mosto, mosto muerto (después de la fermentación), ordinario (primera destilación) y tequila blanco (segunda destilación).



## V. Desarrollo experimental

### 1. Materiales y equipo

#### 1.1. Reactivos y muestras

##### *Reactivos*

Isoctano,  $(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{-C}(\text{CH}_3)_3$ , Aldrich Chemical Company, Cat No. 25 877-6.

Acetona ( $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ ), J.T. Baker, Cas No. 67-64-1.

Alcohol Etilico Absoluto anhidro ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ), J.T. Baker, Cas No. 9014-03.

Alcohol metílico ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ), J.T. Baker, Cat No. 67-56-1.

Ácido clorhídrico (HCl), J.T. Baker, Cat No. 9535-02.

Cloruro de metileno, ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), Mallinckrodt, Cat No. 4881.

Cloruro de sodio cristal, (NaCl), J.T. Baker, Cat No. 3625-01.

Hidróxido de potasio, (KOH), Mallinckrodt, Cat No. 6984.

Sulfato de sodio anhidro, ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), J.T. Baker, Cat No.3898-01.

Los terpenos utilizados fueron: metil eugenol, eugenol, alcohol patchuli (mezcla de sesquiterpenos), acetato de isobornilo, alcanfor, borneol, canfeno, carvona, *p*-cimeno, farnesol, geraniol, isoborneol, limoneno, linalol, mentol, nerol, nerolidol,  $\gamma$ -terpineno,  $\alpha$ -terpineol, 4-terpineol y  $\alpha$ -pineno de Fluka Chemika.

Los estándares de parafinas utilizadas fueron de C-10 a C-19.

Se preparó una disolución de cada uno de los estándares que se utilizaron. Se pesaron alrededor de 100 mg de cada uno de ellos y se disolvieron en un volumen final de 10 mL, para obtener una disolución de aproximadamente 10,000 ppm. El disolvente que se utilizó para los terpenos fue etanol y para las parafinas fue isoctano. Se almacenaron en viales color ámbar con capuchón de aluminio, tapa con rosca y sellados con teflón a temperatura de refrigeración (4°C). Se tomó 1 mL de cada una de la disoluciones de los estándares y se mezclaron.

Hidrógeno ( $\text{H}_2$ ), nitrógeno ( $\text{N}_2$ ) y aire seco, todos de grado cromatográfico, de la compañía Infra. Helio (He) de ultra alta pureza de la compañía Praxair.

### *Muestras*

Se hizo un muestreo en diferentes puntos del proceso de elaboración de tequila 100 % agave.

Agave: se tomaron muestras de cuatro cabezas de agave en diferentes zonas del almacén, éstas se encontraban mezcladas, por lo que no se tenían datos específicos del origen de las muestras. Todas habían sido cosechadas en el estado de Jalisco. Estas muestras se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Mosto: se tomó una muestra del tanque antes de la fermentación; Mosto muerto: de este mismo tanque se tomó otra muestra después de la fermentación. Estas muestras se almacenaron a  $4^{\circ}\text{C}$ .

Ordinario: es el producto que se obtiene de la primera destilación del mosto muerto; tequila: es el producto que se obtiene de la segunda destilación. Se tomaron muestras de cada uno de ellos y se almacenaron en oscuridad a  $20^{\circ}\text{C}$ .

En todos los casos se utilizaron bolsas o frascos nuevos y limpios. Los frascos que contenían el mosto y el mosto muerto se taparon con papel aluminio y se cerraron con tapas con rosca. Se transportaron en frío (aproximadamente a  $0^{\circ}\text{C}$ ) durante el trayecto hasta antes de su almacenamiento. Estas muestras fueron proporcionadas por la empresa Tequila Herradura S.A. de C.V.

## **1.2. Equipos**

### *Cromatógrafo de gases*

Para la definición de las condiciones de análisis se utilizó un cromatógrafo de gases HP modelo 5880 con un inyector split/splitless, con un detector de ionización de flama. El gas acarreador utilizado fue hidrogeno ( $\text{H}_2$ ) grado cromatográfico, a 10 psi de presión.

Para el análisis cualitativo se utilizó un cromatógrafo de gases HP modelo 5890 con inyector split/splitless, con un detector acoplado de espectrometría de masas HP serie 5971, los análisis se efectuaron por ionización de impacto electrónico a 70 eV, la línea de transferencia estuvo a  $280^{\circ}\text{C}$ . Se utilizó el modo de barrido total de iones del espectro (SCAN). El gas acarreador utilizado fue Helio ( $\text{He}$ ) de ultra alta pureza a una presión de 10 psi.

## 2. Métodos

### 2.1. Separación cromatográfica de terpenos

Para seleccionar la mejor columna capilar, se realizaron pruebas con la mezcla de estándares.

Las columnas que se probaron fueron:

Columna polar (Columna Carbowax 20M, polietilenglicol, de 30 m de longitud, 0.32 mm de diámetro y 0.25  $\mu\text{m}$  de película).

Columna no polar (Columna SPB<sup>TM</sup>-1, polidimetilsiloxano, de 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro y 0.25  $\mu\text{m}$  de película).

Columna de baja polaridad (Columna: HP 5, fenilmetilsiloxano 5% entrecruzado; fase no polar 95% y fase polar 5%, de 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro y 0.25  $\mu\text{m}$  de película).

La temperatura del inyector, del detector y el programa de temperatura se establecieron con base al límite máximo de trabajo para cada tipo de columna. Inicialmente se trabajó con una rampa de 10°C/min en modo split con inyección directa.

La temperatura del inyector se estableció a la temperatura máxima de trabajo del septum, que en este caso fue de 250°C. La temperatura inicial se estableció en 40°C, tomando como referencia los puntos de ebullición de los analitos, el punto de ebullición del disolvente, y la temperatura mínima de trabajo de la columna. El tiempo inicial fue de 1 min (tiempo necesario para poder eliminar todo el disolvente presente).

Las pruebas para definir la mejor rampa de temperatura fueron: 15°C/min, 10°C/min, 5°C/min y 1°C/min.

La temperatura final de 210°C se estableció con base en el tiempos máximo de retención de los estándares de terpenos.

La segunda rampa que se muestra en las condiciones experimentales, obedece al estudio con muestras reales, es decir, los estándares de los terpenos se obtenían a una temperatura máxima de 210°C, pero en las muestras reales, se observan otros compuestos por arriba de esta temperatura. Con la finalidad de limpiar la columna de estos compuestos, hubo la necesidad de seguir con una segunda rampa, (10°C/min y tiempo final de 5 min).

Las mejores condiciones cromatográficas de trabajo fueron:

Columna: HP 5 (fenilmetilsiloxano 5% entrecruzado; fase no polar 95% y fase polar 5%) de 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro y 0.25  $\mu\text{m}$  de película.

Temperatura del inyector : 250°C

Temperatura del horno

Temperatura inicial : 40°C

Tiempo inicial : 1 min

Rampa de temperatura : 5°C/min

Temperatura final : 210°C

Tiempo final : 0 min

Rampa 2 de temperatura : 10°C/min

Temperatura 2 final : 280°C

Tiempo final : 5 min

Temperatura del detector 280°C (o línea de transferencia al módulo de espectrometría de masas).

La inyección se realizó en modo “splitless” por 2 min, y la adquisición de los datos en el espectrómetro de masas se inició 4 minutos después (solvent delay), tanto para la fibra de la microextracción en fase sólida como para la inyección directa.

## **2.2. Determinación de los índices de Kóvats**

Los índices de Kóvats se determinaron en los tres tipos de columnas utilizadas en la definición de las condiciones cromatográficas. Se utilizó la mezcla de estándares de parafinas, y la mezcla de estándares de terpenos. Se inyectaron estas mezclas en las mismas condiciones para cada una de las columnas:

Temperatura del inyector : 210°C

Temperatura del horno:

Temperatura inicial : 40°C

Tiempo inicial : 1 min.

Rampa de temperatura : 5°C/min.

Temperatura final : 210°C

Tiempo final : 5 min.

## 2.3. Espectroscopía de masas

En este caso se utilizó la biblioteca de espectros de masas del NIST (The NIST Mass Spectral Search Program for the NIST/EPA/NIH Mass Spectral library version 2.0a build Sep 18 2001). Con esta herramienta se identificaron los iones fragmentos característicos de cada uno de ellos. También se realizó la comparación de los espectros de masas de las muestras, con los espectros de masas obtenidos de los estándares.

Los analitos se ionizaron por impacto electrónico a 70 eV, la línea de transferencia fue de 280°C. Se utilizó el modo de barrido total de iones (SCAN, desde 15 hasta 500). El gas acarreador utilizado fue Helio (He) de ultra alta pureza.

## 2.4. Técnicas de extracción de terpenos

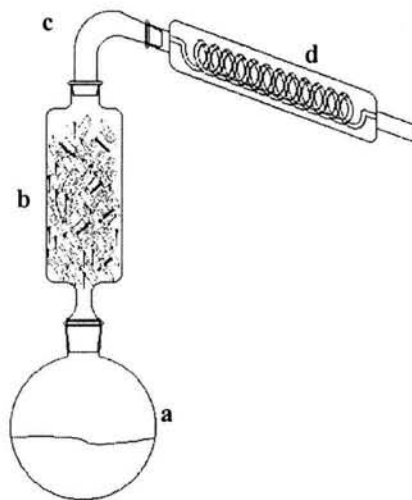
### 2.4.1. *Agave*

Las técnicas que se utilizaron para la extracción de los terpenos en el agave fueron:

- Extracción por arrastre de vapor
- Extracción con disolventes
- Micro-Extracción en Fase Sólida (MEFS)
- Combinaciones de éstas.

#### 2.4.1.1. *Extracción por arrastre de vapor (EAV)*

La extracción se realizó con un equipo diseñado para este propósito (figura 8). Las extracciones fueron para aproximadamente 450 g de muestra de agave. El volumen máximo de la destilación fue de 400 mL y el tiempo de extracción fue de aproximadamente 1.0 hora.



**Figura 8.** Equipo para realizar la extracción por arrastre de vapor. a) matraz (600 mL) donde se encuentra el agua destilada, b) columna (de 500 mL) donde se tiene la muestra de agave, c) codo de conexión y d) condensador.

#### 2.4.1.2. Extracción con disolvente (ED)

Las extracciones se realizaron aproximadamente para 25 g de muestra de agave. En un mortero se maceró la muestra con 10 mL del disolvente (diclorometano), se efectuaron 2 lavados con 5 mL del disolvente (2 x 5mL) y posteriormente se filtró a vacío. La emulsión que se obtuvo se centrifugó a 4000 rpm durante 15 min. Después se separaron la fase acuosa de la fase orgánica en un embudo de separación, y la fase orgánica se evaporó con nitrógeno (N<sub>2</sub>) hasta un volumen de 1 mL. Por último se inyectó 1 µL del concentrado de la fase orgánica al cromatógrafo de gases, a las condiciones ya establecidas.

#### 2.4.1.3. Micro-Extracción en Fase Sólida (MEFS)

La Micro-extracción en fase sólida (MEFS) se realizó en modo de Headspace (HS). En un vial de 11 mL se pesaron aproximadamente 1.8 g de muestra. Posteriormente se tapó con capuchón de aluminio, tapa con rosca y sellos de teflón; después se dejó en baño



María a una temperatura de 60°C durante 30 minutos y posteriormente se realizó la extracción por 1 minuto. La desorción térmica fue de 5 minutos en el inyector del cromatógrafo de gases a las condiciones ya establecidas.

#### *2.4.1.4. Extracción por arrastre de vapor (EAV) y Micro-Extracción en Fase Sólida (MEFS)*

De la extracción por arrastre de vapor se colectaron 300 mL (destilado). En un vial de 11 mL se agregó una alícuota de 5 mL del destilado. Por 30 min se mantuvo este vial tapado con capuchón de aluminio, tapa con rosca y sellos de teflón en baño María a una temperatura de 60°C con agitación constante (1200 rpm); posteriormente se realizó la MEFS-HS por 1 min. La desorción térmica fue de 5 minutos en el inyector del cromatógrafo de gases a las condiciones ya establecidas.

#### *2.4.1.5. Extracción por arrastre de vapor (EAV) y Extracción Líquido – Líquido (ELL)*

Del destilado de la extracción por arrastre de vapor se tomó una alícuota de 100 mL, a esta alícuota se le realizó la extracción con disolvente (diclorometano) 3 x 10 mL, se concentró la muestra hasta 1 mL evaporando el disolvente con nitrógeno. Se inyectó 1 µL de éste concentrado al cromatógrafo de gases a las condiciones ya establecidas.

### **2.4.2. Optimización del método de extracción**

Una vez establecida la metodología de extracción, se procedió a definir los parámetros de las técnicas (tiempo de extracción por arrastre de vapor y para la MEFS, el tipo de recubrimiento de la fibra, el tiempo de equilibrio de la muestra, la temperatura, el tiempo de extracción y el tiempo de desorción térmica).

#### *2.4.2.1. Determinación del tiempo de extracción por arrastre de vapor*

Para determinar el tiempo de extracción por arrastre de vapor, se dió seguimiento a la extracción. Se tomaron alícuotas de 50 mL hasta 400 mL totales. De cada alícuota se tomaron 5 mL, y se siguió el procedimiento descrito en 2.4.1.4.

#### 2.4.2.2. *Determinación del tipo de fibra*

Los tipos de recubrimientos que se utilizaron fueron:

PDMS 100  $\mu\text{m}$  : fase no polar

PDMS/DVB 65  $\mu\text{m}$  : fase de baja polaridad

CAR/PDMS 75  $\mu\text{m}$  : fase de polaridad intermedia

CW/DVB : fase muy polar

PA 85  $\mu\text{m}$  : fase polar

PDMS : Polidimetilsiloxano

DVB : divinilbenceno

CAR : carboxen

PA : poliacrilato

CW: carbowax

Para realizar la selección de la fibra, se utilizó un vial de 11 mL donde se adicionaron 5 mL de agua, mas 1  $\mu\text{L}$  de la mezcla de estándares de terpenos, y se siguió el procedimiento descrito en 2.4.1.4.

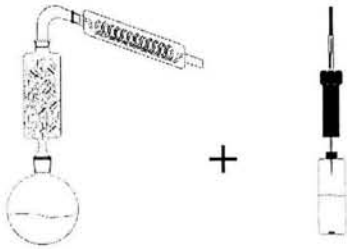
#### 2.4.2.3. *Determinación del tiempo de equilibrio (líquido – vapor) y temperatura de extracción*

En un vial de 11 mL se agregaron 5 mL del destilado; este vial tapado con capuchón de aluminio, tapa con rosca y sellos de teflón se mantuvo en un baño María a diferentes temperaturas (30, 40, 50, 60, 70 y 80°C), la extracción se realizó para diferentes tiempos de equilibrio (líquido – vapor) (5, 10, 15, 20, 30 y 45 min) y la agitación fue constante (1200 rpm). Posteriormente se realizó la MEFS-HS por 1 min. La desorción térmica fue de 5 minutos en el inyector del cromatógrafo de gases en las condiciones ya establecidas.

#### 2.4.2.4. Determinación del tiempo de extracción en "Headspace" y del tiempo de desorción térmica

En un vial de 11 mL se agregaron 5 mL del destilado. Para tener el equilibrio entre la fase líquida y la fase vapor, se mantuvo por 20 min el vial tapado con capuchón de aluminio, tapa con rosca y sellos de teflón, en un baño María a una temperatura de 65°C con agitación constante (1200 rpm); posteriormente se realizó la MEFS-HS a diferentes tiempos (1, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 45 y 60 min). La desorción térmica fue de 5 minutos en el inyector (cromatógrafo de gases) a las condiciones ya establecidas.

Por último se determinó el mejor tiempo de desorción térmica de la fibra en el inyector, se probaron varios tiempos (1, 2, 3, 4 y 5 min.) a 250°C. Una vez transcurrido el tiempo se volvía a introducir la fibra dejándola 10 minutos en el inyector para verificar que no se hubiera quedado retenido algún compuesto. Con estos resultados se determinaron las mejores condiciones de análisis para el *Agave tequilana* Weber variedad azul, (ver la tabla 9).

Técnicas de extracción:	Condiciones de análisis:	
 <p data-bbox="200 1529 711 1665">Extracción por arrastre de vapor (EAV), 450 g de muestra (1 hora) – Microextracción en fase sólida – Headspace (MEFS-HS).</p>	Tipo fase en la fibra	PDMS/DVB
	Volumen de muestra	5 mL (en 11 mL)
	Temperatura	65°C
	Agitación constante	1200 rpm
	Tiempo de equilibrio	20 min
	Tiempo de extracción	30 min
	Temperatura de desorción	250°C
	Tiempo de desorción	2 min

**Tabla 9.** Condiciones óptimas de análisis para la identificación de terpenos en el *Agave tequilana* Weber variedad azul.

### 2.4.3. Mosto

Para el caso del mosto se utilizó prácticamente la misma metodología propuesta para el destilado por arrastre de vapor del agave, ya que en los dos casos se trataba de un líquido y lo más conveniente era utilizar la MEFS en HS. Sólo se definió el mejor tiempo de extracción.

#### 2.4.3.1. Determinación del tiempo de extracción en Headspace

En un vial de 11 mL se agregaron 5 mL del mosto, se dejó por 20 min, tapado con capuchón de aluminio, tapa con rosca y sellos de teflón, en un baño María a una temperatura de 65°C con agitación constante (1200 rpm). Posteriormente se realizó la MEFS-HS a diferentes tiempos (1, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60 y 90 min). La desorción térmica fue de 2 minutos en el inyector del cromatógrafo de gases a las condiciones ya establecidas. Con estos resultados se definieron las mejores condiciones de análisis para el mosto. Ver la tabla 10.


Técnica de extracción:	Condiciones de análisis:	
 <p data-bbox="200 1535 711 1603">Microextracción en fase sólida – Headspace (MEFS-HS).</p>	Tipo fase en la fibra	PDMS/DVB
	Volumen de muestra	5 mL (en 11 mL)
	Temperatura	65°C
	Agitación constante	1200 rpm
	Tiempo de equilibrio	20 min
	Tiempo de extracción	30 min
	Temperatura de desorción	250°C
	Tiempo de desorción	2 min


Tabla 10. Condiciones óptimas de análisis para la identificación de terpenos en el mosto, para la producción de tequila 100% Agave.

#### 2.4.4. Mosto muerto

El mosto muerto, al ser el producto final de la fermentación del mosto se puede emplear la misma metodología. Solo se definió el mejor tiempo de extracción.

##### 2.4.4.1. Determinación del tiempo de extracción en Headspace

Se siguió el mismo procedimiento que en la sección 2.4.3.1. Con base en estos resultados se determinaron las condiciones de análisis para el mosto muerto, se pueden observar en la tabla 11.

Técnica de extracción:	Condiciones de análisis:	
 <p data-bbox="197 1369 707 1442">Microextracción en fase sólida – Headspace (MEFS-HS).</p>	Tipo fase en la fibra	PDMS/DVB
	Volumen de muestra	5 mL (en 11 mL)
	Temperatura	65°C
	Agitación constante	1200 rpm
	Tiempo de equilibrio	20 min.
	Tiempo de extracción	10 min.
	Temperatura de desorción	250°C
	Tiempo de desorción	2 min.

**Tabla 11.** Condiciones óptimas de análisis para la identificación de terpenos en el mosto muerto, para la producción de tequila 100% Agave.

### 2.4.5. Ordinario

Para el ordinario se utilizaron dos técnicas de extracción:

- Micro-Extracción en Fase Sólida (MEFS)
- Extracción con disolventes

#### 2.4.5.1. *Micro-Extracción en Fase Sólida - Headspece (MEFS-HS)*

En un vial de 11 mL se agregaron 5 mL del ordinario, se dejó por 20 min, tapado con capuchón de aluminio, tapa con rosca y sellos de teflón, en un baño María a una temperatura de 65°C con agitación constante (1200 rpm). Posteriormente se realizó la MEFS-HS durante 5 min. La desorción térmica fue de 2 minutos en el inyector del cromatógrafo de gases a las condiciones ya establecidas.

#### 2.4.5.2. *Micro-Extracción en Fase Sólida - Inmersión Directa (MEFS-ID)*

En un vial de 11 mL se agregaron 10 mL del ordinario, se dejó por 20 min, tapado con capuchón de aluminio, tapa con rosca y sellos de teflón, en un baño María a una temperatura de 25°C con agitación constante (1200 rpm). Posteriormente se realizó la MEFS-ID durante 5 min. La desorción térmica fue de 2 minutos en el inyector del cromatógrafo de gases a las condiciones ya establecidas.

#### 2.4.5.3. *Extracción Líquido-Líquido (ELL)*

Se tomaron 25 mL del ordinario y se le adicionaron otros 25 mL de agua destilada, posteriormente se realizó la extracción con 10 mL de diclorometano. Para realizar la extracción se dejó con agitación constante (1200 rpm) por 5 min a 25°C en baño María, esto se realizó tres veces. Se evaporó el disolvente con nitrógeno hasta 1 mL. Se inyectó 1 µL al cromatógrafo de gases a las condiciones ya establecidas.

Las condiciones más favorables para la determinación de los terpenos en el ordinario se observan en la tabla 12.


Técnica de extracción:	Condiciones de análisis:	
 <p data-bbox="274 839 642 942">Extracción líquido – líquido (Diclorometano) Inyección directa – CG-EM</p>	Disolvente	Diclorometano
	Volumen de muestra	25 mL
	Temperatura	25°C*
	Volumen disolvente	10 mL ( x 3)
	Volumen H <sub>2</sub> O	25 mL
	Tiempo de extracción	5 min
	Agitación constante	1200 rpm
	Evaporación con N <sub>2</sub>	Hasta 1 mL

Tabla 12. Condiciones óptimas de análisis para la identificación de terpenos en el ordinario, para la producción de tequila 100% Agave. \* Temperatura controlada en baño María.

#### 2.4.6. Tequila

Para el tequila se utilizaron dos técnicas de extracción:

- Micro-Extracción en Fase Sólida (MEFS)
- Extracción con disolventes

##### 2.4.6.1. Procedimientos

Se realizaron los mismos procedimientos que en el caso del ordinario, sección 2.4.5.



Las condiciones más favorables para la determinación de los terpenos en el tequila se observan en la tabla 13.


Técnica de extracción:	Condiciones de análisis:	
 <p data-bbox="279 787 642 901">Extracción líquido – líquido (Diclorometano) Inyección directa – CG-EM</p>	Disolvente	Diclorometano
	Volumen de muestra	25 mL
	Temperatura	25°C*
	Volumen disolvente	10 mL ( x 3)
	Volumen H <sub>2</sub> O	50 mL
	Tiempo de extracción	5 min
	Agitación constante	1200 rpm
	Evaporación con N <sub>2</sub>	Hasta 1 mL

Tabla 13. Condiciones óptimas de análisis para la identificación de terpenos en el tequila blanco, 100% Agave. \* Temperatura controlada en baño María.

## VI. Resultados

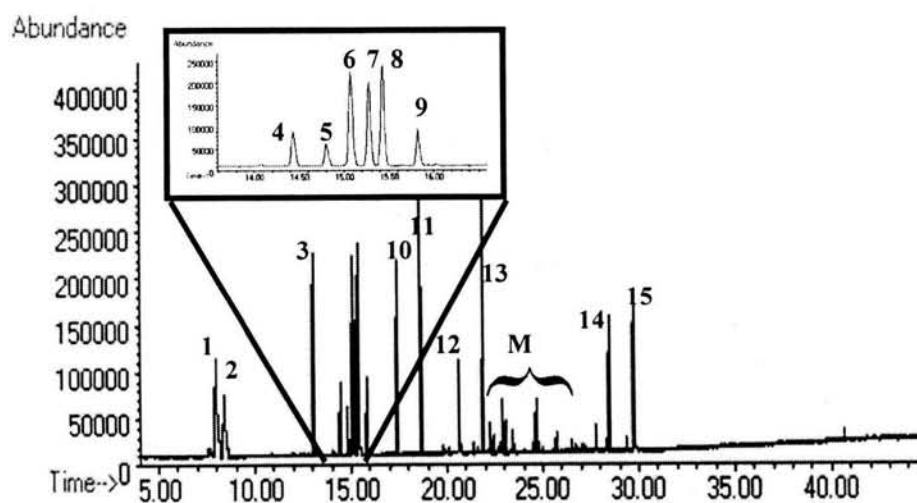
### Separación cromatográfica de terpenos

En la literatura se han reportado una gran variedad condiciones cromatográficas diferentes para el análisis de terpenos (Shimoda *et al.*, 1997; Cool *et al.*, 1998; Dongyan *et al.*, 1998; Luque de Castro *et al.*, 1999; Rohloff 1999; Warmers y Köning 1999; Benson *et al.*, 2001) Así, se decidió iniciar con la definición las condiciones de separación cromatográficas específicas para este caso.

Los resultados obtenidos nos indican que la columna que presentó mejor definición de los compuestos fue la de baja polaridad, ya que en esta columna se obtiene una mejor resolución de los compuestos que en las otras dos columnas.

Una vez definido el tipo de columna se procedió a la optimización de las condiciones de trabajo: inyector, detector y programa de temperaturas (ver desarrollo experimental). La segunda rampa que se muestra en las condiciones experimentales obedece a la necesidad de eluir los compuestos de mayor retención presentes en las muestras reales.

Un ejemplo del cromatograma que se obtuvo con estas condiciones se muestra en la figura 9.



**Figura 9.** Cromatograma de la mezcla de estándares de terpenos: 1)  $\alpha$ -pineno, 2) Canfeno, 3) Linalol, 4) Alcanfor, 5) Isoborneol, 6) Borneol, 7) Mentol, 8) 4-Terpineol, 9)  $\alpha$ -Terpineol, 10) Carvona, 11) Acetato de isobornilo, 12) Eugenol, 13) Metil-eugenol, 14) Alcohol patchuli, 15) Farnesol. M) Mezcla de sesquiterpenos hidrocarbonados presentes en el aceite de patchuli.

### Determinación de los Índices de Kóvats

Los índices de retención fueron introducidos por Kóvats. Este sistema se basa en utilizar como referencia a las *n*-parafinas, las cuales se eluyen en las mismas condiciones cromatográficas que los analitos. El valor del índice de las parafinas se define como:

$$I. K. = 100 n$$

Donde *n* es el número de carbonos de la parafina; el índice de los demás compuestos se calcula por interpolación lineal (Jalali-Heravi y Fatemi 2001).

Para la determinación de los índices de Kóvats se utilizaron tres tipos de columnas (ver desarrollo experimental). Los resultados obtenidos se muestran en las tablas 14,15 y 16, y en las gráficas 3, 4, y 5.

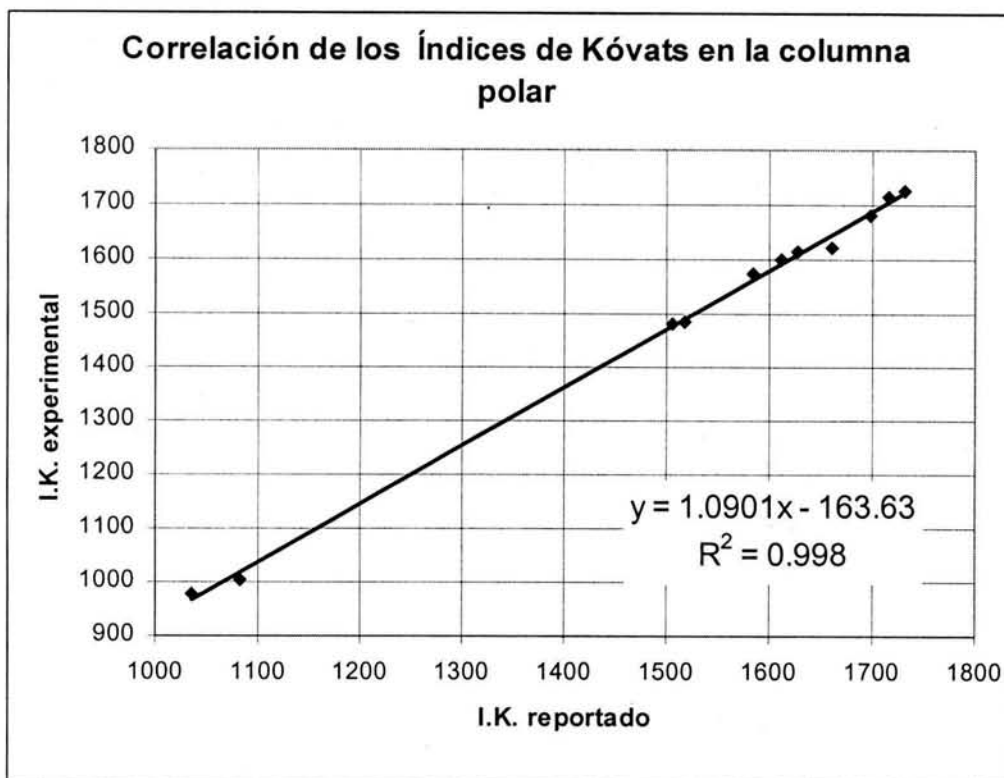
#### Columna polar

Compuesto	I. K. experimentales	I. K. reportado	Diferencia
$\alpha$ -pineno	978	1036	-58
Canfeno	1002	1083	-81
Linalol	1483	1506	-23
Alcanfor	1487	1518	-31
Isoborneol	1621	1660	-39
Borneol	1681	1698	-17
Mentol	1600	1612	-12
4-terpineol	1615	1628	-13
$\alpha$ -terpineol	1727	1731	-4
Carvona	1714	1715	-1
Acetato de isobornilo	1575	1584	-9

Tabla 14. Índices de Kóvats de los terpenos para columna polar (Carbowax 20M).

En la gráfica 3 se muestra la tendencia lineal que presentan los Índices de Kóvats (reportados vs experimentales) para una columna polar. Esta nos indica que existe una fuerte correlación lineal entre ambos datos, ya que se obtuvo un  $R^2$  de 0.998 (coeficiente de correlación de 0.999). En la tabla 15 se muestran los índices de Kóvats reportados y los que se obtuvieron experimentalmente para la columna no polar (SPB<sup>TM</sup>-1).

En la gráfica 4 se muestra la tendencia lineal que presentan estos datos, se obtuvo un  $R^2$  de 0.9977 (coeficiente de correlación de 0.9988), lo que nos sugiere que existe una fuerte correlación lineal.

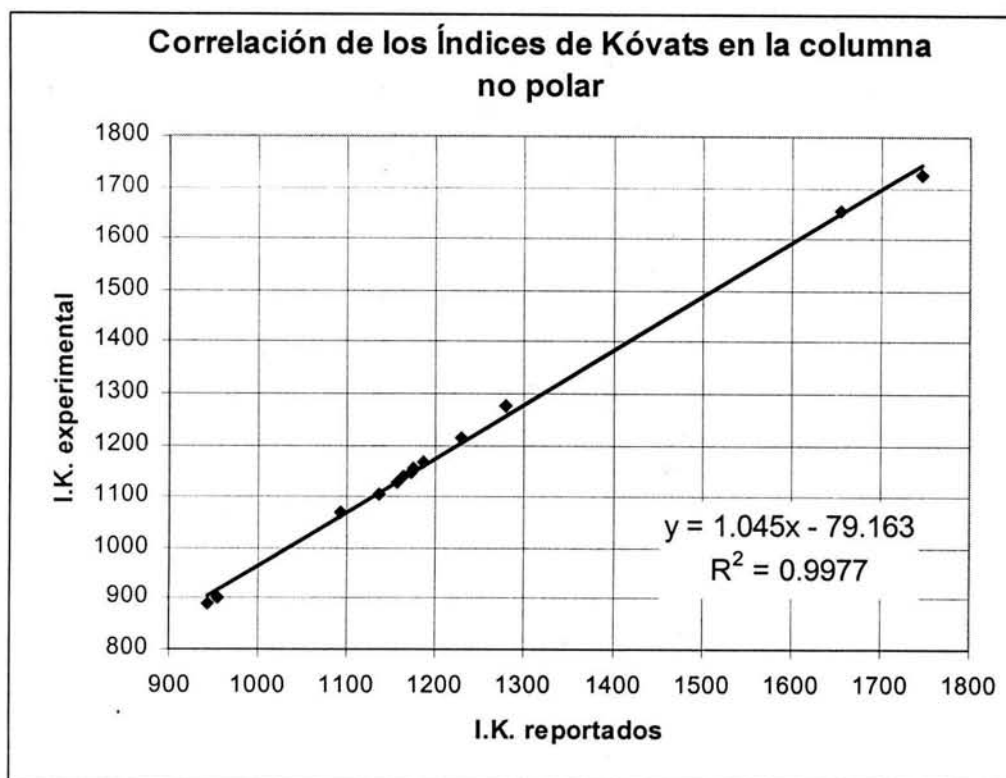


Gráfica 3. Correlación de los índices de Kóvats reportados vs experimentales de los terpenos, para una columna polar (Carbowax 20M).

*Columna no polar*

Compuesto	I. K. experimentales	I. K. reportado	Diferencia
$\alpha$ -pineno	888	942	-54
Canfeno	902	954	-52
Linalol	1068	1092	-24
Alcanfor	1104	1136	-32
Isoborneol	1128	1157	-29
Borneol	1139	1164	-25
Mentol	1149	1171	-22
4-terpineol	1155	1175	-20
$\alpha$ -terpineol	1166	1185	-19
Carvona	1214	1228	-14
Acetato de isobornilo	1277	1279	-2
Alcohol patchuli	1654	1655	-1
Farnesol	1724	1745	-21

Tabla 15. Índices de Kóvats de los terpenos para la columna no polar (SPB<sup>TM</sup>-1).



Gráfica 4. Correlación de los índices de Kóvats reportados vs experimentales de los terpenos, para una columna no polar (SPB<sup>TM</sup>-1).

Los índices de Kóvats que se obtuvieron experimentalmente para los estándares en la columna de trabajo (HP-5) fueron:

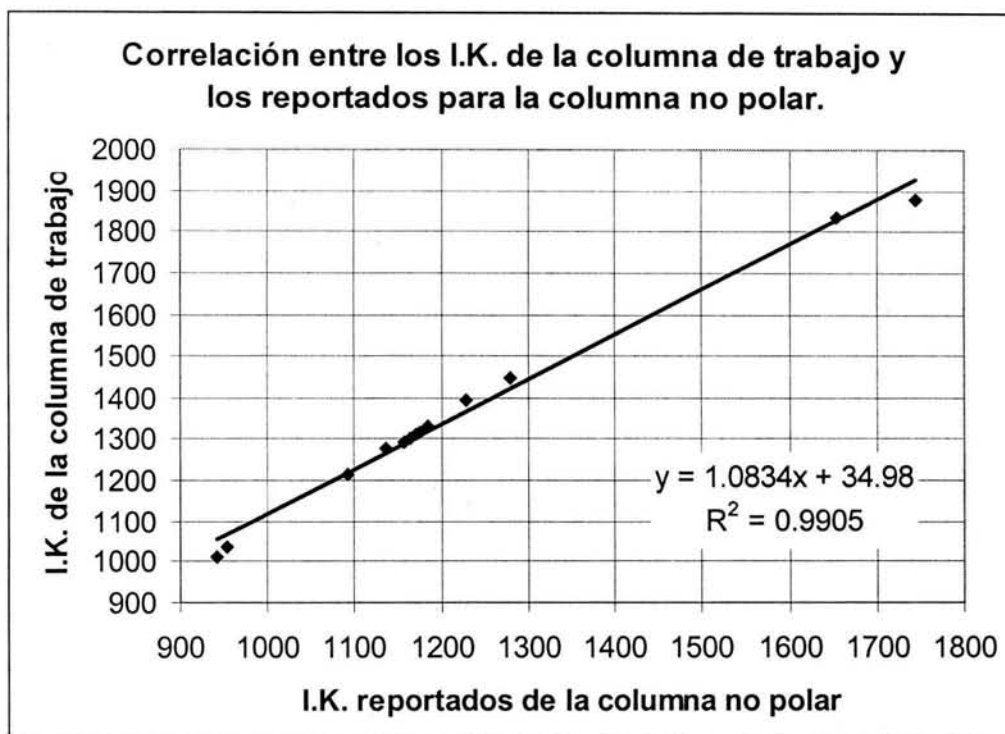
Compuesto	I. K. experimental trabajo	I. K. reportado no polar	I. K. reportado polar
$\alpha$ -pineno	1011	942	1036
Canfeno	1035	954	1083
Linalol	1217	1092	1506
Alcanfor	1280	1136	1518
Isoborneol	1294	1157	1660
Borneol	1304	1164	1698
Mentol	1312	1171	1612
4-terpineol	1317	1175	1628
$\alpha$ -terpineol	1333	1185	1731
Carvona	1396	1228	1715
Acetato de isobornilo	1446	1279	1584
Alcohol patchuli	1836	1655	No reportado
Farnesol	1881	1745	No reportado

Tabla 16. Índices de Kóvats de los terpenos para la columna de trabajo (HP-5).

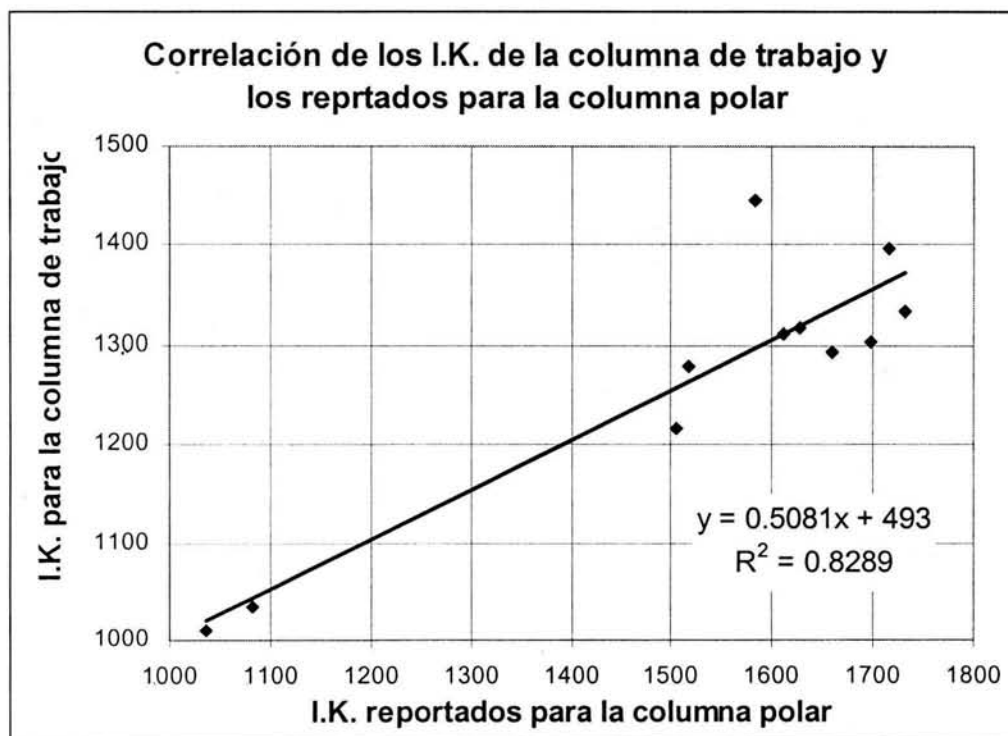
Para esta columna (HP-5) no se encontró ningún dato reportado, por lo que se buscó la mejor relación con los datos reportados para las otras dos columnas (no polar y polar). La relación de los datos experimentales de la columna de trabajo con los datos de la columna no polar presenta un  $R^2$  de 0.9905, es decir, un coeficiente de correlación lineal del 0.995, (ver grafica 5).

Sin embargo para la columna polar presentó un valor de  $R^2$  0.8289, menor con respecto a la columna no polar; el coeficiente de correlación fue del 0.91, lo que nos sugiere que existe una menor correlación entre estos datos, (ver gráfica 6).

Entonces, con la ecuación que se muestra en la gráfica 5 se podrá estimar el I.K. de cualquier terpeno en la columna no polar mediante la interpolación del I.K. obtenido en la columna de trabajo.



**Gráfica 5.** Correlación entre los índices de Kóvats la columna de trabajo vs reportados para una columna no polar.



Gráfica 6. Correlación entre los índices de Kovats la columna de trabajo vs reportados para una columna polar.

### Espectrometría de masas

Para complementar el análisis cualitativo de los compuestos terpénicos encontrados en las muestras, se utilizó la espectrometría de masas.

En este caso, los picos que se separaron por cromatografía de gases ingresaron al espectrómetro de masas, ahí se ionizaron los compuestos mediante impacto electrónico. Para cada compuesto se presenta un patrón de fragmentación muy reproducible; basándose en esto, se tomaron varios iones para dar un perfil característico para cada grupo de terpenos. Esta información se sintetiza en la tabla 17.



Compuesto	Ion molecular	Pico Base	Ion (- H <sub>2</sub> O)	Ion (- CH <sub>3</sub> )	Ion (- CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> )	Ion (- CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> )	Otros
Monoterpeno (C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> )	136	93 (91)	No hay fragmento	121	93	107	41, 43 y 55
Monoterpeno (C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O)	154	71 (69 ó 59)	136	121 + (- H <sub>2</sub> O)	93 + (- H <sub>2</sub> O)	107 + (- H <sub>2</sub> O)	41, 43 y 55
Sesquiterpeno (C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> )	204	161 (105 ó 119)	No hay fragmento	189	161	175	41, 43, 55 y iones de (C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> )
Sesquiterpeno (C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O)	222	69 (138)	204	189 + (- H <sub>2</sub> O)	161 + (- H <sub>2</sub> O)	Fragmento poco común	41, 43, 55 y iones de (C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O)

Tabla 17. Iones característicos para cada grupo de terpenos, esta en unidades masa/carga.

## Tratamientos de la muestra

### *Agave.*

Las técnicas que se utilizaron para la extracción de los compuestos terpénicos fueron:

- Extracción por arrastre de vapor
- Extracción con disolventes
- Micro-Extracción en Fase Sólida (MEFS)

### Extracción por arrastre de vapor.

Primero se realizó una extracción a presión atmosférica como se describe en el desarrollo experimental. También se realizaron pruebas a presión reducida pero los resultados fueron muy pobres: La concertación de los compuestos del aceite esencial fue muy baja para la cantidad extraída, ya que tampoco se logró separar las dos fases en el destilado y al olfato no se detectaba bien. Esta disolución no se inyectó directamente al cromatógrafo.

### Extracción con disolventes.

Se estudió la extracción de la muestra de agave con varios disolventes orgánicos. El primer experimento fue con el disolvente más utilizado para realizar extracciones de compuestos volátiles en material biológico, el diclorometano (Jella, *et al.*, 1998, Luque

de Castro *et al.*, 1999). Al inyectar directamente el extracto, se obtuvo un cromatograma donde los ácidos grasos y ésteres etílicos eran los compuestos mayoritarios y los compuestos terpénicos no se alcanzaron a detectar. La extracción directa con diclorometano no es recomendable (ver figura 10).

Después se realizó un experimento con metanol que es un disolvente más polar; se obtuvo una suspensión de color blanco de consistencia pastosa, que no se logró separar aún con una centrifugación. Con una mezcla diclorometano:metanol 1:1 los resultados fueron muy parecido a los obtenidos con el diclorometano. Con estos resultados podemos decir que una extracción simple no es suficientemente selectiva, ya que la concentración de los terpenos presentes en el agave (cabeza o piña) es muy baja, y no se logra eliminar la interferencia que proviene de los ácidos grasos y sus ésteres que son los compuestos mayoritarios.

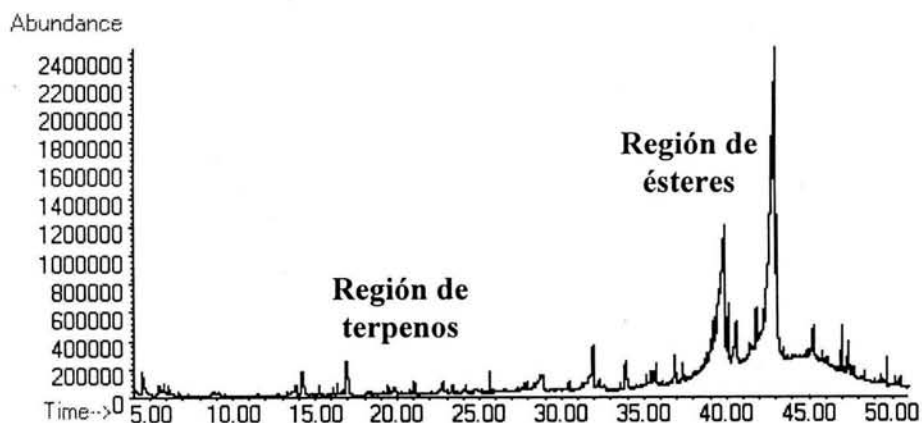


Figura 10. Cromatograma del extracto con diclorometano de una muestra de agave. Se distinguen en la figura los picos para los ácidos grasos y ésteres, sin embargo no se logran distinguir los picos de los terpenos.

### MEFS-HS.

La MEFS-HS se aplicó tanto directamente a la muestra de agave como al destilado por arrastre de vapor. Para la muestra de agave se obtuvo un buen resultado (figura 11), ya que se alcanzaron a detectar alrededor de 10 compuestos terpénicos.

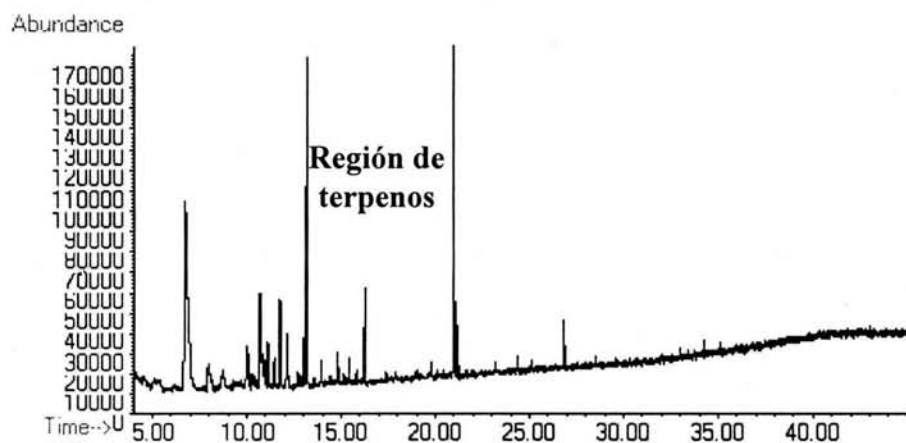


Figura 11. Cromatograma de la microextracción en fase sólida en headspace de una muestra de agave. Como se muestra en la figura se distinguen bien algunos picos de compuestos terpénicos.

Con la MEFS-HS de la muestra del extracto por arrastre de vapor, fueron mejores los resultados (figura 12), ya que se obtuvo un cromatograma “limpio” con una buena resolución, donde se alcanzaron a identificar hasta 15 compuestos terpénicos con una respuesta cromatográfica de hasta 3 veces mayor a la obtenida directamente de la muestra de agave.

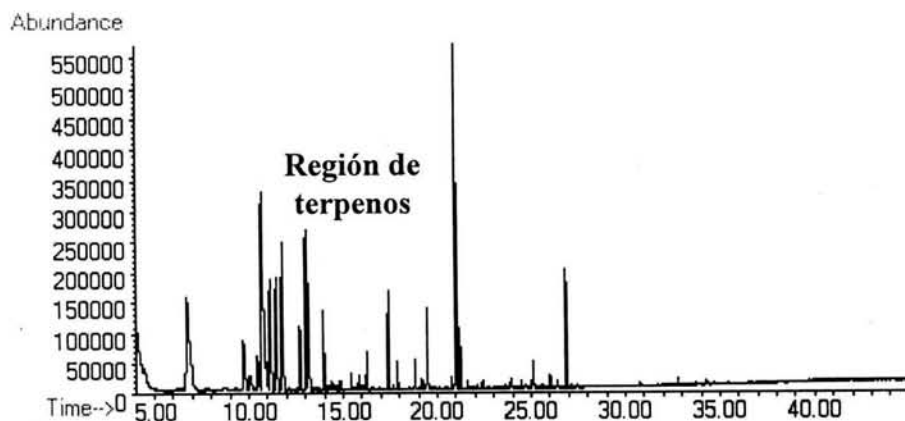


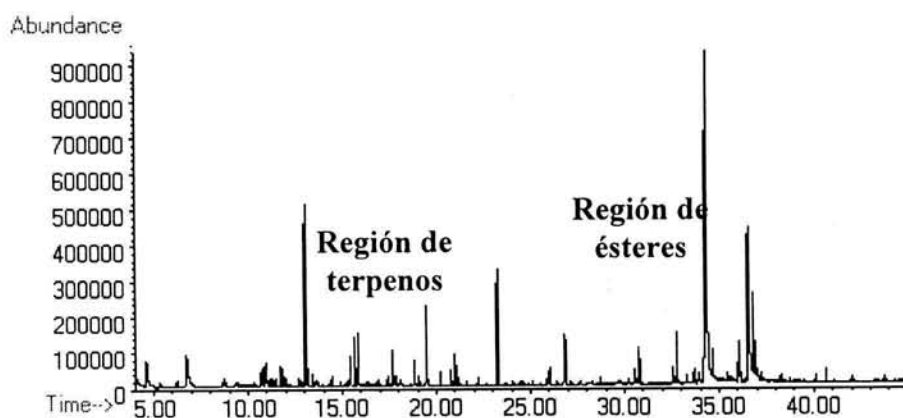
Figura 12. Cromatograma de la microextracción en fase sólida en headspace del destilado por arrastre de vapor de una muestra de agave. Se distinguen varios picos de compuestos terpénicos.

Extracto por arrastre de vapor – extracción líquido-líquido.

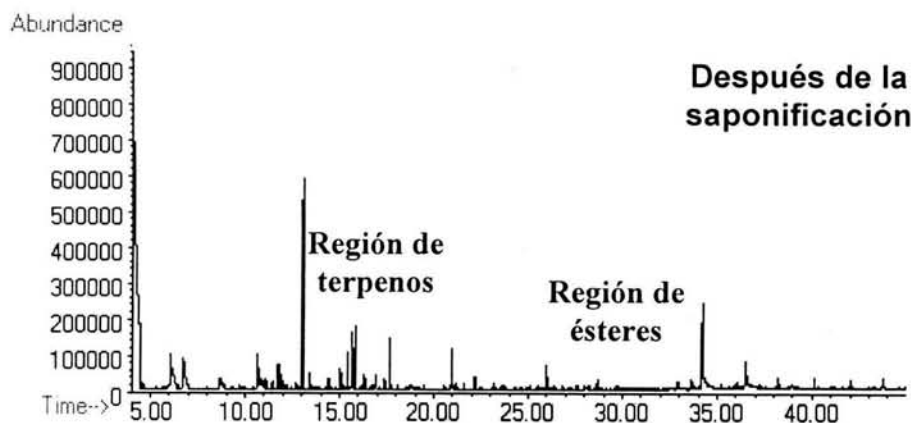
Con el destilado obtenido por arrastre de vapor se realizó una extracción líquido-líquido con diclorometano, para separar el aceite esencial de la fase acuosa. Los resultados fueron aceptables ya que se detectaron los compuestos terpénicos; sin embargo, los ésteres de los ácidos grasos siguieron siendo los compuestos que se encontraban en mayor proporción (figura 13).

Se realizó una MEFS-HS de la fase acuosa del destilado después de la extracción con disolvente para verificar si se había realizado una buena extracción líquido – líquido y el resultado fue favorable, ya que se obtuvo un cromatograma prácticamente limpio de compuestos terpénicos. Para eliminar el problema de los ésteres de los ácidos grasos se realizó una saponificación y después una extracción; la fase orgánica se inyectó al cromatógrafo (figura 14).

Se obtuvo una disminución de los picos de los ésteres, sin perder la buena respuesta de los terpenos, el inconveniente de esta metodología es la mayor manipulación, y el cuidado que se debe tener con los viales durante el análisis, ya que podría haber pérdidas de los compuestos volátiles.



**Figura 13.** Cromatograma de la extracción con diclorometano del destilado por arrastre de vapor de una muestra de agave.



**Figura 14.** Cromatograma después de la saponificación del extracto con diclorometano del destilado por arrastre de vapor de una muestra de agave.

Con todos estos experimentos se pudo realizar una evaluación para determinar cual podría ser una buena técnica de extracción de los terpenos en el agave. Los resultados de las técnicas de extracción se muestran en la tabla 18:

Técnica(s)	Observaciones	Comentarios	Calif.*
Extracción por arrastre de vapor	Se obtuvo una disolución que presentaba el olor característico a agave.	Es poco adecuado realizar la inyección directa en CG. Los terpenos están muy diluidos.	✗
Extracción Líquido-líquido	Se obtuvo un aceite de color amarillo.	Los compuestos mayoritarios son ácidos grasos y ésteres.	✓
MEFS-HS	Se obtiene una buena respuesta para los compuestos terpénicos.	Es una prueba rápida que puede utilizarse directamente en el agave.	✓✓
EAV-MEFS-HS	Se obtiene una mayor respuesta para los compuestos terpénicos que la MEFS - HS.	Es una buena técnica para caracterizar a los terpenos.	✓✓✓
EAV-ELL	Los compuestos mayoritarios son los ésteres.	Se requiere manipular mucho la muestra.	✓
EAV-ELL + saponificación	Se obtiene mejores resultados que EAV-ELL, ya que se disminuyen los picos de los ésteres.	Se requiere manipular mucho mas la muestra.	✓✓

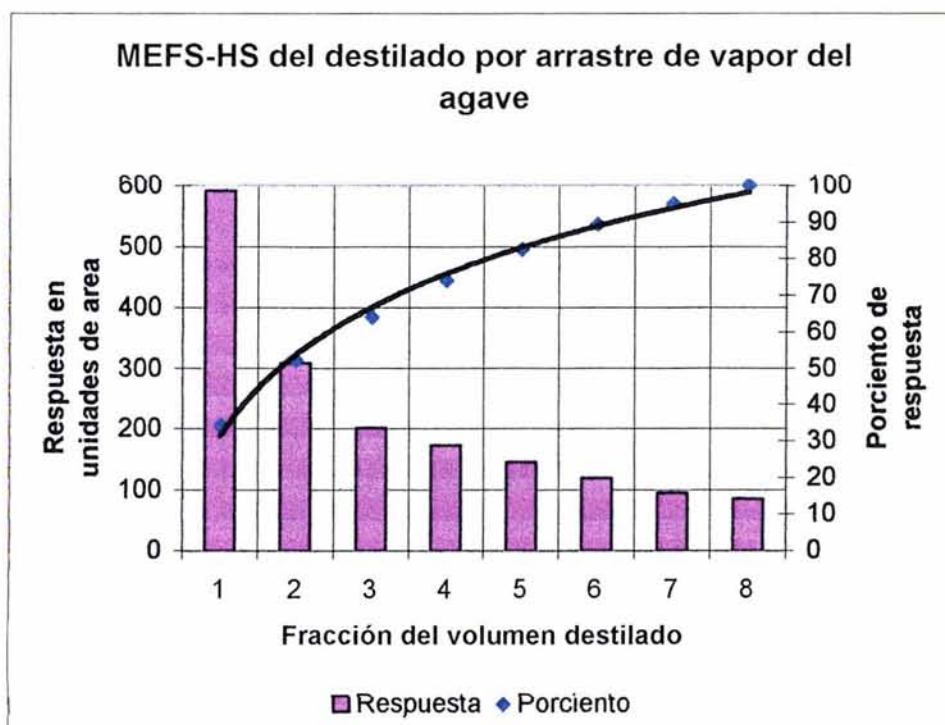
**Tabla 18.** Resultados de las diferentes técnicas de extracción que se utilizaron para el tratamiento de la muestra de agave. \* Las calificaciones son desde no se pueden analizar = ✗ y hasta es una muy buena técnica = ✓✓✓.

Analizando estos resultados podemos concluir que la combinación de las técnicas de extracción por arrastre de vapor y la MEFS-HS para la determinación de los compuestos terpénicos presentes en el agave es la más prometedora.

### Optimización del método de extracción

En la extracción por arrastre de vapor no se separó el aceite esencial de la fase acuosa, por lo que se tuvo que definir el volumen total de la destilación que nos diera el mejor compromiso entre la cantidad de aceite esencial extraído y la dilución en la fase acuosa.

Para esto se realizó un seguimiento de la destilación. Se graficó la respuesta de los volátiles totales en unidades de área en función de la fracción de volumen extraído. El resultado obtenido fue una curva decreciente en donde aproximadamente a partir de la fracción 6 el incremento de la cantidad extraída no es muy significativa (gráfica 7).

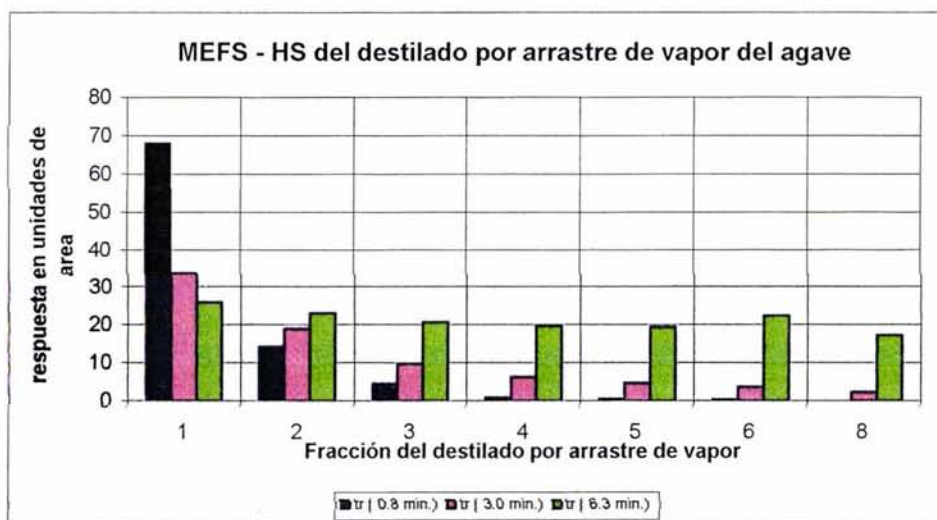


**Gráfica 7.** Curva de destilación de los compuestos volátiles presentes en cada fracción de 50 mL, durante la destilación por arrastre de vapor de una muestra de agave.

Con este resultado se puede definir que con 300 mL del destilado (90% de la respuesta) es suficiente para obtener la mayor cantidad de terpenos en el menor volumen de agua y que por lo tanto se obtendrá una concentración adecuada para realizar la microextracción en fase sólida.



Para ver mas claro el aspecto cualitativo de esta destilación, se graficó para tres compuestos seleccionados (con tiempos de retención de 0.8 y 3.0 min = terpenos y 6.3 min = éster) la respuesta obtenida en cada fracción de la destilación. Como se puede observar en la gráfica 8, los compuestos con mayor presión de vapor se extraen en mayor proporción en los primeros 50 mL, es decir, si solo se hubiera tomado los primeros 50 mililitros del destilado (en donde se tiene la mayor concentración de terpenos), el perfil de terpenos no hubiera sido el mas exacto.



**Gráfica 8.** Perfil de los compuestos volátiles presentes en cada fracción de 50 mL, durante la destilación por arrastre de vapor de una muestra de agave. Las condiciones cromatográficas fueron distintas, por lo que solo se tomaron los tiempos como referencia.

#### Definición del tipo de recubrimiento de la fibra para la microextracción en fase sólida

Observar los resultados en la tabla 19. Aquí se muestran las respuestas relativas para cada uno de los estándares en las diferentes fases. Todos los compuestos están normalizados al  $\alpha$ -terpineol en la fase no polar (PDMS). Se probaron 5 tipos de recubrimientos, siendo la fase de PDMS/DVB la que mejor respuesta tuvo para los terpenos, estos resultados coinciden con los obtenidos por Millar y Stuart (1999).



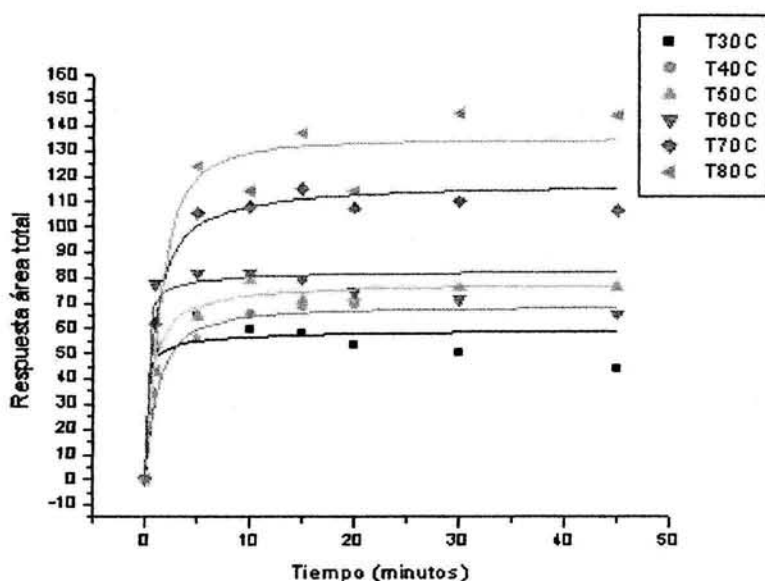
Terpenos	PA	PDMS	PDMS/DVB	CAR/PDMS	CW/DVB
$\alpha$ -pineno	n.d.*	0.46	2.33	1.66	1.36
Canfeno	n.d.	0.33	1.86	0.80	0.76
Linalol	n.d.	n.d.	0.23	0.10	0.13
Alcanfor	n.d.	n.d.	0.08	0.03	0.03
Isoborneol	n.d.	n.d.	0.02	n.d.	n.d.
Borneol	n.d.	n.d.	0.07	n.d.	n.d.
Mentol	n.d.	n.d.	0.01	n.d.	n.d.
4-terpineol	n.d.	n.d.	0.07	n.d.	n.d.
$\alpha$ -terpineol	0.13	<b>1.00</b>	1.13	1.00	0.87
Carvona	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Acetato de isobornilo	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Eugenol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Metil-eugenol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Alcohol patchuli	n.d.	n.d.	0.08	0.13	0.13
Farnesol	n.d.	n.d.	0.53	0.15	0.15

Tabla 19. Determinación de la respuesta de las diferentes fases de la MEFS a los estándares de terpenos. Normalizados al pico mas grande,  $\alpha$ -terpineol de la fase no polar (PDMS). \*n.d.: no se detectó.

#### Determinación de la temperatura y del tiempo de equilibrio (líquido - vapor)

Para éste experimento se utilizó el destilado por arrastre de vapor del agave. Se realizó la gráfica de la respuesta como área total de los volátiles de la MEFS-HS contra el tiempo de equilibrio a diferentes temperaturas.

Como se puede observar en la gráfica 9, a una temperatura de 80°C se tiene una mayor respuesta, pero la presión de vapor del agua afecta la reproducibilidad de los resultados; sin embargo, entre 70 y 60°C se tiene una buena respuesta y los resultados son más reproducibles; por lo tanto la temperatura de trabajo que se estableció como óptima fue de 65°C. Y el tiempo necesario para que se establezca el equilibrio es de alrededor de 20 minutos en el baño María. Para el mosto y mosto muerto se utilizó la misma metodología (debido a que son muestras en fase acuosa); sólo se determinó la temperatura y el tiempo de equilibrio de fases para cada caso.



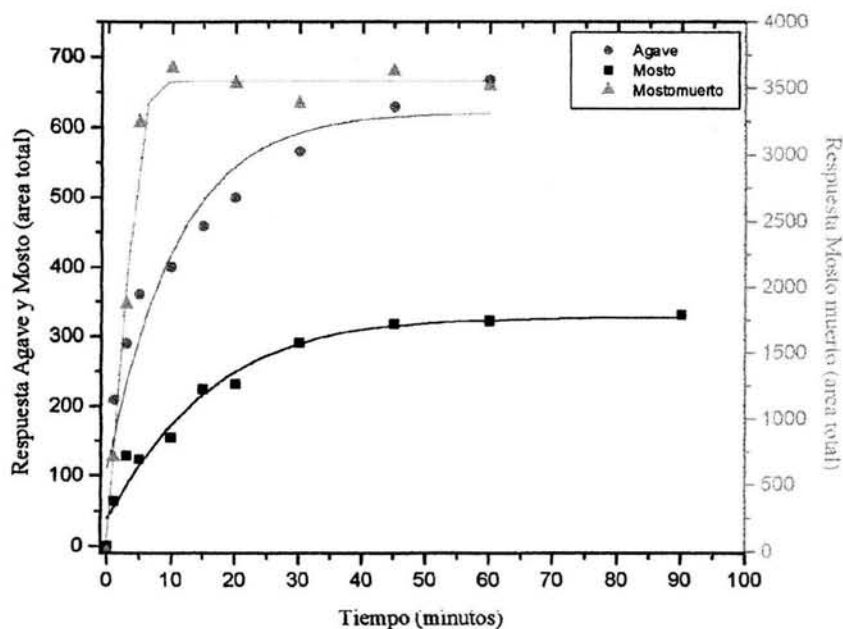
Gráfica 9. Equilibrios (líquido - vapor) del destilado por arrastre de vapor del *Agave tequilana* a diferentes temperaturas.

#### Tiempo de la MEFS-HS

Una vez determinado la temperatura de equilibrio de las fases ( $65^{\circ}\text{C}$ ) y el tiempo de equilibrio (20 minutos) antes de la microextracción, el siguiente paso fue determinar el tiempo óptimo de la microextracción en fase sólida. Para esto se tomaron tiempos desde 1 hasta 60 minutos. Se graficó la respuesta total de los compuestos volátiles del agave, mosto y mosto muerto en función del tiempo, ver la gráfica 10. Se puede observar que a partir de 30 minutos de la microextracción la curva de ajuste se vuelve asintótica, por lo que con 30 minutos de microextracción se garantiza una extracción muy próxima al valor límite.

#### Tiempo de desorción térmica

Se determinó el tiempo necesario para la desorción térmica de los analitos de la fibra en el inyector del cromatógrafo. Los resultados mostraron que con un minuto, la desorción es completa. Por conveniencia en la operación del sistema de inyección (válvula en modo splitless) se utilizaron 2 minutos para la desorción térmica.



Gráfica 10. Curvas de equilibrio de extracción con la MEFS-HS utilizando la fibra de PDMS/DVB.

El resultado de la optimización del método de extracción del agave lo podemos observar en el cromatograma que se presenta en la figura 15. En la figura 16 se puede observar un acercamiento de la zona que corresponde a los monoterpenos y en la figura 17 de la zona que corresponde a los sesquiterpenos.

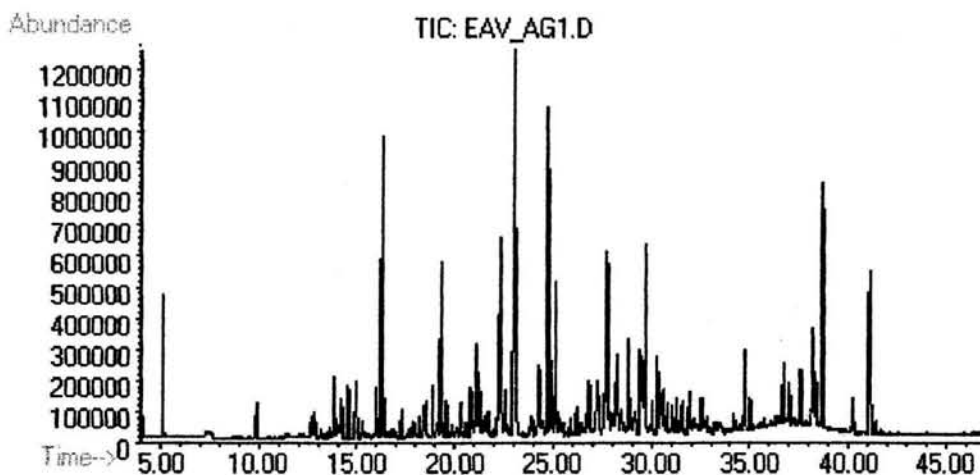


Figura 15. Cromatograma de la EAV y MEFS-HS de una muestra de agave fresco.

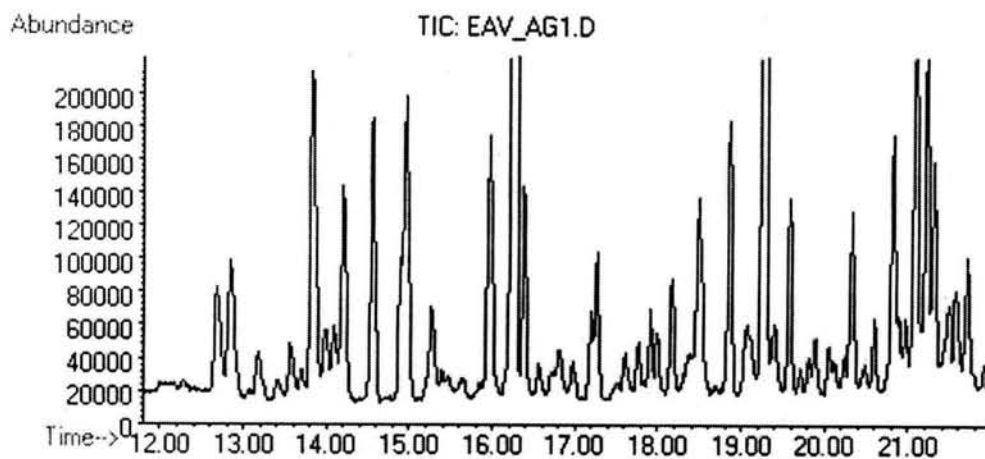


Figura 16. Cromatograma 15, con acercamiento de la zona de monoterpenos.

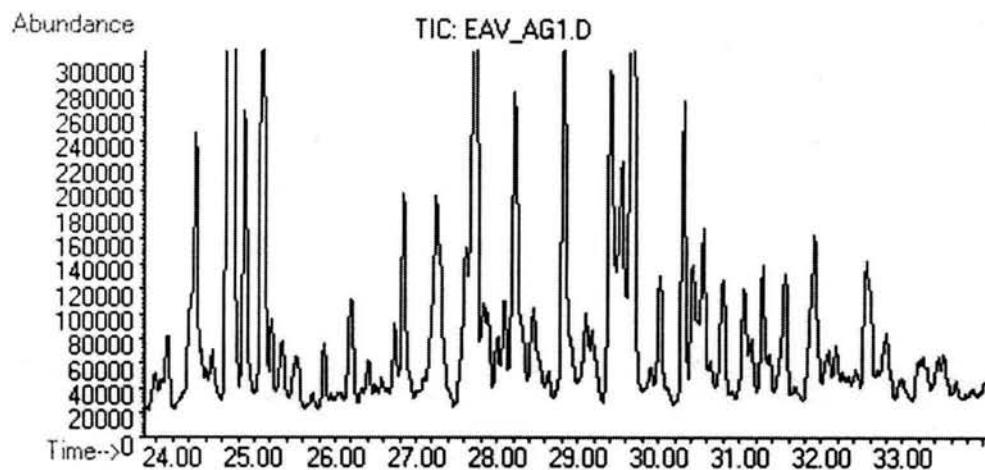


Figura 17. Cromatograma 15 con acercamiento de la zona de sesquiterpenos.

Como se puede observar, en las dos zonas que corresponden a los terpenos se presentan una gran cantidad de otros compuestos volátiles como aldehídos, cetonas, alcoholes, ésteres, etc., que también se encuentran presentes en el agave.

### ***Mosto y Mosto muerto***

Las condiciones de tratamiento de las muestras fueron prácticamente las mismas que las utilizadas en la muestra de agave. Sólo se determinaron los tiempos de la microextracción para cada uno ellos. Estos resultados se pueden observar en la gráfica 10.

El cromatograma que se obtuvo para el mosto se presenta en la figura 18. En este caso se observa que los picos de los terpenos son mas pequeños con respecto a los del agave.

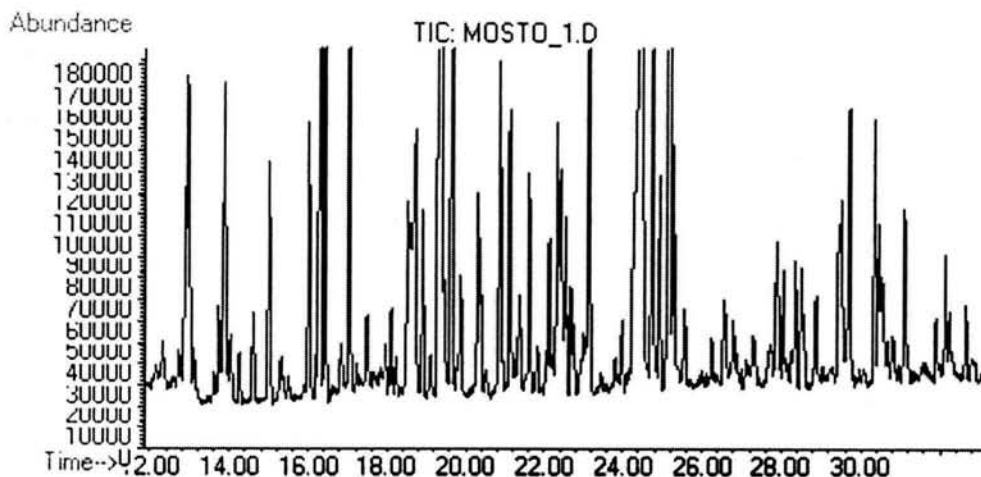


Figura 18. Cromatograma de la MEFS-HS del mosto, con acercamiento de la zona de terpenos.

En la figura 19 se muestra el cromatograma del mosto muerto.

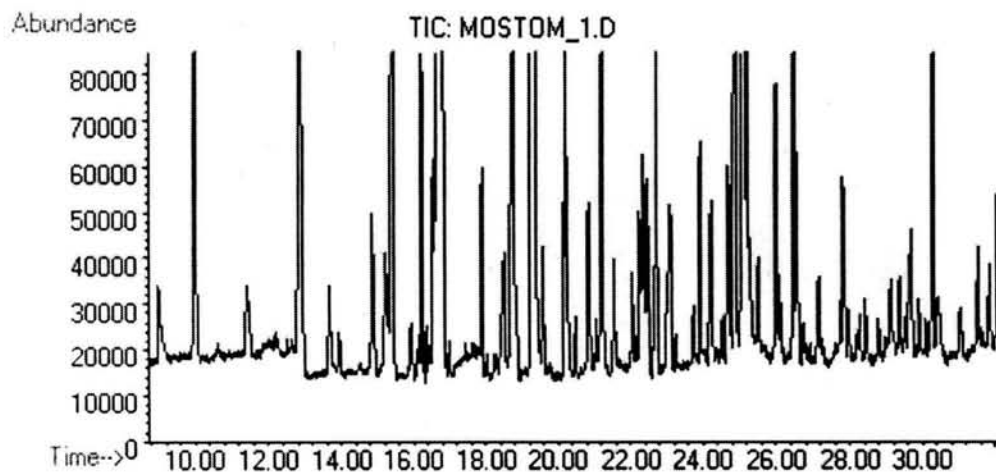


Figura 19. Cromatograma de la MEFS-HS del mosto muerto, con acercamiento de la zona de terpenos.

En el mosto muerto, además de la disminución de los picos de los terpenos, también se tiene una menor cantidad de estos, por lo que podemos decir, que durante el proceso de

elaboración del tequila los terpenos presentes en el agave se van perdiendo. Esto se puede deber al proceso de fermentación, donde se genera una gran cantidad de CO<sub>2</sub> el cual al momento de desprenderse del mosto puede arrastrar los compuestos volátiles, tales como los terpenos.

### *Ordinario y tequila*

Para el ordinario primero se utilizó la técnica de MEFS-HS y el resultado obtenido se muestra en la figura 20, en donde podemos observar que esta técnica no es la más adecuada, ya que no se alcanzan a detectar los picos que corresponden a terpenos.

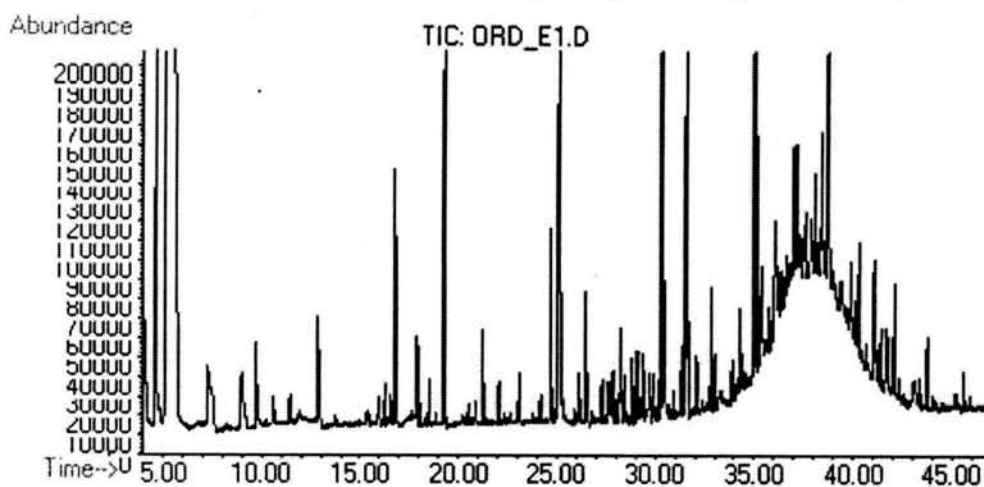


Figura 20. Cromatograma de la MEFS-HS del ordinario.

En vista de este resultado poco favorable, se optó por realizar la inmersión de la fibra en el ordinario, obteniéndose el cromatograma de la figura 21. Podemos observar el incremento de los picos que corresponden a los ésteres de los ácidos grasos pero no de los terpenos, por lo que se decidió cambiar completamente de metodología. Aunque en la literatura sólo se han reportado trabajos con tequila, y no con ordinario (Scott *et al.*, 1996) la similitud entre los dos productos es mayor que las diferencias. La principal es que el tequila ha pasado por dos destilaciones (la concentración de etanol es mas alta) y el ordinario solo por una, por lo que se puede asumir el aplicar la misma metodología.

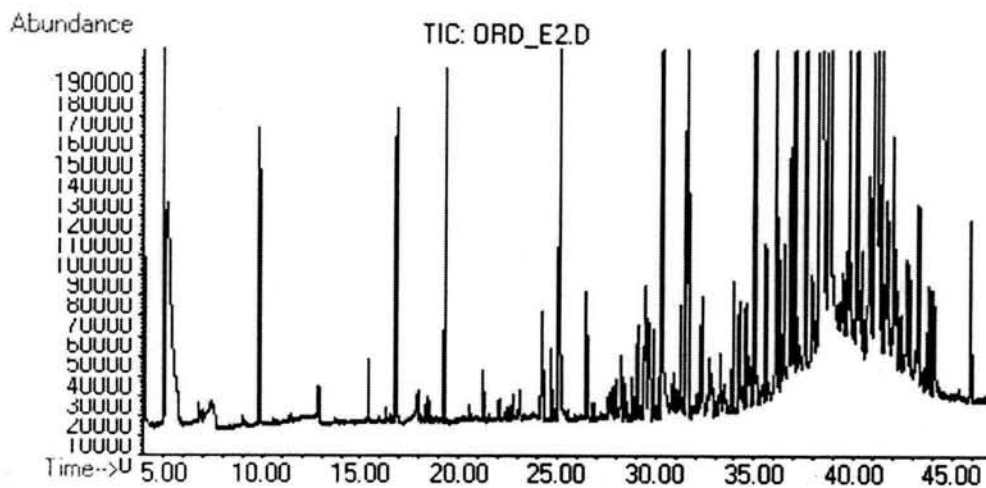


Figura 21. Cromatograma de la MEFS-ID del ordinario.

Se decidió realizar la extracción líquido – líquido del ordinario con diclorometano (ver figura 22). El cromatograma obtenido fue muy diferente del que se obtuvo por MEFS, aquí se pueden distinguir una gran cantidad de compuestos volátiles, que no se habían detectado. En la literatura se ha reportado que la presencia del etanol impide la adsorción de varios compuestos sobre la fibra (Mestres *et al.*, 1998; Hill y Smith 2000), con esta información se pudo concluir, que el etanol impidió la adsorción de los compuestos volátiles sobre la fibra de la MEFS.

Con la extracción líquido - líquido se pudo detectar algunos terpenos. En la literatura mencionan que los terpenos presentes en el tequila se encuentran por lo general en cantidades traza y son muy pocos (Scott *et al.*, 1996), por lo que en el ordinario era de esperarse que se encontraran pocos terpenos y en muy baja proporción en comparación con los demás compuestos volátiles.



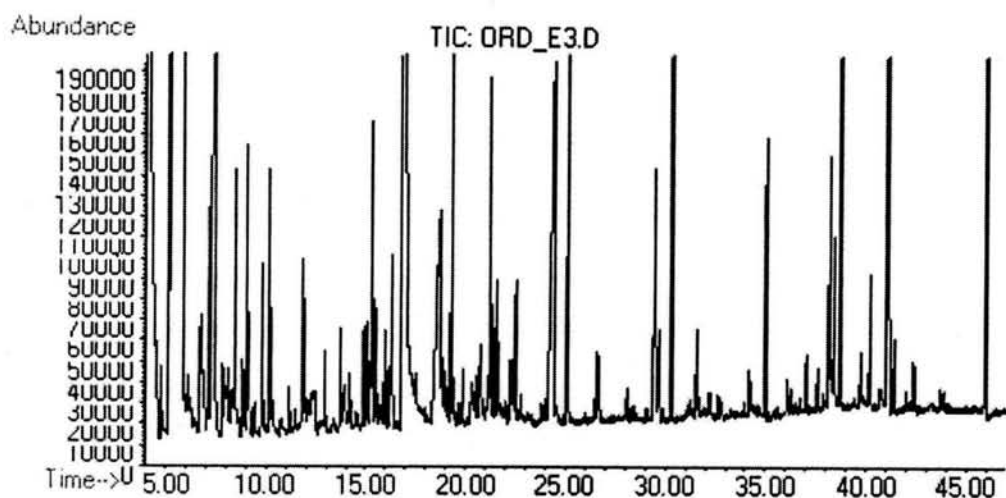


Figura 22. Cromatograma de la ELL del ordinario con diclorometano.

Para el tequila se procedió de la misma manera. En la figura 23 se muestra la MEFS-HS, en la figura 24 la MEFS-ID y en la figura 25 la ELL con diclorometano.

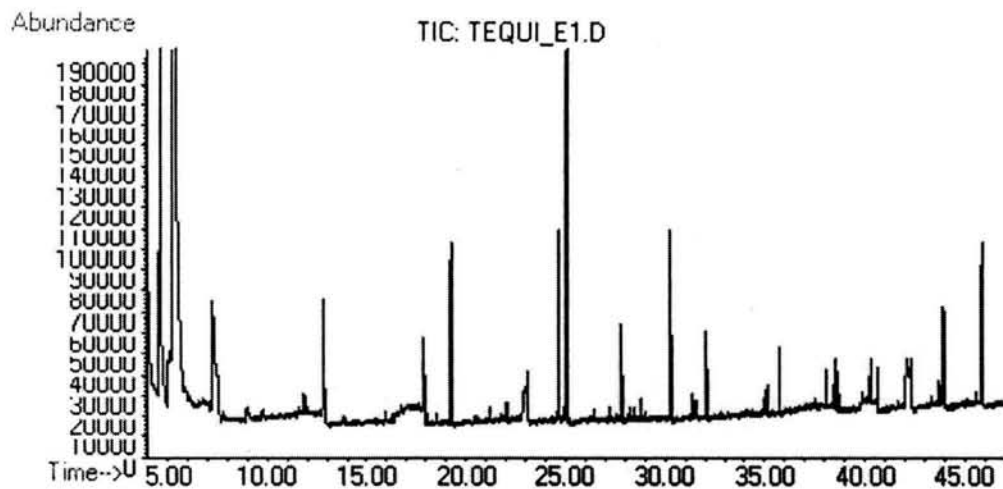


Figura 23. Cromatograma de la MEFS-HS del tequila.

En la figura 23, se ve una serie de picos que corresponden principalmente a los ésteres de los ácidos grasos de cadena corta. Aquí se puede observar que se obtiene una menor cantidad de picos en comparación al ordinario. Esto puede reforzar la idea de que el etanol satura la fibra y no deja que otros compuestos volátiles se puedan adsorber en ella.

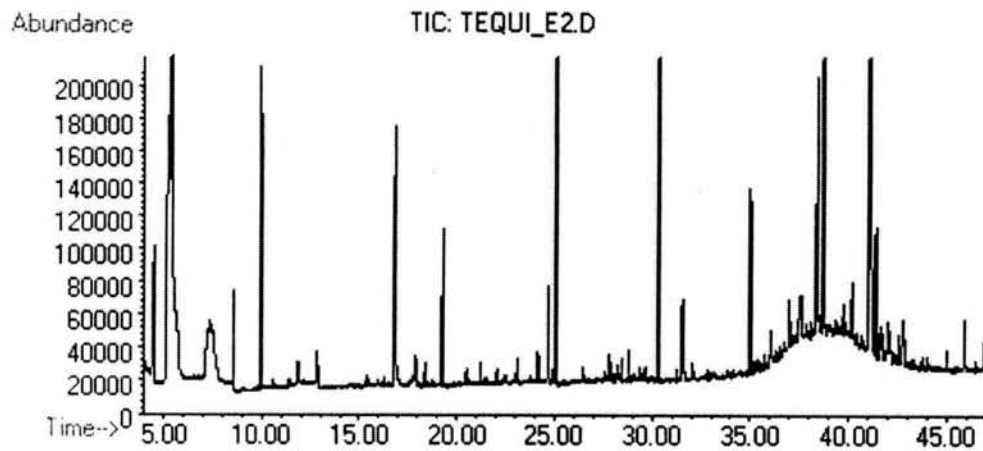


Figura 24. Cromatograma de la MEFS-ID del tequila.

En el caso de la MEFS-ID (figura 24) los resultados con respecto a los terpenos son muy parecidos a los obtenidos con el ordinario.

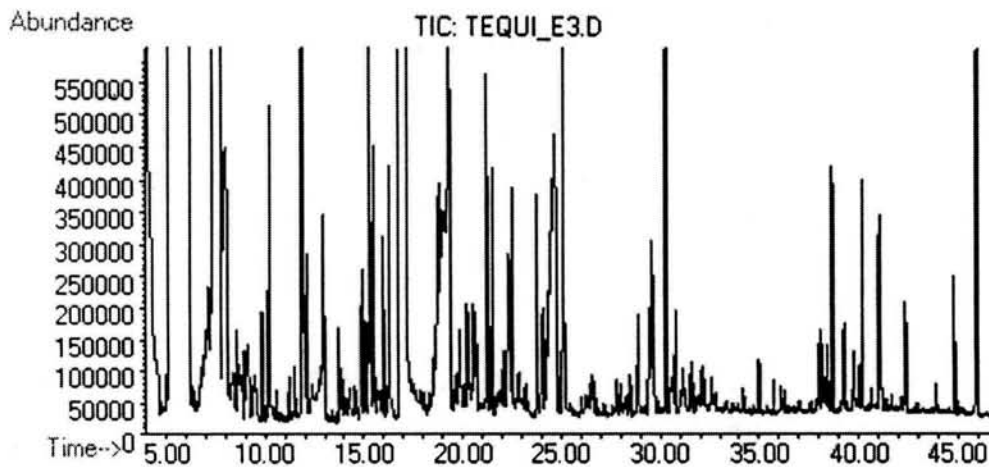


Figura 25. Cromatograma de la ELL del tequila con diclorometano.

En la figura 25 se muestra que con la ELL del tequila se obtienen buenos resultados en comparación de la MEFS, y además se alcanzan a detectar los terpenos.

### **Análisis cualitativo**

Es muy importante identificar la mayor cantidad de terpenos posibles en el *Agave tequilana* Weber variedad azul, debido a que esta planta es de uso exclusivo para la elaboración del tequila, y su sabor se debe a los compuestos presentes desde su materia prima y los generados durante su procesamiento. Siendo este el punto principal del desarrollo del tratamiento de la muestra, lo que se busca es definir el universo de terpenos presentes desde el agave para poder dar un seguimiento a lo largo del proceso de elaboración del tequila.

En la tabla 20 se enlistan los terpenos identificados en el agave, sus tiempos de retención, el tiempo de retención del estándar (si es el caso), los índices de Kóvats en la columna de trabajo o experimental, los índices de Kóvats interpolados que se obtuvieron de la correlación lineal de la columna no polar, y los índices de Kóvats mas cercanos reportados; que en conjunto con los resultados obtenidos de los espectros de masas nos permiten proponer una identidad en los casos en que no se cuenta con el estándar de referencia.

En la gráfica 11 se presenta el perfil de los terpenos identificados en el agave. En ella se muestra el promedio de todos los lotes con su respectiva desviación estándar. El total de terpenos encontrados en el *Agave tequilana* Weber variedad azul es de 28, de los cuales 13 corresponden a monoterpenos, 7 son hidrocarburos y 6 son compuestos oxigenados; y por parte de los sesquiterpenos, 12 son hidrocarburos y 3 son compuestos oxigenados.

Nombre	Tr (exp.)	Tr (estándar)	I.K. Experimental	I.K.* Interpolado	I.K. <sup>+</sup> Reportado
3-careno	12.85	n.a.	1087	970	1013
$\alpha$ -terpineno	13.58	13.512	1115	996	1016
<i>p</i> -cimeno	13.84	13.775	1125	1005	1020
Limoneno	13.99	13.914	1131	1011	1030
<i>cis</i> -ocimeno	14.21	n.a.	1139	1019	1025
<i>trans</i> -ocimeno	14.56	n.a.	1153	1031	1038
$\gamma$ -terpineno	14.96	15.020	1168	1045	1057
Linalol	16.28	16.231	1219	1093	1092
4-terpineol	18.87	18.843	1318	1185	1175
$\alpha$ -terpineol	19.28	19.251	1334	1200	1185
<i>t,p</i> -ment-2-en-7-ol	19.83	n.a.	1355	1219	n.r.
Nerol	20.34	20.262	1375	1238	1218
Geraniol	21.09	21.019	1404	1265	1243
Cubebeno	24.71	n.a.	1543	1394	1381
Copaeno	24.88	n.a.	1550	1401	1398
Sativeno	25.35	n.a.	1568	1417	1421
$\alpha$ -muroleno	26.42	n.a.	1609	1456	1500
$\alpha$ -farneseno	26.85	n.a.	1625	1471	n.r.
Ledeno	27.26	n.a.	1641	1486	n.r.
$\gamma$ -muroleno	27.62	n.a.	1655	1499	n.r.
Cadina-4,9-dieno	28.23	n.a.	1678	1520	1518
Sesquiterpeno (P.M. 204)	28.83	n.a.	1701	1542	n.r.
Sesquiterpeno (P.M. 204)	29.11	n.a.	1712	1552	n.r.
Sesquiterpeno (P.M. 222)	29.69	n.a.	1734	1572	n.r.
Humulano-1,6-dien-3-ol	31.07	n.a.	1787	1622	n.r.
Sesquiterpeno (P.M. 204)	31.56	n.a.	1807	1640	n.r.
$\tau$ -muroleno	31.93	n.a.	1820	1652	n.r.
Alcohol patchuli	32.57	n.a.	1845	1676	n.r.

**Tabla 20.** Terpenos identificados en el *Agave tequilana* Weber variedad azul. El I.K. experimental es de la columna de trabajo.

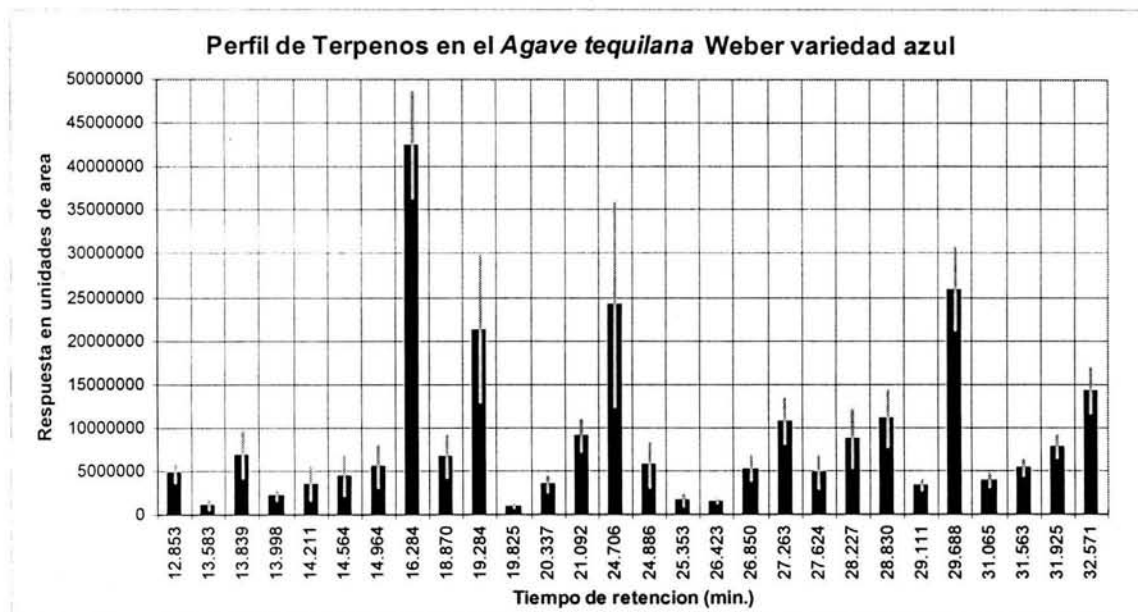
\* Datos obtenidos en interpolación de la gráfica 5, (columna no polar).

<sup>+</sup> Datos reportados de tablas (columna no polar) mas cercanos a datos obtenidos de la interpolación.

Tr. El tiempo de retención está minutos.

n.a. no se analizaron.

n.r. no se ha reportado.



Gráfica 11. Perfil de terpenos de las cuatro muestras de *Agave tequilana* Weber variedad azul.

Como se observa en la gráfica 11, el linalol es el compuesto que se presenta con mayor abundancia (con un tiempo de retención de 16.28 min), le sigue el  $\alpha$ -terpineol (19.28 min), el cubebeno (24.71 min) y un sesquiterpeno oxigenado (29.69 min). Este último generó una duda, ya que el estándar de nerolidol con que se contaba en el laboratorio da un tiempo de retención diferente del que se detectó en la muestra, pero a partir del espectro de masas se concluye que podría tratarse de un isómero del nerolidol.

Con relación a los resultados obtenidos al analizar el mosto y el mosto muerto (tabla 21), se muestran los promedios de los tiempos de retención junto con el del agave. Aquí se ve claramente que el perfil de terpenos va cambiando conforme transcurre el proceso de elaboración del tequila. El número de terpenos totales identificados va disminuyendo. Un punto muy importante del que hay que hacer mención es que a partir del mosto se detecta un nuevo sesquiterpeno oxigenado el farnesol, el cual no se observó en el agave.

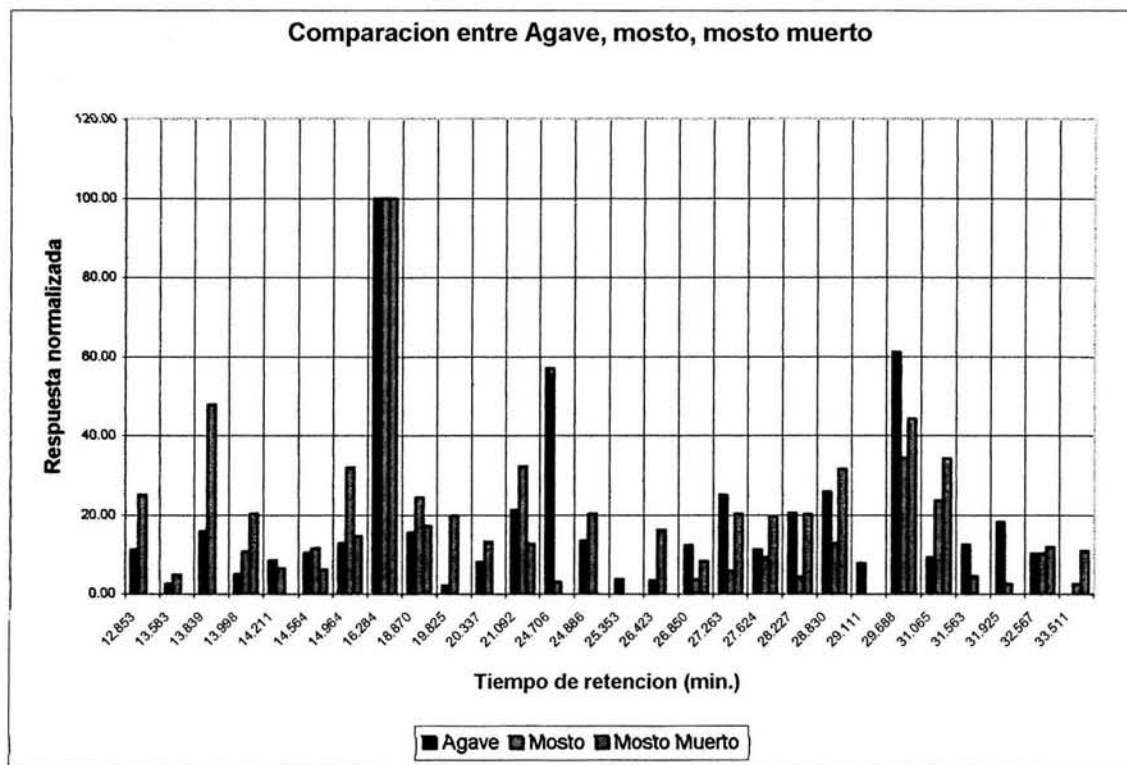
Entonces para el agave se identificaron un total de 28 terpenos, para el caso del mosto este se redujo a 27 y para el mosto muerto a 18. Esto ya se había visto desde los análisis preliminares.

Nombre	Tr (agave.)	Tr (mosto)	Tr (mosto muerto)
3-careno	12.85	12.85	n.d.
$\alpha$ -terpineno	13.58	13.57	n.d.
<i>p</i> -cimeno	13.84	13.84	n.d.
Limoneno	13.99	13.99	13.97
<i>cis</i> -ocimeno	14.21	14.22	n.d.
<i>trans</i> -ocimeno	14.56	14.57	14.55
$\gamma$ -terpineno	14.96	14.97	14.96
Linalol	16.28	16.26	16.24
4-terpineol	18.87	18.88	18.86
$\alpha$ -terpineol	19.28	19.28	19.28
<i>t,p</i> -ment-2-en-7-ol	19.83	19.84	n.d.
Nerol	20.34	20.34	n.d.
Geraniol	21.09	21.09	21.08
Cubebeno	24.71	24.79	n.d.
Copaeno	24.89	24.89	n.d.
Sativeno	25.35	n.d.	n.d.
$\alpha$ -muroleno	26.42	26.52	26.49
$\alpha$ -farneseno	26.85	26.86	26.85
Ledeno	27.26	27.26	27.25
$\gamma$ -muroleno	27.62	27.71	27.63
Cadina-4,9-dieno	28.21	28.24	28.22
Sesquiterpeno (P.M. 204)	28.83	28.84	28.82
Sesquiterpeno (P.M. 204)	29.11	n.d.	n.d.
Nerolidol	29.69	29.68	29.66
Humulano-1,6-dien-3-ol	31.07	31.07	31.05
Sesquiterpeno (P.M. 204)	31.56	31.57	n.d.
$\tau$ -muroleno	31.93	31.95	31.92
Alcohol patchuli	32.57	32.63	32.59
Farnesol	n.d.	33.51	33.51

**Tabla 21.** Terpenos identificados en el *Agave tequilana* Weber variedad azul, mosto y mosto muerto.

Tr. El tiempo de retención esta en minutos. n.d : no se detecto

En la gráfica 12 se muestra la comparación de los promedios de las respuestas normalizadas al linalol de los terpenos identificados en el agave, mosto y mosto muerto.



Gráfica 12. Comparación de los perfiles normalizados al linalol, de los terpenos en el *Agave tequilana* Weber variedad azul, en el mosto y en el mosto muerto.

Para los dos últimos puntos del proceso: ordinario y tequila, sólo se realizó la comparación entre ellos, debido a que se trataba de los destilados y se utilizó la misma técnica de extracción; pero diferente de la técnica que se utilizó para el agave, mosto y mosto muerto.

En estos casos se pudieron identificar un total de 8 terpenos. Para el  $\alpha$ -terpineol no hubo resolución con respecto al éster etílico del ácido octanoico, esto se debió a que los dos coeluyeron. También esto ocurrió para el mosto y mosto muerto (por este motivo no se muestran en la gráfica 12).

En el proceso de destilación y como consecuencia del calor suministrado al sistema, se generaron dos nuevos terpenos que son los óxidos de linalol I y II. (tabla 22).



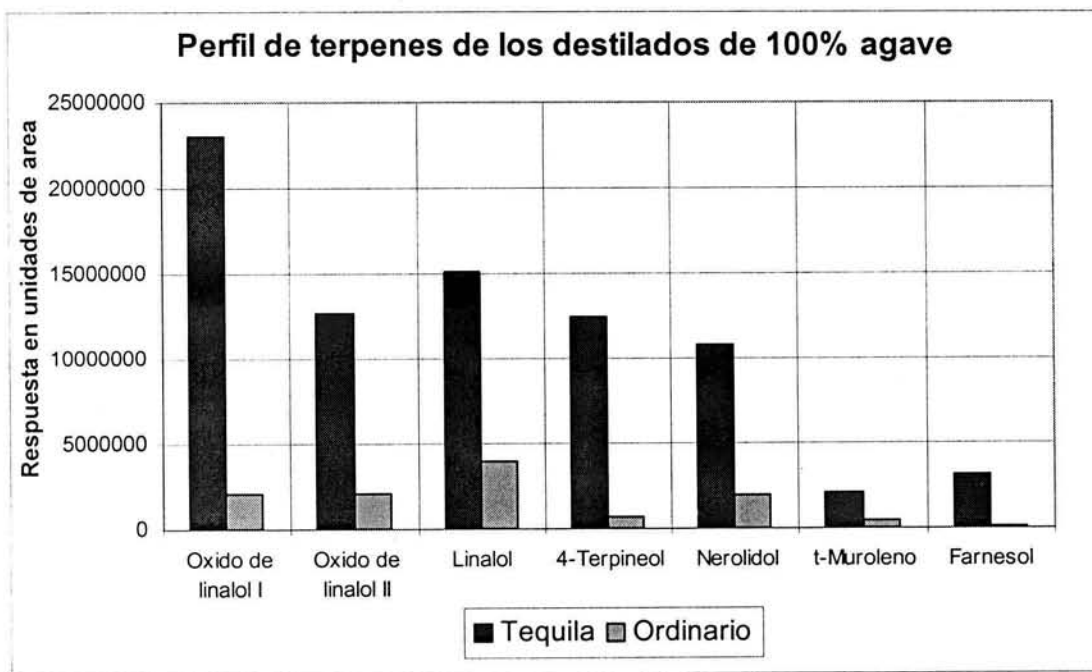
Nombre	Tr (ordinario.)	Tr (tequila)	I.K. Interpolado	I.K. Reportado
Oxido de linalol I	15.451	15.515	1063	1063
Oxido de linalol II	15.984	15.976	1082	1077
Linalol	16.280	16.288	1093	1092
4-terpineol	18.892	18.821	1185	1175
$\alpha$ -terpineol	Coeluye con el éster etílico del ácido octanoico			
Nerolidol	29.693	29.687	1573	1553
$\tau$ -muroleno	31.911	31.904	1652	n.r.
Farnesol	33.562	33.601	1712	n.r.

**Tabla 22.** Terpenos identificados en el ordinario y en el tequila 100% agave. Los índices de Kóvats son los obtenidos por la interpolación y el reportado más cercano en columna no polar.

Tr. El tiempo de retención esta en minutos.

n.r No se han reportado.

En la gráfica 13 se muestra el perfil para el ordinario y para el tequila. Podemos observar que para el tequila la proporción de estos compuestos es mayor que para el ordinario, esto se debe al efecto de la segunda destilación, la cual provoca que estos compuestos volátiles se concentren, además de que esto se ve influenciado por los cortes de cabezas y colas durante el proceso de destilación. En términos generales la cantidad de terpenos que se encontraban en el agave van disminuyendo conforme transcurre el proceso de elaboración del tequila.



**Gráfica 13.** Comparación de los perfiles de terpenos en el ordinario y en el tequila 100% agave.

## VII. Conclusiones

Se pudo determinar el perfil de los **compuestos terpénicos** en las diferentes etapas de la producción del tequila partiendo desde la materia prima.

- Se estableció una metodología analítica para el tratamiento de cada una de las muestras.
- Se optimizaron todos los parámetros cromatográficos para el análisis de las muestras.
- Se determinaron cualitativamente los compuestos terpénicos en el agave, mosto, mosto muerto (después de la fermentación), ordinario (primera destilación) y tequila blanco (segunda destilación).

Además de haber cubierto los objetivos del presente trabajo, también se puede concluir lo siguiente:

En el *Agave tequilana* Weber variedad azul existen alrededor de 28 terpenos. La concentración y cantidad de estos van disminuyendo durante el proceso de elaboración del tequila.

La causa mas probable para la disminución de los terpenos, es el procesos de fermentación, ya que se genera el CO<sub>2</sub> el cual favorece el desprendimiento de los compuestos volátiles.

La mayoría de los terpenos que se encuentran en el tequila provienen de sus formas libres desde el agave; el farnesol y los óxidos de linalol se formaron durante el procesos de elaboración. Durante el proceso de cocción y maceración es cuando se empieza a detectar el farnesol, y durante el proceso de destilación es cuando se detectan los óxidos de linalol que seguramente se generan debido a las altas temperatura.

El sabor característico del tequila se debe en parte, a la presencia de los siguientes terpenos: linalol, sus óxidos, 4-terpineol,  $\alpha$ -terpineol, nerolidol,  $\tau$ -muroleno y al farnesol (Benn y Peppard 1996).

## VIII. Recomendaciones

Con las metodologías establecidas en este trabajo de investigación, lo que procede es:

Realizar el análisis de varias muestras de agave de diferentes regiones para verificar si existe o no diferencia del perfil de terpenos.

Utilizando el agave de una sola región, se da el seguimiento del perfil de terpenos durante los diferentes procesos de elaboración del tequila, se haría lo mismo para cada tipo de agave si existieran diferencias entre las regiones. Esto con la finalidad de verificar si existe diferencia en el perfil de terpenos entre los procesos.

Se necesitaría otro estudio donde se compararía el perfil de terpenos de los tequilas respecto al tiempo de añejamiento y la cantidad de agave utilizado, es decir, tequilas jóvenes, reposados y añejos, y para cada caso en sus versiones de 100% agave y 51% agave; todos partiendo de las mismas materias primas y el mismo proceso, para comprobar la diferencia que debería existir en el perfil de los terpenos debido a el añejamiento y la cantidad de agave utilizado.

Una vez definido el perfil de terpenos de un tequila 100% de agave (de una región de agave en particular, si fuera el caso), se realizaría la comparación con otras bebidas del mercado, entiéndase: mezcales, charandas, rones y otros aguardientes, para ver las posibles diferencias entre estas bebidas.

Con todos estos estudios se podría definir una norma de tequila, mas clara para diferenciarlo de otras bebidas y para definir mejor el perfil de los tequilas jóvenes, reposados y añejos, además de diferenciar los tequilas 100% de agave de los 51% de agave.

## IX. Referencias bibliográficas

- Arrhenius, S., McCloskey, L., Sylvan, M., (1996), "Chemical markers for aroma of vitis vinifera var chardonnay regional wines", *J. Agric. Food Chem.* 44, 1085-1090.
- Augusto, F., Valente, A., dos-Santos, E., Rivellino, S., (2000), " Screening of brazilian fruti aromas using solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry", *J. Chromatogr. A*, 873, 117-127.
- Benn S., Peppard T., (1996), "Characterization of Tequila Flavor by Instrumental and Sensory Analysis", *J. Agric. Food Chem.*, 44, 557-566.
- Benson, G., Wyllie, S., Leach N., Mares, L., Fitt, P., (2001), "Improved method for the rapid determination of terpenoid aldehydes in cotton", *J. Agric. Food Chem.* 49, 2181-2184.
- Bestmann, J., Winkler, L., Helversen, O., (1997), "Headspace analysis of volatile flower scent constituents of bat-pollinated plants", *Phytochemistry*, 46, 1169-1172.
- Cool, G., Hu Zi-Ling, Zavarin, E., (1998), "Foliage terpenoides of Chinese *Cupressus* species", *Bioch.l System. And Eco.*, 26, 899-913.
- Davies, D., Giovanelli, J., Rees, A., (1969), *Bioquímica vegetal*, Ediciones Omega, S.A., Barcelona, p. 300-430.
- Dongyan, H., Weihua, Z., Ruihua, H., (1998), "Separation and determination of chemical constituents in the volatile oil of traditional Chinese crude drugs", *J. Pharm. Biomed. Anal.* 17, 1423-1426.
- Escudero, A., Etievant, P., (1999), "Effect of antioxidants on the flavor characteristics and the gas chromatography/olfactometry profiles of champagne extracts", *J. Agric. Food Chem.*, 47, 3303-3308.
- Ferreira, V., Hernandez-Orte, P., Escudero, A., Lopez, R., Cacho, J., (1999), "Semipreparative reversed-phase liquid chromatographic fractionation of aroma extracts from wine and other alcoholic beverages", *J. Chromatogr. A*, 864, 77-88.

- Fitzgerald, G., James, K., MacNamara, K., Stack, M., (2000) "Characterisation of whiskeys using solid-phase microextraction with gas chromatography-mass spectrometry", *J. Chromatogr. A*, 896, 351-359.
- Gentry, H., (1982), *Agaves of Continental North America*. Tucson, Arizona: The University of Arizona Press, p. 61-104, 382-586.
- Goodwin, W., Mercer, I., (1974), "Introduction to plant biochemistry", Pergamon Press, Germany, 279-282.
- Granados-Sánchez D., (1993), *Los Agaves en México*, Universidad Autónoma de Chapingo, México. 1-170.
- Guillen, M., Manzanos, M., (1999), "Extractable components of the Aerial parts of *Salvia lavandulifolia* and composition of the liquid smoked flavoring obtained from them", *J. Agric. Food Chem.* 47, 3016-3027.
- Hans-Walter H., (1997), *Plant Biochemistry & Molecular Biology*, Capítulo 17, *Isoprenoids*, Oxford, University Press. 360-375.
- Hennion, M., (1999), "Review, solid-phase extraction: method development, sorbents and coupling with liquid chromatography", *J. Chromatogr. A*, 858, 3-54.
- Hill, P., Smith, R., (2000), "Determination of sulphur compounds in beer using headspace solid-phase microextraction and gas chromatographic analysis with pulsed flame photometric detection", *J. Chromatogr. A*, 872, 203-213.
- Ho Chi-Tang, Manley, Ch., (1993), *Flavor measurement IFT*, ED. Marcel Dekker, E.U.A.1-345.
- Jalali-Heravi, M., Fatemi, H., (2001), "Artificial neural network modeling of Kovats retention indices for noncyclic and monocyclic terpenes", *J. Chromatogr. A*, 915, 177-183.
- Jella, P., Rouseff, R., Goodner, K., Widmer, W., (1998) "Determination of key flavor components in methylene chloride extracts from processed grapefruit juice", *J. Agric. Food Chem.* 46, 242-247.
- Kataoka, H., Lord, H., Pawliszyn, J., (2000), review "Applications of solid-phase microextraction in food analysis" *J. Chromatogr. A*, 880, 35-62.
- Kitf, G., Leon, Ch., (1995), "Volatile compounds emitted from flowers and leaves of *Brugmansia x Candida* (Solanaceae)", *Phytochemistry*, 40, 1093-1095.

- Lachowicz, K., Jones, G., Briggs, D., Bienvenu, F., Palmer, M., Mishra, V., Hunter, M., (1997), "Characteristic of plant and plant extracts from five varieties of Basil (*Ocimum basilicum* L.) grown in Australia", *J. Agric. Food Chem.* 45, 2660-2665.
- Léaute, R., (1990), "Distillation in alambic", *Am. J. Enol. Vitic.*, 01 90-103.
- Luna-Zamora R., (1991), La historia del tequila, de sus regiones y sus hombres, Consejo Nacional para las Culturas y las Artes, México D.F. 1-345.
- Luque de Castro, M., Jiménez-Carmona, M., Fernández-Pérez, V., (1999), "Towards more rational techniques for the isolation of valuable essential Oils from plants", *Trends in anal. Chem.*, 18, 708-716.
- Maccarone, E., Campisi, S., Fallico, B., Rapisarda, P., Sgarlata, R., (1998), "Flavor components of Italian orange juices", *J. Agric. Food Chem.* 46, 2293-2298.
- McCaskill, D., Croteau, R., (1998), "Some caveats for bioengineering terpenoid metabolism in plant", *Trends Biotechnol.*, 16, 349-355.
- Mestres, M., Busto, O., Guasch, J., (1998), "Headspace solid-phase microextraction analysis of volatile sulphides and disulphides in wine aroma", *J. Chromatogr. A*, 808, 211-218.
- Milkova, T., Talev, G., Christov, R., Dimitrova-Konaklieva, S., Popov, S., (1997), "Sterols and volatiles in *Cystoseira barbata* and *Cystoseira crinita* from the Black Sea", *Phytochemistry*, 45, 93-95.
- Milos, M., Radonic, A., "Gas chromatography mass spectral analysis of free and glycosidically bound volatile compounds from *Juniperus oxycedrus* L. Growing wild in Croatia", *Food Chem.*, 68, 333-338.
- Miller, L., (1973), *Phytochemistry the process and products of photosynthesis*, Vannostrand Reinhold, N.Y., E.U.A. 254- 269
- Miller, M., Stuart, J., (1999), "Comparison of gas-sampled and SPME-sampled static headspace for the determination of volatile flavor components", *Anal. Chem.* 71, 23-27.
- MNCP, (Museo Nacional de Culturas Populares, 1988), "El maguey árbol de las maravillas".

- Pawliszyn, Janusz, (1997), Solid Phase Microextracción, theory and practice, Wiley – Vch Inc., E.U.A.1-430.
- Poli, F., Bonsignore, L., Loy, G., Sacchetti, G., (1997), “Comparison between the essential oils of *Santolina insularis* (Genn. ex Fiori) arrigoni and *santolina Corsica* Jord. Et Fourr. From the island of Sardinia (Italy)”, *J. of Ethnopharm.* 56, 201-208.
- Rohloff, J., (1999), “Monoterpene composition of essential oil from peppermint (*Mentha x piperita* L.) with regard to leaf position using solid-phase microextraccion and gas chromatography / mass spectrometry analysis”, *J. Agric. Food Chem.* 47, 3782-3786.
- Rösecke, J., Pietsch, M., Wilfried, K., (2000), “Volatile constituents of wood – rotting basidiomycetes”, *Phytochemistry*, 54, 747-750.
- Roussis, V., Tsoukatou, M., Petrakis, P., Chinou, I., Skoula, M., Harborne, J., (2000), “Volatile constituents of four *Helichrysum* species growing in Greece”, *Biol. Chem. Syst. Ecol.*, 28, 163-175.
- Sides, A., Robards, K., Helliwell, S., (2000), “Developments in extraction techniques and their application to analysis of volatiles in foods”, *Trends in analytical chemistry*, 19, 322-329.
- Shimoda, M., Wu, Y., Nonaka, S., Osajima, Y., (1997) “Cluster análisis of GC data on oxygenated terpenes of young leaf and green fruti samples of Japanese pepper (*Xanthoxyum piperitum* DC.)”, *J. Agric. Food Chem.* 45, 1325-1328.
- Skoog, D., West, D., (1989), Química analítica, McGraw-Hill, Edición cuarta, México.
- Swain, T., (1966), Comparative Phytochemistry, , Capítulo 6 (Weissmann, G.), *The distribution of terpenoids*, Academic Press.
- Tapia, J., (1990), El agave azul, de las mieles al tequila, Instituto francés de América latina y Tequila Tapatio S.A., México D.F., 1-27.
- Umamo, K., Nakahara, K., Shoji A., Shibamoto, T., (1999), “Aroma chemicals isolated and identified from leaves of *Aloe arborescens* Mill. var *natalensis* Berger”, *J. Agric. Food Chem.*, 47, 3702-3705.



- Valenzuela-Zapata, A., (1994), “El agave tequilero: cultivo e industrialización” , Monsanto, 1-120.
- Warmers, U., König, W., (1999), “Gymnomitrane-type sesquiterpenes of liverworts *Gymnomitrion obtusum* and *Reboulia hemisphaerica*”, 52, 1501-1505.
- Wilkes, J., Conte, E., Kim, Y., Holcomb, M., Sutherland, J., Miller, D., (2000), “Sample preparation for the analysis of flavors and off-flavors in foods”, *J. Chromatogr. A*, 880, 3-33.
- Zhou, A., McFeeters R., (1998), “Volatile compounds in cucumbers fermented in low-salt conditions”, *J. Agric. Food Chem.* 46, 2117-2122.

## X. Anexos

### A.

#### Definiciones:

Acuminada: Tipo de ápice de hoja con márgenes rectos que terminan en un ángulo menor a los 45 grados.

Antera: Parte superior del estambre de las plantas con flores, que se abre al madurar para dejar escapar los granos de polen formados en su interior

Antesis: Se le llama al momento de abrirse la flor (floración).

Ápice: Extremo superior o punta

Bráctea: Pequeña hoja de forma especial situada en la base del pedúnculo floral.

Bracteolas. Bráctea secundaria generalmente sobre el pedicelo.

Cuspidada: Que termina gradualmente en una punta rígida y aguda.

Decurrente: Hoja que se prolonga sobre el tallo

Flexos: Es un tipo de orientación curvada.

Funeliforme: En forma de embudo.

Inconstricto: Que se encuentra abierta alguna cavidad

Inflorescencia: Forma de agruparse las flores en una planta; los principales tipos son racimos, espiga, umbela, capítulo y cima

Lanceolada: Hoja de base mas o menos amplia, atenuada hacia el ápice.

Ovada: De forma oval

Panícula: Es un término para describir una inflorescencia muy ramificada.

Pedicelos: Soporte individual de una flor que forma parte de una inflorescencia.

Pedúnculo: Pieza alargada o tallo que une un pequeño órgano terminal con el conjunto del cuerpo, eje floral que sostiene las flores

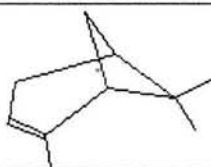
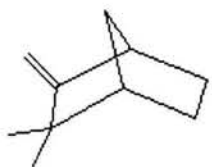
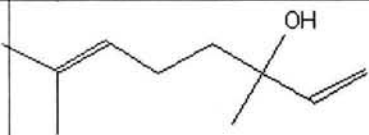
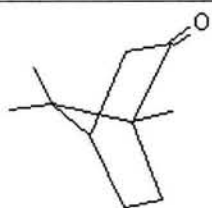
Repando: Es un tipo de margen con entradas escasas, graduales e irregulares.


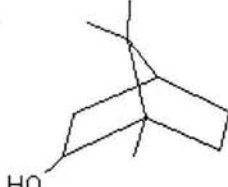
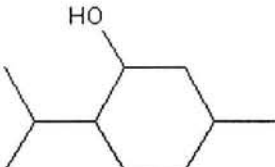
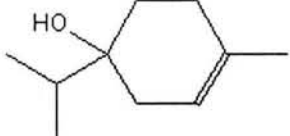
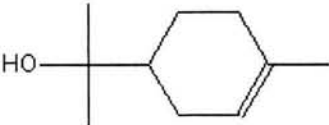
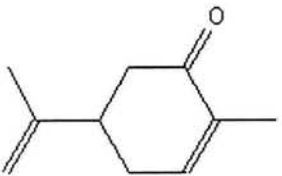
Súrculo: Renuevo de una planta, generalmente de origen subterráneo o de un tallo viejo.

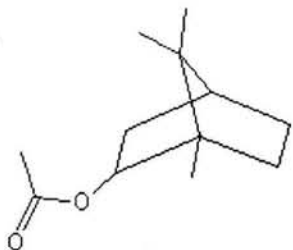
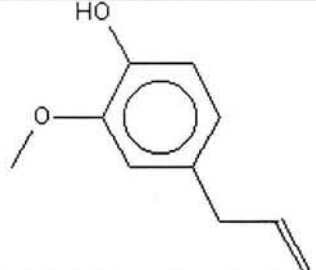
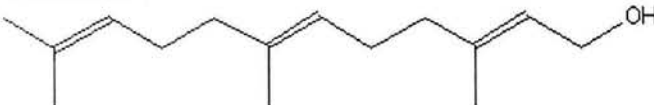
Umbelas: inflorescencia pedunculada cuyos pedicelos se originan en un mismo punto.

**B.**

**Estándares y tiempo de retención**

Nombre	Estructura	Características	P.M.	Tr (min.)
<b><math>\alpha</math>-Pinoeno</b>		Hidrocarburo Bicíclico 1_insaturación	136	10.88
<b>Canfeno</b>		Hidrocarburo Bicíclico 1_insaturación Fuera del ciclo	136	11.50
<b>Linalol</b>		Alcohol lineal 2_insaturaciones	154	16.23
<b>Alcanfor</b>		Cetona Bicíclica Saturada	152	17.86

<b>Isoborneol</b>		Alcohol Bicíclico Saturado	154	18.23
<b>Borneol</b>		Alcohol Bicíclico Saturado (isómero)	154	18.5
<b>Mentol</b>		Alcohol Cíclico Saturado	156	18.71
<b>4-Terpineol</b>		Alcohol Cíclico 1_insaturación	154	18.84
<b><math>\alpha</math>-Terpineol</b>		Alcohol Cíclico 1_insaturación (isómero)	154	19.25
<b>Carvona</b>		Cetona Cíclico 2_insaturaciones	150	20.90

<b>Acetato de isobornilo</b>		Ester Bicíclico Saturado	196	22.19
<b>Eugenol</b>		Alcohol (fenol) y éter Aromático 1_insaturación	164	24.23
<b>Metileugenol</b>	$C_{11}H_{14}O_2$	Éter Aromático 1_insaturación	178	25.54
<b>Alcohol Patchuli</b>	$C_{15}H_{26}O$	Alcohol Tricíclico	222	32.34
<b>Farnesol</b>		Alcohol Lineal 3_insaturación	222	33.49
<b>Mezcla de sesquiterpenos</b>	$C_{15}H_{24}$	Hidrocarburos Lineal o cíclico Insaturados	204	n.d.