



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

Determinación de Terpenos en Tequila 100% Agave

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

I.A. ROCÍO DEL CARMEN JUÁREZ CIPRÉS



TUTOR: Dra. Araceli Peña Álvarez

AÑO: 2006



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.

Agradecimientos:

Con profundo respeto y cariño a la Universidad Nacional Autónoma de México.

A la Universidad Panamericana y en especial a la Dra. Esmeralda Chalita Kaím por el apoyo brindado para la realización de este posgrado.

Al grupo Allied Domecq por las muestras de tequila proporcionadas para realizar la investigación propuesta.

A la Dra. Araceli Peña Álvarez por su profesionalismo, compromiso y paciencia en la dirección del presente trabajo de investigación.

Al M en C. Santiago Capella Vizcaíno por sus asesorías durante el desarrollo del presente trabajo.

A todos los miembros del jurado por sus comentarios y sugerencias que mejoraron el contenido del trabajo escrito.

A la M en C. Covadonga Torre Marina por su constante apoyo y entusiasmo y por su admirable ejemplo y calidad humana.

A la M en C. Carmen Labastida Rubio por compartir su experiencia académica y su amistad durante el desarrollo del trabajo en el laboratorio.

A las profesoras Silvia Mendoza y Ernestina Cervera por su amistad y ejemplo y al profesor Adolfo García Osuna por sus asesorías durante el posgrado.

A la Dra. Silvia Pérez Casas por su alegría, entusiasmo y amor por la docencia y por sus constantes palabras de ánimo.

A todos mis compañeros de laboratorio: Claudia, Nacho, Hipócrates, Magali, Erika, Miguel, David y Gaby, por compartir sus conocimientos y amistad.

Gracias Alain por contribuir al diseño de diagramas y figuras.

GRACIAS

EL AGAVE AZUL

El aire le impregnó su aliento,
el sol le entregó su vital energía,
la lluvia le alimentó con su húmeda vida,
la madre tierra le infundió su fuerza,
el padre tiempo le dio su madurez.

La espera ha terminado,
el largo tiempo se detiene,
ha vuelto a surgir la legendaria magia,
y ahora . . .

Un desafiante puñado de verdiazules espadas
laceran el zarco firmamento,
justo a tiempo a la cita de amor
con la Diosa Mayáhuel
a la entrega de su savia y ricas mieles,
para que fluyan por sus 400 pechos
y alimente a los dioses de la embriaguez

Andrés Rodríguez Reynoso

El presente trabajo de tesis se realizó en el Laboratorio 101 de Cromatografía de Gases del Departamento de Química Analítica de la División de Estudios de Posgrado, Edificio "B" de la Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México

Dedicatoria

Con enorme cariño, a mi madre querida Elvira Ciprés por su incansable e incondicional apoyo sin el cual no habría sido posible realizar el posgrado.

A mi esposo Eduardo Laguna por su admirable optimismo, apoyo y ánimo constante.

A mis hijos Eduardo, Alain y Carlos por su amor y entusiasmo.

ÍNDICE

	Pág.
1. Resumen	1
2. Introducción	2
3. Antecedentes	3
3.1 Bebidas alcohólicas. Breve desarrollo histórico.....	3
3.1.1 Clasificación de las bebidas alcohólicas.....	3
3.1.2 Congenéricos.....	5
3.1.3 Terpenos.....	6
3.1.3.1 Biosíntesis de terpenos.....	8
3.1.3.2 Importancia de los terpenos en bebidas alcohólicas.....	10
3.2 Tequila.....	12
3.2.1 Importancia del tequila.....	12
3.2.2 Descripción del género.....	13
3.2.3 Cultura y utilización del maguey.....	13
3.2.4 Los <i>Agaves</i> en Tequila, Jalisco.....	14
3.2.5 Elaboración de la bebida.....	15
3.2.5.1 Cocimiento y molienda.....	15
3.2.5.2 Extracción de las mieles y residuos de bagazo.....	16
3.2.5.3 Fermentación.....	17
3.2.5.4 Destilación.....	18
3.2.6 Clasificación del tequila.....	19
3.3 Estudios preliminares sobre caracterización de compuestos que identifican el aroma y sabor del tequila.....	20
3.3.1 El aroma del tequila.....	21
3.3.2 Formación de compuestos durante el proceso térmico del <i>Agave</i>	24
3.4 Extracción de compuestos volátiles.....	25
3.4.1 Métodos de extracción de terpenos en bebidas alcohólicas.....	25
3.4.1.1 Extracción líquido-líquido (ELL).....	25
3.4.1.2 Microextracción en fase sólida (MEFS).....	26
3.4.1.2.1 Procedimiento.....	28
3.4.1.2.2 Optimización.....	29
3.4.1.2.3 Selección de la fibra.....	29

3.4.1.2.4 Optimización de la extracción.....	30
3.4.1.2.5 Optimización de la desorción.....	31
3.4.1.3 Aplicación de MEFS-HS en bebidas alcohólicas.....	31
3.5 Cromatografía de Gases- Espectrometría de Masas.....	32
4. Objetivos.....	36
4.1 Objetivo general.....	36
4.2 Objetivos particulares.....	36
5. Desarrollo experimental.....	37
5.1 Extracción de terpenos.....	37
5.1.1 Materiales y equipo.....	37
5.1.2 Reactivos.....	38
5.1.3 Estándares.....	38
5.1.4 Muestras.....	38
5.1.5 Terpenos.....	39
5.2 Análisis cromatográfico.....	39
5.2.1 Condiciones cromatográficas.....	39
5.2.2 Identificación de terpenos.....	40
5.2.3 Cuantificación de terpenos.....	40
5.3 Extracción líquido-líquido (ELL).....	40
5.3.1 Procedimiento para el análisis por ELL-CG-EM.....	40
5.3.2 Linealidad	40
5.3.3 Precisión.....	41
5.4 Microextracción en fase sólida en modo headspace (MEFS-HS).....	41
5.4.1 Selección de parámetros para MEFS-HS.....	41
5.4.1.1 Selección de fibra.....	41
5.4.1.2 Influencia de la fuerza iónica en la extracción.....	41
5.4.1.3 Temperatura de extracción.....	42
5.4.1.4 Perfil de tiempo de extracción.....	42
5.4.2 Procedimiento para la MEFS-HS.....	42
5.4.2.1 Linealidad.....	42
5.4.2.2 Análisis de terpenos por MEFS-HS-CG-EM.....	42
5.4.2.3 Precisión.....	43
6. Resultados y análisis de resultados.....	45
6.1 Resultados y análisis de resultados por ELL-CG-EM.....	45

6.1.1 Linealidad.....	45
6.1.2 Precisión.....	45
6.1.3 Análisis de terpenos por ELL-CG-EM.....	46
6.2 Resultados y análisis de resultados por MEFS-HS-CG-EM.....	52
6.2.1 Selección de parámetros para MEFS-HS-CG-EM.....	52
6.2.1.1 Selección de fibra.....	52
6.2.1.2 Efecto de la adición de NaCl.....	53
6.2.1.3 Temperatura de extracción.....	55
6.2.1.4 Perfil de tiempo de extracción.....	56
6.2.2 Linealidad.....	56
6.2.3 Precisión.....	57
6.2.4 Análisis de terpenos por MEFS-HS-CG-EM.....	58
6.3 Comparación de ELL-CG-EM y MEFS-HS-CG-EM.....	63
6.4 Evaluación estadística del análisis cuantitativo de terpenos en tequila.....	64
7. Conclusiones.....	67
8. Bibliografía.....	70
9. Anexo.....	74
9.1 Curvas de calibración relativas por ELL-CG-EM.....	74
9.2 Curvas de calibración relativas por MEFS-HS-CG-EM.....	76
9.3 Concentración de terpenos por ELL-CG-EM en tequila.....	79
9.4 Concentración de terpenos por MEFS-HS-CG-EM en tequila.....	82
9.5 Perfil de terpenos por ELL-CG-EM en tequila.....	85
9.6 Perfil de terpenos por MEFS-HS-CG-EM en tequila.....	86
9.7 Análisis de terpenos por ELL-CG-EM y MEFS-HS-CG-EM en tequila.....	87

1. Resumen

La industria del tequila es considerada la más antigua de América y de gran parte del mundo, adquiriendo mayor valor gracias al impulso de varios sectores interesados en cuidar y colocar esta bebida típica en el gusto internacional. Estudios recientes de competitividad en ciencia y tecnología señalan como uno de los puntos importantes a desarrollar en la industria tequilera el autenticar el origen de la materia prima a partir de la cual proviene el tequila, así como la caracterización de su sabor.

Siendo los terpenos compuestos aromáticos importantes presentes en plantas y por consiguiente en los productos fermentados que de ellas se obtienen y que contribuyen al sabor y aroma de las bebidas, se planteó identificar y cuantificar los terpenos más importantes presentes en tequila con la finalidad de definir un perfil de terpenos que contribuya a la caracterización del tequila 100% *Agave*.

Se desarrolló y aplicó la metodología de microextracción en fase sólida (MEFS) acoplada a cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM) y se comparó con extracción líquido-líquido (ELL) para el análisis por cromatografía de gases-espectrometría de masas, para determinar los principales terpenos: linalol, 4-terpineol, α -terpineol, β -citronelol, eugenol, *cis*-nerolidol y *trans*, *trans*-farnesol en tequila 100% *Agave*.

La cuantificación se realizó por CG-EM modo barrido total del espectro (scan) utilizando el programa perfil iónico. Los iones empleados fueron: m/z 71 para linalol y 4-terpineol, m/z 59 para α -terpineol, m/z 69 para β -citronelol, *cis*-nerolidol y *trans*, *trans*-farnesol, y m/z 164 para eugenol. La MEFS se realizó por Headspace (MEFS-HS) utilizando una fibra de PDMS/DVB.

Se tuvo buena precisión en ambos métodos obteniendo coeficientes de variación menores a 10% para los terpenos analizados, excepto eugenol y *trans-trans*-farnesol que fue mayor por MEFS-HS-CG-EM.

El método ELL-CG-EM presentó buena linealidad en el intervalo de concentración de 50 a 1000 ng/mL con coeficientes de correlación (r) mayores de 0.990 para todos los terpenos.

El método MEFS-HS-CG-EM presentó aceptable linealidad en el intervalo de concentración de 50 a 1000 ng/mL con coeficientes de correlación (r) mayores de 0.990 para todos los terpenos excepto para *cis*-nerolidol (0.989) y *trans*, *trans*-farnesol (0.981).

En el análisis de los 21 tequilas estudiados se obtuvo un perfil similar de terpenos para la mayoría de las muestras utilizando ambos métodos, siendo el α -terpineol el de mayor concentración, seguido de linalol, sin embargo, algunos tequilas presentaron ligeramente mayor concentración de *trans*, *trans*-farnesol que de linalol por ELL-CG-EM, que por MEFS-HS-CG-EM

Se obtuvo mayor extracción de linalol, 4-terpineol, α -terpineol y β -citronelol por MEFS-HS-CG-EM que por ELL-CG-EM y ocurrió lo contrario para eugenol, *cis*-nerolidol y *trans*, *trans*-farnesol, probablemente debido a la estructura química de los compuestos, a la polaridad de la fibra y del disolvente empleado en la ELL.

EL método MEFS-HS-CG-EM fue mas sensible que ELL-CG-EM, requirió menor volumen de muestra para el análisis, eliminó el uso de disolventes orgánicos y empleó un montaje experimental simple de bajo costo.

2. Introducción

La producción de bebidas alcohólicas ha sido una actividad ligada a la mayoría de las culturas durante milenios. En forma empírica, los humanos aprendimos a encauzar las fermentaciones alcohólicas de diversos sustratos. Debido a la gran importancia de estos productos, la investigación científica y tecnológica relacionada con las bebidas alcohólicas ha concentrado grandes esfuerzos desde el siglo pasado. Esta industria es dentro de las biotecnológicas la de mayor importancia económica en el mundo, y los avances en el conocimiento que se han generado en su seno, se han extrapolado a muchas aplicaciones de la biotecnología y tecnología de los alimentos a lo largo de más de siglo y medio ⁽²⁾.

En los últimos 30 años, el tequila ha adquirido gran importancia en México y a nivel mundial, pues ha pasado de ser una bebida regional a una bebida de aceptación internacional, siendo una de las bebidas con mayor reconocimiento y crecimiento en los mercados de exportación (principalmente de Estados Unidos y Europa), obteniendo el 27 de mayo de 1997 ⁽³⁾ el reconocimiento por la Unión Europea de la “Denominación de origen del tequila” lo cual le ha otorgado una identidad nacional y un respaldo importante en el comercio internacional de bebidas alcohólicas.

El tequila es una bebida alcohólica de origen mexicano obtenida de la planta *Agave tequilana* Weber *variedad azul*. Las plantas de *Agave* son cultivadas en México para la producción de diferentes bebidas alcohólicas: mezcal, pulque, bacanora y tequila por mencionar algunas. Sin embargo, *Agave tequilana* Weber *var. azul* es la variedad más cultivada ya que es la materia prima principal usada en la producción de tequila (NOM-006-SCFI-1994).

Dentro de los compuestos presentes en las bebidas alcohólicas que imparten sabor y aroma se puede considerar a los terpenos como metabolitos secundarios de las plantas ⁽⁴⁾. Se sabe que las flores, frutas, hojas y raíces de muchas plantas contienen compuestos volátiles, sustancias aromáticas llamadas aceites esenciales ⁽⁵⁾. Debido a la importancia sensorial que estos compuestos representan en las plantas y por consiguiente en el *Agave*, materia prima fundamental en la elaboración del tequila, se planteó cuantificar los 7 terpenos presentes en mayor concentración (linalol, 4-terpineol, α -terpineol, β -citronelol, eugenol, *cis*-nerolidol y *trans*, *trans*-farnesol) de los 28 terpenos identificados en tequila 100% *Agave* en estudios previos ⁽⁶⁾, comparando dos metodologías ELL-CG-EM y MEFS-HS-CG-EM, con la finalidad de obtener un perfil de terpenos en tequila reposado 100% *Agave*.

3. Antecedentes

3.1 Bebidas alcohólicas. Breve desarrollo histórico

La elaboración de bebidas alcohólicas es tan antigua que no se puede establecer con precisión el origen de esta práctica aunque existen evidencias arqueológicas de más de 7000 años de antigüedad⁽⁷⁾. Durante milenios el hombre supo fermentar mostos que contenían carbohidratos con técnicas muy depuradas, e incluso aprendió a destilar el alcohol para aumentar su concentración en las bebidas. Todo sin tener idea del papel ni de la existencia de los microorganismos. Probablemente las primeras bebidas se hicieron a partir de sustratos azucarados como los jugos de frutas, ya que esto solamente requiere poner en contacto al jugo con la levadura silvestre presente en la superficie de la propia fruta. La elaboración de bebidas alcohólicas a partir de sustratos amiláceos como los cereales requieren de la actividad amilolítica de las enzimas generadas durante la germinación, por lo cual fue necesario que el hombre aprendiera primero el arte del malteado antes de poder elaborar bebidas como la cerveza; sin embargo, esta actividad también se desarrolló en épocas muy remotas⁽²⁾.

Desde esas épocas las diferentes civilizaciones han aprendido a fermentar diversos sustratos a fin de producir sus bebidas alcohólicas autóctonas. En general estas bebidas habían contenido el grado alcohólico logrado exclusivamente por la fermentación; fue hasta el siglo XV cuando se empezó a popularizar el arte de la destilación, y por lo tanto, aparecieron bebidas con mayor contenido alcohólico⁽⁸⁾.

3.1.1 Clasificación de las bebidas alcohólicas

Una forma general de clasificación puede ser en función del sustrato de que proceden, si son o no destiladas, o si son simples o compuestas. Los dos primeros criterios se emplean en la clasificación mostrada en la Tabla 1; además de las bebidas destiladas y no destiladas, se hace una distinción intermedia; ésta es la de las bebidas fortificadas, cuyo grado alcohólico ha sido incrementado mediante la mezcla de una bebida alcohólica no destilada con una destilada o con alcohol. El último criterio de clasificación se refiere a si la bebida consta exclusivamente del producto obtenido mediante la fermentación y, en su caso, la destilación (bebidas simples), o si además se le adicionaron algunos otros componentes que contribuyan al sabor (bebidas compuestas): tal es el caso de las infusiones como el lúpulo en la cerveza, el enebro y las cáscaras de naranja en la ginebra, hierbas y especias en el vermouth, etc., o bien, la adición de jugos o extractos de frutas como en los licores de frutas o en los curados del pulque⁽²⁾.

Tabla 1. Clasificación de las bebidas alcohólicas de acuerdo al sustrato del que proceden ⁽²⁾

SUSTRATO	NO DESTILADAS	DESTILADAS	FORTIFICADAS
Frutas			
Uva	vino, champaña vinos espumosos	brandy, coñac armañac, <i>pisco</i> <i>grappa</i>	jerez, oporto vermouth, madeira, moscatel
Manzana	sidra sidra espumosa	calvados	
Piña	Tepache		
Pera	perry		
Cereza	kirsch		
Otras	vinos de frutas		
Cereales			
Cebada	cerveza	whisky	
Maíz	tesguino	bourbon, whisky de maíz, whisky de Tennessee	
Arroz	sake		
Sorgo	cerveza africana		
Varios (incluyendo papa)		vodka, ginebra <i>akvavit</i>	
Agaves	pulque	tequila mezcal	
Agavácea Dasyilirion spp “Sereque”		Sotol	
Miel	vino de miel		
Caña Melazas o jugo		ron, aguardiente, cachaza, pinga, charanda	

Algunas bebidas alcohólicas tienen “Denominación de origen”, esto significa que ninguna bebida puede ostentar ese nombre particular si no fue producida dentro de la región específica de esa denominación, con la materia prima del lugar y bajo determinadas normas de proceso y calidad establecidas por las autoridades del país correspondiente, y aceptadas en acuerdos internacionales por otros países. Algunas de estas bebidas con Denominación de Origen son: champaña, coñac, tequila, bourbon y jerez, entre otros.

Los contenidos de alcohol en el caso de las bebidas no destiladas fluctúan por lo general entre 3.5 y 14% (v/v), con algunas excepciones en las que se llegan a obtener contenidos de hasta 20%, como en el *sake* o algunos vinos de mesa como los “*trokenbernauslese*” alemanes, mientras que en el caso de las bebidas destiladas se encuentra entre 35 y 55%. Las bebidas fortificadas tienen un contenido de alcohol de alrededor de 20%. El contenido alcohólico se expresa normalmente en grados Gay-Lussac (°G.L.) que corresponden a porcentaje de alcohol volumen en volumen.

3.1.2 Congenéricos

El denominador común de todas las bebidas alcohólicas es que son productos con un contenido significativo de etanol obtenido mediante la fermentación, donde generalmente predomina como microorganismo productor la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. El sabor y aroma de las bebidas alcohólicas está influenciado en gran parte por este alcohol sin embargo, una gran variedad de compuestos orgánicos presentes en cantidades menores es también responsable de estos atributos y contribuyen grandemente a las características distintivas entre las diferentes bebidas alcohólicas. Estos compuestos son alcoholes, carbonilos, ácidos orgánicos, ésteres y compuestos azufrados, que en conjunto reciben el nombre de congenéricos⁽⁸⁾.

Si bien hay bebidas alcohólicas que poseen algunos congenéricos peculiares, en general son los mismos compuestos los que se encuentran presentes en todas las bebidas, siendo más bien las proporciones de cada uno de ellos la razón de que existan diferencias distintivas entre estos productos. Las proporciones relativas entre algunos de ellos y la concentración de etanol modifican además los umbrales de percepción de algunos de los congenéricos⁽⁸⁾.

El origen de los congenéricos se encuentra principalmente en la cepa de levadura y otros microorganismos presentes durante la fermentación; éstos producen algunos de los compuestos y transforman algunos otros presentes en el sustrato. También la materia prima contribuye en la aportación de congenéricos, algunos de los cuáles permanecen inalterados durante la fermentación.

En general los factores que afectan la formación de estos compuestos son: la cepa de levadura en gran medida, la temperatura de fermentación, la concentración de oxígeno en el medio, la naturaleza y concentración de la fuente de nitrógeno, el tipo y la concentración de los azúcares fermentables, la concentración y tipo de aminoácidos y la concentración de algunas vitaminas^(2, 8).

Además las operaciones posteriores a la fermentación alcohólica afectarán significativamente las concentraciones y proporciones de los compuestos finales, como: fermentaciones secundarias, destilación y

añejamiento. Algunos productos como el vodka, quedan prácticamente libres de congénicos debido a una destilación muy refinada ⁽⁹⁾, mientras que las bebidas no destiladas son ricas en estos compuestos.

La formación de éstos compuestos es en general deseable, sin embargo hay algunos que no lo son y su concentración debe ser lo más baja posible. Dos ejemplos de esto son el metanol, alcohol de muy alta toxicidad, proveniente de la propia levadura o de la desmetilación de las pectinas, y el diacetilo, el cual confiere a la bebida un sabor desagradable (a mantequilla). La Tabla 2 presenta los principales congénicos normalmente presentes en bebidas alcohólicas.

Tabla 2. Principales congénicos presentes en bebidas alcohólicas ⁽²⁾

TIPO DE COMPUESTO	COMPUESTO
alcoholes pesados C3 (aceite de fusel) C4 C5	n-propanol butanol, iso-butanol, sec-butanol amílico, isoamílico, amílico activo
otros alcoholes	glicerol, 2 feniletanol
carbonilos (aldehídos y cetonas)	acetaldehído, acetona, 2,3-pentanodiona
ácidos orgánicos	fórmico, acético, propiónico, láctico, butírico
ésteres	acetato de etilo, formiato de etilo, acetato de isoamilo, acetato de metilo

Dentro de los compuestos presentes en las bebidas alcohólicas que imparten sabor y aroma se puede considerar a los **terpenos** que están catalogados como metabolitos secundarios de las plantas ⁽⁴⁾. Se sabe que las flores, frutas, hojas y raíces de muchas plantas contienen compuestos volátiles, sustancias aromáticas llamadas aceites esenciales ⁽⁵⁾. Por muchos años, estos extractos de plantas han sido utilizados como medicamentos, especias y perfumes.

3.1.3 Terpenos

El estudio de la composición de aceites esenciales se distingue como una de las áreas de investigación más antiguas de la química orgánica. Muy a menudo, el componente volátil principal de un aceite esencial pertenece a una clase de sustancias químicas llamadas terpenos. Los terpenos son moléculas orgánicas relativamente pequeñas con una gran diversidad de estructuras. Se conocen miles de terpenos diferentes, algunos son hidrocarburos, otros contienen oxígeno, algunos son moléculas de cadena abierta, otros más contienen anillos ⁽¹⁰⁾. La Fig. 1 presenta algunos terpenos encontrados en plantas.

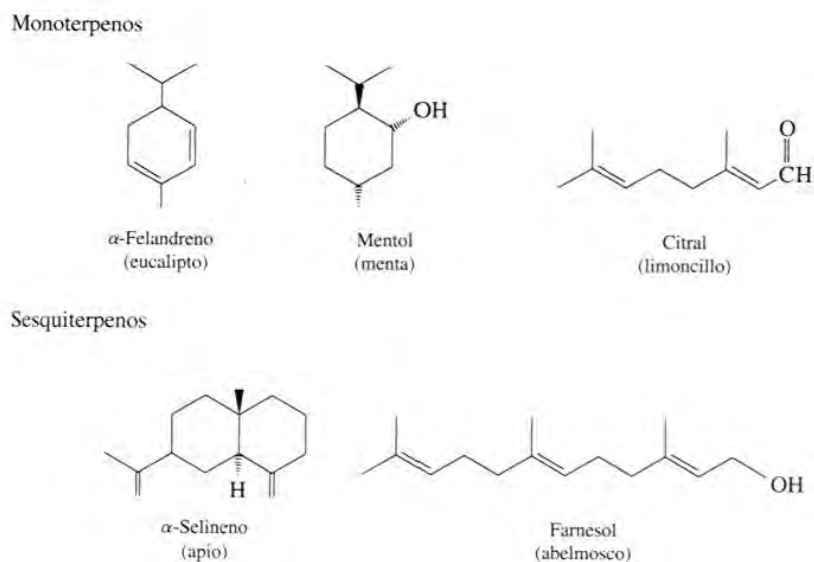


Fig. 1. Terpenos encontrados en aceites esenciales de plantas⁽¹¹⁾

Todos los terpenos están relacionados, independientemente de sus aparentes diferencias estructurales conforme a la regla del isopreno, esta característica estructural distingue a estos compuestos de otros productos naturales. Los terpenos pueden considerarse provenientes de uniones cabeza-cola de unidades simples de cinco carbonos del isopreno (2-metil-1,3-butadieno) (Fig. 2); y se clasifican según el número de unidades de isopreno que contengan (Tabla 3)⁽¹¹⁾.

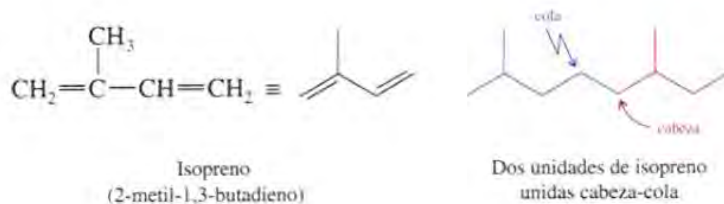


Fig. 2. Estructura de la unidad isopreno

Tabla 3. Nomenclatura de terpenos

Nº isoprenos	Nº átomos de C	Grupo
2	10	Monoterpenos
3	15	Sesquiterpenos
4	20	Diterpenos
6	30	Triterpenos
8	40	Tetraterpenos

Los monoterpenos son sustancias de 10 carbonos biosintetizadas a partir de dos unidades de isopreno, los sesquiterpenos son moléculas de 15 carbonos formados a partir de tres unidades de isopreno, y así sucesivamente. Los monoterpenos y sesquiterpenos se encuentran principalmente en plantas, como el geraniol (monoterpeno) y el farnesol (sesquiterpeno), ambos con un grupo alcohol, se encuentran en el aceite de rosas⁽¹¹⁾.

3.1.3.1 Biosíntesis de terpenos

La regla del isopreno es un formalismo conveniente que ayuda a determinar nuevas estructuras, pero no es el precursor biológico de los terpenos. En vez de ello la naturaleza utiliza para la biosíntesis de terpenos dos “equivalentes” de isopreno, el *pirofosfato de isopentenilo* y el *pirofosfato de dimetilalilo*. Estas moléculas de cinco átomos de carbono se forman por la condensación de tres unidades de Acetil Coenzima A⁽¹⁰⁾ (Fig. 3).

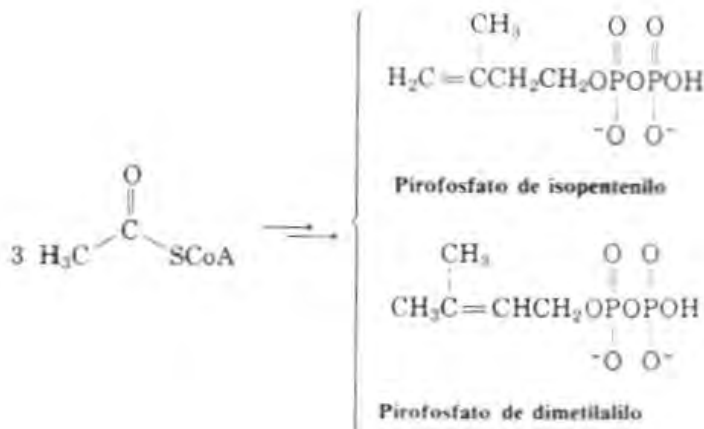


Fig. 3. Formación de *pirofosfato de isopentenilo* y *pirofosfato de dimetilalilo*

Las propiedades químicas del *pirofosfato de isopentenilo* y el *pirofosfato de dimetilalilo* son complementarias, de forma tal que les permiten reaccionar entre sí para formar un enlace carbono-carbono que conecta las dos unidades isopreno, (OPP es la abreviatura del grupo pirofosfato).



Fig. 4. Conexión de 2 unidades de isopreno

El carbono terciario formado presenta la pérdida de un protón para dar un doble enlace. El producto de esta reacción es el *pirofosfato de geranilo* (Fig. 5).

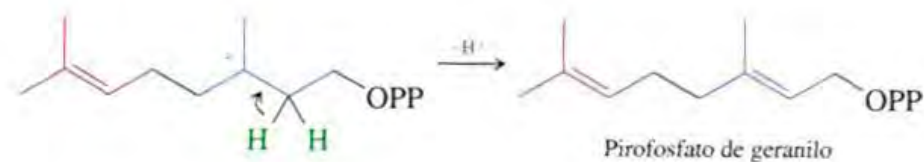


Fig. 5. Formación de *pirofosfato de geranilo* (precursor de monoterpenos)

La hidrólisis del grupo éster del pirofosfato da como resultado geraniol, un monoterpeno natural que se encuentra en el aceite de rosas (Fig. 6).

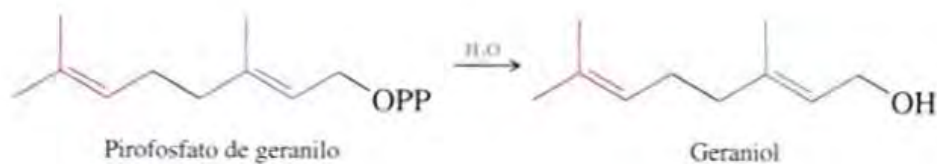


Fig. 6. Formación de geraniol (aceite de rosas)

El *pirofosfato de geranilo* es el precursor de todos los demás monoterpenos, como el limoneno un monoterpeno que se haya en muchos aceites cítricos. Cuando el *pirofosfato de geranilo* reacciona con el *pirofosfato de isopentenilo*, se obtiene el *pirofosfato de farnesilo*, de 15 carbonos (Fig. 7). Así como el pirofosfato de geranilo es el precursor de todos los monoterpenos, el pirofosfato de farnesilo es el precursor de todos los sesquiterpenos⁽¹¹⁾.

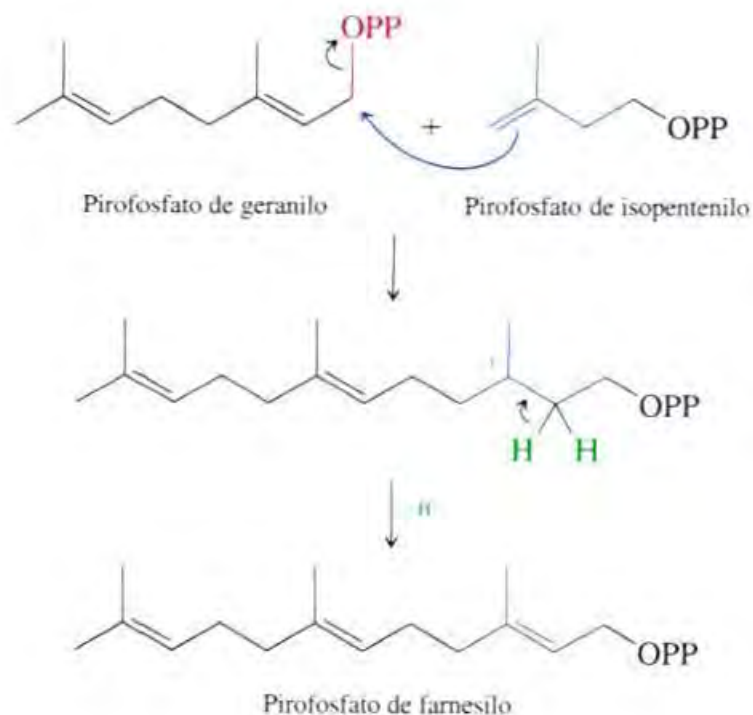


Fig. 7. Formación de *pirofosfato de farnesilo* (precursor de sesquiterpenos)

3.1.3.2 Importancia de los terpenos en bebidas alcohólicas

Los compuestos volátiles de las uvas son los principales contribuyentes de la nota frutal y fresca de los vinos. Algunos compuestos responsables de este aroma son: terpenos, derivados de benceno y alcoholes alifáticos, éstos compuestos se encuentran principalmente en la piel de las uvas. La concentración de éstos compuestos volátiles será diferente dependiendo de la variedad de la uva, prácticas de cultivo y factores climáticos ⁽¹²⁾.

Se ha encontrado en numerosos estudios que los compuestos terpenoides forman el eje de la expresión sensorial del bouquet del vino el cuál es típico de su variedad y puede emplearse por lo tanto analíticamente para una caracterización varietal. Se han identificado numerosos monoterpenos en particular monoterpenos dioles en mosto de uva y vino. Aproximadamente son conocidos 50 monoterpenos de los cuáles los más importantes se muestran en la Tabla 4. Los monoterpenos alcoholes dominantes principalmente en variedades de uva moscatel son linalol, geraniol, nerol, citronelol y α -terpineol ^(12, 13), y se consideran al linalol, geraniol y nerol como los responsables del aroma típico floral de las uvas moscatel y que contribuyen al aroma de sus vinos ⁽¹²⁾.

Tabla 4. Principales terpenos en jugo de uva y vinos ⁽¹³⁾

No.	Compuesto	No.	Compuesto
1	<i>trans</i> -furano linalol óxido	13	diol I
2	<i>cis</i> -furano linalol óxido	14	endiol
3	linalol	15	diol II
4	ho-trienol	16	hidroxi-citronelol
5	neral	17	8-hidroxi-dihidro-linalol
6	α -terpineol	18	hidroxinerol
7	geraniol	19	<i>trans</i> -8-hidroxilinalol
8	<i>trans</i> -pirano linalol óxido	20	hidroxigeraniol
9	<i>cis</i> -pirano linalol óxido	21	<i>cis</i> -8-hidroxilinalol
10	citronelol	22	ac. geránico
11	nerol	23	triol
12	geraniol		

Los terpenos son compuestos volátiles presentes en las sustancias aromáticas conocidas como “aceites esenciales” que se encuentran en flores, frutas, hojas y raíces de muchas plantas y por consiguiente en la planta de *Agave* materia prima necesaria en la elaboración de bebidas alcohólicas como mezcal y tequila entre otras, existiendo por lo tanto estos compuestos también en los respectivos destilados provenientes del *Agave*.

Trabajos previos ^(6, 14) han estudiado los terpenos presentes en diferentes tipos de *Agave* identificando un perfil de terpenos distinto para cada uno de los *Agaves* estudiados (*Agave angustifolia*, *Agave salmiana* y *Agave tequilana* Weber), lo que le confiere un aroma y sabor característico a cada una de las respectivas bebidas alcohólicas que de ellas se obtienen. En otro estudio se identificaron 28 compuestos terpénicos en *Agave tequilana* Weber var. azul ⁽¹⁵⁾ y 8 terpenos en tequila, de los cuáles 3 compuestos se generaron durante el proceso de elaboración de la bebida (óxidos de linalol I y II y farnesol). Investigaciones previas sobre determinación de terpenos en bebidas alcohólicas provenientes del *Agave* ⁽⁶⁾ cuantificaron diferentes terpenos en tequila blanco 100% *Agave* encontrando en mayor concentración los compuestos linalol, 4-terpineol, α -terpineol, eugenol, *trans*-nerolidol y *trans*-farnesol. La concentración de terpenos en bebidas alcohólicas es baja, lo que dificulta su identificación, sin embargo algunos de ellos pueden ser compuestos característicos de las diferentes variedades de *Agave* y por consiguiente de sus respectivas bebidas alcohólicas ⁽⁶⁾.

3.2 Tequila

3.2.1 Importancia del tequila

El tequila es una bebida alcohólica destilada, obtenida de la fermentación y destilación del jugo cocido de la piña de la variedad del maguey *Agave tequilana* Weber *variedad azul*. *Agave tequilana* es cultivada principalmente en los estados de Jalisco, Guanajuato, Tamaulipas, Michoacán y Nayarit. Un gran porcentaje de la producción de tequila es exportado y 65% por ciento del total es exportado a los Estados Unidos.

Ante el aumento del consumo mundial del tequila, en varios países surgieron otros licores vendidos supuestamente como tal, sin serlo. Debido a esto, durante muchos años se buscó el reconocimiento internacional de esta bebida. El 13 de octubre de 1993 se publicó en el Diario Oficial de la Federación la Norma Oficial Mexicana NOM-006-SCFI-1993 Bebidas Alcohólicas-Tequila Especificaciones, entrando en vigor al día siguiente de su expedición. El 27 de mayo de 1997 la Unidad Europea reconoce la Denominación de Origen del Tequila, que tomó como ejemplo la del jerez, champaña y coñac. Finalmente el 3 de septiembre de 1997 se publicó una versión definitiva de la Norma Oficial Mexicana NOM-006-SCFI-1994, Bebidas Alcohólicas-Tequila Especificaciones, donde cita que con motivo de la Declaración General de Protección a la Denominación de origen “Tequila”, el Estado Mexicano se constituyó como único titular por ser un producto distintivo de México.⁽³⁾

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. La Denominación de origen es una figura jurídica reconocida internacionalmente por medio de la cual se impide que pasen a ser de uso genérico los nombres que han alcanzado prestigio y notoriedad y que se utilizan para designar productos locales con características distintivas que provienen de un medio natural y un factor humano propios y peculiares. La zona de Denominación de origen del tequila comprende 180 municipios de 5 estados del país e incluye todos los municipios del estado de Jalisco, 30 de Michoacán, 7 de Guanajuato, 8 de Nayarit y 11 de Tamaulipas.

En 1994 se creó el Consejo Regulador del Tequila, que verifica el cumplimiento de la Norma Oficial Mexicana y garantiza al consumidor la calidad del producto, así como protege y salvaguarda la Denominación de origen. Este Consejo lo integran productores de tequila, productores de *Agave*, envasadores, distribuidores y representantes gubernamentales. Desafortunadamente, el cultivo de algunas especies y variedades de *Agave* está en peligro de desaparecer ante la falta de leyes y vigilancia, ya que hasta la fecha el único tipo de maguey protegido es el azul.

3.2.2 Descripción del género

Taxonómicamente el género *Agave* se ubica en la familia *Agavaceae*. En el continente americano se reportan aproximadamente 310 especies, de las cuáles en México existen 272, considerándose a este país como centro de origen del género⁽¹⁶⁾.

En griego, *Agave, agavus*, significa “admirable” y fue a partir de la especie *Agave americana* que Carlos Lineo describió el género en 1753. Su centro de origen se considera en México pues en esta región se encuentra la mayor variabilidad y número de especies⁽¹⁾. A nivel de especies, existen variantes en cuanto a las respuestas al ambiente, ya que se encuentran distribuidas en diversas regiones con diferentes climas. Tanto es así, que las características de las células también varían en cada una de las especies. Son plantas adaptadas a condiciones de aridez. Raíces someras y ramificadas, cutícula gruesa y succulencia, son algunos de los atributos que le permiten establecerse en zonas carentes de agua.

Agave tequilana Weber variedad azul es la única variedad permitida por la Norma Oficial Mexicana para la elaboración de tequila, la característica distintiva es el intenso color verde azul de su roseta, es prolífica en hijuelos de rizoma y presenta excelentes cualidades en la elaboración de esta bebida. Es la especie que se utiliza en mayor escala debido a que posee ciertas características importantes dentro de las cuales está un contenido alto de azúcares para una mejor producción de tequila^(1, 16). Los productores de *Agave azul* del siglo XIX seleccionaron esa variedad por su menor ciclo de maduración, sus mejores características industriales y su mayor producción de vástagos. La selección de *Agave tequilana* Weber fue iniciada desde hace por lo menos cien años⁽¹⁾.

3.2.3 Cultura y utilización del maguey

Al nombre “maguey” se le atribuye un origen caribeño-antillano⁽¹⁶⁾; aunque Goncalves de Lima⁽¹⁷⁾ (1956) hace referencia al uso de este nombre para la planta en México desde la época colonial. De la planta en general, los indígenas mexicanos aprovechaban: el jugo; las hojas, de las cuales sacaban fibra para obtener hilo y tejer telas o para elaborar papel; la espina terminal de las pencas, a manera de aguja para coser y para sacrificios corporales; las hojas secas como suela de calzado, como tejas en techos de casas y como combustible; los quíotes (tallos florales) eran usados como vigas para construir paredes y techos y para cercar terrenos de las viviendas.

Aunque el uso de bebidas fermentadas, fue una costumbre entre los habitantes indígenas del Pacífico (desde Sonora hasta Oaxaca), la destilación no fue conocida en la era precolombina sino hasta el siglo XVI, cuando los alambiques de destilación fueron introducidos a México de España y las Filipinas⁽¹⁸⁾. Se considera que al igual que la formación de los mestizos, por mezcla de dos culturas, el tequila resultó de la combinación de un recurso

nativo (el maguey) y una tecnología importada (la destilación). La zona de la parte central de México, se plantea como el sitio de donde se difundió el tequila (más propiamente llamado mezcal) al resto del país. A fines del siglo XIX se comenzó a elaborar en el pueblo de Tequila en Jalisco, de donde tomó el nombre esta bebida⁽¹⁸⁾.

3.2.4 Los Agaves en Tequila, Jalisco

Entre el siglo XVIII y el XIX, el mezcal producido en un pequeño pueblo, al nordeste del estado de Guadalajara, empezó a adquirir gran fama por su extraordinaria calidad. En esta pequeña comunidad llamada Tequila, las condiciones climatológicas y de la tierra eran ideales para el cultivo de cierta variedad de maguey: el *Agave azul* (*Agave tequilana* Weber)⁽¹⁶⁾ (Fig. 8).

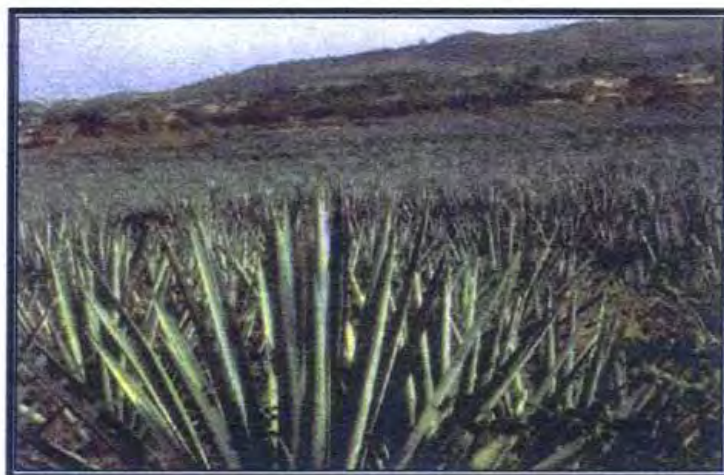


Fig. 8. Cultivo de *Agave tequilana* Weber var. azul (Tequila, Jalisco)⁽¹⁾

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

La parte central de Jalisco presenta un tipo de clima de los más secos dentro del grupo de los cálidos subhúmedos con lluvias en verano. La temperatura media anual es de 23.6° C. El tiempo que tarda *el Agave tequilana* Weber var. azul en llegar al estado de madurez industrial es aproximadamente de 6 a 7 años en las condiciones climáticas del Valle de Tequila y de 7 a 9 años en el de Atotonilco, y por lo tanto, el contenido de azúcares será más alto en los *Agaves* cultivados en Atotonilco⁽¹⁶⁾.

3.2.5 Elaboración de la bebida

El proceso de obtención del tequila se inicia cuando los *Agaves* han alcanzado su madurez fisiológica entre los 5-10 años y les empieza a crecer la inflorescencia; en ese momento se “desquiotan” (corte de la inflorescencia). Después de un periodo de 7 meses a un año de descanso, la planta se cosecha o “jima”, acción que consiste en cortar la planta y sus hojas dando forma a un cuerpo ovoide que recibe el nombre de “piña” (Fig. 9).

Después de la jima, o cosecha de piñas se muestrea la carga para evaluar la cantidad de azúcares reductores (fructuosa), mediante la cual se establece el precio. En época de lluvia las piñas contienen menos azúcares y mucha agua, lo cual requiere emplear más materia prima para compensar la deficiencia ⁽¹⁶⁾.



Fig. 9. Cosecha o “jima” del *Agave* ⁽¹⁾

3.2.5.1 Cocimiento y molienda

Habiéndose jimado el *Agave*, se transporta a las fábricas tequileras, donde las piñas se desgarran empleando una banda desgarradora que las destroza en pequeñas partes y se conducen a los tradicionales hornos de mampostería o a los modernos autoclaves (Fig. 10), el tiempo de cocimiento es mayor en hornos antiguos (48 horas) que en autoclaves (12 horas). El *Agave* puede someterse a cocción fraccionado en pequeñas partes, por mitades de cabeza o en cabezas enteras. La cocción tiene la finalidad de hidrolizar azúcares complejos como almidones e inulina (polímero de fructosa) en azúcares simples como la fructosa y sacarosa fácilmente fermentables ⁽¹⁾.



Fig. 10. Hornos de cocción ⁽¹⁾

3.2.5.2 Extracción de las mieles y residuos de bagazo

Al terminar el cocimiento el material cocido se transporta a molinos donde es cortado en pequeños pedazos, el producto obtenido del cocimiento se exprime mediante un sistema mecánico de cuchillas giratorias agregando agua a presión al bagazo con la finalidad de extraer las mieles del *Agave* cocido (Fig. 11). Entre 55 y 60 kilogramos de bagazo son desechados en la producción de un litro de tequila ⁽¹⁾ aunque esto depende de cada empresa, pues los tipos de tequila que se elaboran (100% de *Agave* o mixtos) tendrán relación estrecha con la cantidad de bagazo producida. Las mieles extraídas del *Agave* cocido son transportadas a las tinajas de formulación o de fermentación, según sea el caso. La formulación consiste en mezclar las mieles de *Agave* con un preparado de otras mieles, como caña de azúcar, para posteriormente ser fermentadas.



Fig. 11. Extracción de azúcares ⁽¹⁾

Las mieles para elaborar tequila 100% *Agave* no requieren formulación y se dirigen hacia la fermentación. La formulación es un procedimiento que sólo se lleva a cabo en la elaboración de tequilas que se preparan con una mezcla de azúcares, que según la Norma Oficial Mexicana pueden tener una proporción de 51% de *Agave* y 49% de otras mieles. ^(1, 3)

3.2.5.3 Fermentación

La fermentación es una parte muy importante del proceso industrial, en la que se transforman los azúcares en alcohol etílico y bióxido de carbono. Los depósitos de fermentación son grandes tinas de acero inoxidable que se llenan con las mieles, llamadas también mostos (Fig. 12). A éstos se le agrega agua, levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* y nutrientes para la fermentación. Las cepas de levadura son preparadas previamente y crecidas bajo condiciones controladas, para después multiplicarlas en grandes volúmenes. Las levaduras que se utilizan en la fermentación son del género *Saccharomyces*, y es la *S. cerevisiae* la especie comúnmente empleada. Sin embargo, las cepas tequileras se pueden considerar diferentes por el adiestramiento y desarrollo que les da cada industria tequilera, siendo un secreto industrial de cada proceso ⁽¹⁾.

El tiempo de fermentación varía con la temperatura ambiental y ésta a su vez cambia con cada época del año. Durante las bajas temperaturas de invierno, la fermentación se prolonga más de 24 horas. El mosto en plena fermentación es efervescente, y el movimiento cesa cuando las levaduras terminan su trabajo. En este momento finaliza la fermentación y se acostumbra decir que el mosto ha muerto, debido a que las levaduras han terminado la conversión de azúcares en alcohol.



Fig. 12. Tinan de Fermentación ⁽¹⁾

3.2.5.4 Destilación

Es el procedimiento por el cual los fermentos son separados, mediante calor y presión, en productos de riqueza alcohólica (tequila) y vinazas; éstas últimas constituyen un producto de desecho de agua y levadura, y son llamadas también lodos de fermentación. En la destilación, los fermentos son transportados por tuberías a los alambiques de destilación (Fig. 13), donde se calientan. La destilación se efectúa en alambiques de cobre o acero inoxidable, e incluso en torres de destilación continua. Los alambiques constan de tres partes: la olla o caldera, donde se deposita el mosto para su calentamiento; la columna o capitel, que recoge y conduce los vapores, y el serpentín, en el que se enfrían los vapores y se convierten en líquidos.



Fig. 13. Alambiques de destilación ⁽²⁰⁾

Para la elaboración del tequila se necesitan 2 destilaciones; la primera, llamada destrozamiento, donde el alcohol alcanza una graduación de 25% (v/v) de alcohol etílico, obteniéndose un producto llamado “ordinario”; y la segunda destilación llamada rectificación, donde el producto se destila hasta el 55% (v/v) de alcohol etílico, obteniendo el llamado tequila blanco (Fig. 14).

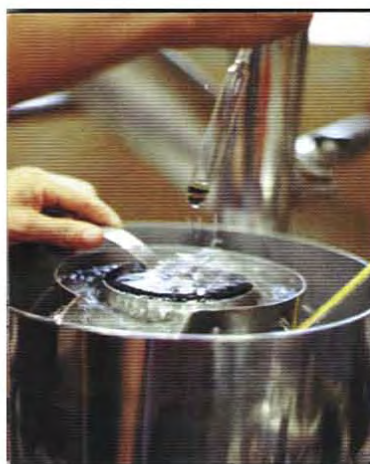


Fig. 14. Tequila destilado ⁽¹⁾

Después de ser filtrado y reducido el porcentaje de alcohol, el tequila puede ser embotellado para su venta, aunque también puede añejarse por espacio hasta de 4 años para lograr su máxima calidad. El proceso se realiza en barricas de madera de roble o encino americano (Fig. 15), el tiempo de añejamiento varía de acuerdo al tipo de tequila. Cuando no se añeja, el tequila se envasa inmediatamente.



Fig. 15. Maduración del tequila en barricas de madera de roble o encino ⁽²⁰⁾

3.2.6 Clasificación del tequila

Hay 4 tipos de tequila según la Norma Oficial Mexicana NOM-006-SCFI-1994 (aprobada el 13 de agosto de 1997) ⁽³⁾:

El blanco (tipo I), producto de la rectificación y ajustado con agua de dilución a su graduación comercial; el joven abocado (tipo II), tequila blanco adicionado con uno o más saborizantes y colorantes inocuos para suavizar su sabor; el reposado (tipo III), producto que se deja al menos 2 meses en recipientes de roble o encino, susceptible de ser abocado; el añejo (tipo IV), producto sometido a maduración por lo menos un año en barricas de roble o encino (Fig. 15), susceptible de ser abocado y ajustado con agua de dilución a su graduación comercial. El tequila puede ser 100% de *Agave* o se le pueden adicionar hasta un 49% de otros azúcares ajenos al mismo (obtenidos de la caña de azúcar), pero deberán indicarse en la etiqueta ^(3 y 19).

Existen más de 550 diferentes marcas ⁽²⁰⁾ de tequila registradas ante la Cámara de la Industria Tequilera y el Consejo Regulador del Tequila, que ofrece el mercado y aún no se tiene información suficiente sobre los componentes más abundantes y determinantes del sabor y aroma en tequila. Las investigaciones sobre aroma del tequila definen que la mayoría de los compuestos volátiles que contribuyen en ese rubro son similares a los reportados para muchos vinos, sin embargo el sabor y aroma completo y característico del tequila podría deberse al sinergismo de compuestos volátiles menores ⁽²¹⁾.

3.3 Estudios preliminares sobre caracterización de compuestos que identifican el aroma y sabor del tequila.

Investigaciones preliminares han evaluado algunos compuestos del tequila como Manjarrez y Llama ⁽²²⁾ (1969) que midieron los niveles de 9 componentes en 15 tequilas y 8 mezcales, otros como Incitti ⁽²³⁾ (1980) emplearon una columna empacada por Cromatografía de Gases para determinar 25 compuestos volátiles (principalmente alcoholes fusel y ésteres) así como 6 constituyentes no identificados en 10 tequilas; Bluhm (1983) ⁽²⁴⁾ reportó un incremento observado en congéneres individuales del tequila como resultado del proceso de añejamiento. Existe sin embargo, relativamente poca información publicada sobre caracterización química del sabor del tequila.

En 1996 Benn y Peppard ⁽²⁵⁾ propusieron caracterizar el sabor del tequila mediante análisis instrumental y sensorial con la finalidad de adquirir un conocimiento más profundo sobre la composición química del sabor y su relación con las características sensoriales del producto. Un extracto de tequila reposado que representó 0.03% v/v del total de la muestra original fue obtenido por extracción con diclorometano y fue analizado por cromatografía de gases acoplada a diferentes métodos de detección de los compuestos: detector de ionización de flama FID, espectrómetro de masas EM y detector de azufre quimioluminiscencia SCD, evaluando cualitativamente más de 175 componentes. El tequila y el extracto fueron también sometidos a una evaluación sensorial empleando la técnica de CG acoplada a un puerto de evaluación de aroma.

Fueron detectados más de 60 aromas ⁽²⁵⁾, al menos 30 de los cuales pudieron ser correlacionados con picos específicos del cromatograma de los componentes encontrados en el extracto. El estudio determinó 5 constituyentes como los aromas más potentes en el tequila siendo éstos: isovaleraldehído, β damascenona, alcohol isoamílico, 2 fenil etanol y vainillina. La evaluación sensorial descriptiva analizó diferentes atributos sensoriales, por comparación con diferentes materiales de referencia que abarcaran esos atributos (alcohol etílico, licor de granos, frutas secas, whisky, 12% azúcar en agua, hojuelas de salvado, extracto de vainilla, chocolate, etc.)

En el estudio de Benn y Peppard se confirmó la presencia entre los volátiles del tequila de acetales, ácidos, alcoholes, aldehídos, ésteres, éteres, furanos, cetonas, fenoles, pirazinas, compuestos azufrados y terpenos, identificando 25 compuestos terpenoides, de los cuáles los terpenos presentes en mayor concentración fueron: *cis*-linalol óxido, linalol, α -terpineol, citronelol, *cis*-nerolidol, 6-dihidrofarnesol y *trans-trans*- α -farnesol. Los ésteres representaron el grupo más grande con aproximadamente 50 compuestos individuales detectados en el extracto del tequila. Al parecer la mayoría de ésteres identificados en este estudio son producto del metabolismo de la levadura o se han formado subsecuentemente durante el proceso de añejamiento por esterificación de ácidos grasos en presencia de etanol a alta concentración. Indudablemente también están presentes como

resultado de la fermentación más de 20 alcoholes detectados en el extracto del tequila, varios de los cuales estaban en combinación con aldehídos y acetales presumiblemente formados durante el añejamiento ⁽²⁵⁾.

Los 25 constituyentes terpenoides detectados en el extracto del tequila son probablemente derivados del *Agave*, no fueron identificados hidrocarburos terpenos, solo monoterpenos y/o alcoholes sedquiterpenos, ésteres, éteres y un aldehído. No es conocido que alguno de éstos se forme durante la fermentación, destilación, almacenamiento o cocción de la piña. Parece, sin embargo, que varios grupos de compuestos tales como aldehídos, cetonas, un número de compuestos que contienen azufre y posiblemente algunos de los fenoles, son formados durante la cocción y/o el paso de destilación durante la producción del tequila ⁽²⁵⁾.

Se ha especulado que los fenoles pueden formarse por rompimiento de los ácidos fenólicos originalmente presentes en el *Agave*, alternativamente pueden llegar al tequila por extracción de las tinas de roble durante el añejamiento. Otras diferencias en la composición química encontradas fueron mayores niveles de linalol, *cis*- y *trans*-óxidos de linalol y varios constituyentes terpenoides en el tequila oro, y menores niveles de varios acetaldehídos en el tequila blanco ⁽²⁵⁾.

En el estudio realizado por Benn y Peppard ⁽²⁵⁾, se hicieron intentos por reconstituir el sabor del tequila a partir de sus componentes identificados, preparando una solución de etanol con 47 componentes químicos encontrados en el extracto. El sabor del tequila “reconstituido” se encontró más dulce, sabor a chocolate, afrutado, fusel y estérico que el sabor del producto original, con un carácter a madera y especia. Mientras que varios aromas con estos descriptores fueron identificados durante el puerto de evaluación del aroma, pocos de ellos pudieron ser atribuidos a compuestos identificados en el extracto original del tequila, indicando con esto que otros componentes que contribuyen al sabor del tequila permanecen aún no identificados.

3.3.1 El aroma del tequila

Otros estudios para caracterizar el aroma del tequila basados en los avances de Benn y Peppard fueron los iniciados en 1999 por López M. G. ⁽²¹⁾, con la finalidad de determinar los principales compuestos volátiles más abundantes presentes en tequilas comerciales blanco, reposado y añejo. Se evaluaron los componentes volátiles realizando extracción líquido-líquido con diclorometano, el extracto fue secado sobre sulfato de sodio anhidro y después concentrado en un aparato Kuderna-Danish y analizado por cromatografía de gases-espectrometría de masas, también se empleó un cromatógrafo de gases acoplado a un olfatómetro analítico (CG-O) y se comparó con un análisis sensorial.

Se encontraron diferencias significativas entre los tres tipos de tequila en sus componentes volátiles. Dentro de éstos componentes se encontró que 3-metilbutanol y alcohol feniletílico fueron los componentes más abundantes presentes en los tres tipos de tequila sin embargo, algunos ácidos grasos fueron detectados en la mayoría de los tipos añejo y reposado, esencialmente ácido decanoico y dodecanoico ⁽²¹⁾.

27 de los compuestos identificados fueron comunes a todos los tequilas (blanco, reposado y añejo) y 22 de ellos estuvieron presentes también en mezcal. Alcoholes, ésteres y ácidos fueron los compuestos más abundantes caracterizados, seguidos de furanos, terpenos y compuestos nitrogenados así como compuestos fenólicos como la vainillina. Dentro de los terpenos identificados se reportaron el linalol, óxido de linalol, linalilpropanoato, nerolidol y timol en tequila blanco y reposado, mientras que en tequila añejo sólo se identificaron óxido de linalol, linalilpropanoato y timol ⁽²¹⁾.

Además de los 22 compuestos comunes al tequila y mezcal, algunos alquinos, compuestos nitrogenados y compuestos con azufre, fueron identificados sólo en el extracto de mezcal; éstos compuestos no estuvieron presentes en los tequilas, lo que indica que compuestos menores podrían ser responsables de grandes diferencias sensoriales entre estas bebidas alcohólicas ⁽²¹⁾.

17 alcoholes fueron completamente caracterizados entre los tequilas, 4 de los cuáles estuvieron también presentes en mezcal. Los alcoholes más abundantes fueron: 2,3 metilbutanol, alcohol feniletílico, 2-metilpropanol y propanol. Dentro de los ésteres, los más abundantes principalmente en el tipo añejo fueron: etil 2-hidroxiopropanoato, etil decanoato y fenil etilacetato. La predominancia de etilésteres es debido a la esterificación del etanol durante el tiempo de almacenaje. Furanos y los terpenos linalol, óxido de linalol, linalilpropanoato, nerolidol y timol fueron característicos del tipo reposado y fenoles y compuestos nitrogenados del tipo añejo ⁽²¹⁾.

La Tabla 5 presenta los principales compuestos identificados en los extractos originales detectados en el sistema cromatografía de gases–olfatometría. Los descriptores predominantes fueron: tepache, tequila, dulce, floral, madera, fenólico y vainillina.

Se concluye en este trabajo ⁽²¹⁾ que la mayoría de las diferencias en sabor encontradas en los tequilas blanco, reposado y añejo, pueden deberse al proceso de elaboración pues todos provienen del mismo *Agave tequilana* sin embargo, la localidad y el tiempo de cosecha no son conocidos la mayoría de las veces. Esto podría ser importante en el perfil final del sabor y aroma del producto.

Tabla 5. Componentes del extracto original del tequila ⁽²¹⁾.

Descriptor	Compuesto
Tepache	desconocido
Tequila	desconocido
Dulce	2,3 metilbutanol
Floral	feniletacetato
Dulce, Floral, Limón	linalol
Madera, Afrutado	alcohol feniletílico
Mantequilla	ácido decanoico
Fenólico	desconocido
Tequila	desconocido
Muy dulce	vainillina

La evaluación de los aromas más potentes demostró que los volátiles con las notas tipo dulce, floral, madera, y tepache, son compuestos de mayor impacto en el perfil de aroma del tequila. Este estudio define que la mayoría de los compuestos volátiles que contribuyen al aroma del tequila son similares a aquellos reportados para muchos vinos. Sin embargo, su único aroma completo podría deberse principalmente al sinergismo de multicomponentes (compuestos volátiles menores) ⁽²¹⁾.

López, M.G. y Dufour, J.P (2001) ⁽²⁶⁾ evaluaron los “aromas predominantes más potentes en tequilas blanco, reposado y añejo” provenientes del mismo lote y establecieron las diferencias entre ellos. Se encontraron más compuestos altamente volátiles y con mayor intensidad en los tipos añejo y reposado que en tequila blanco, presentando un perfil de aroma más complejo en añejo y reposado ciertamente debido al reposo prolongado, sin embargo muchos aromas fueron comunes a todas las muestras.

Los aromas más potentes encontrados para las tres clases de tequila fueron:

Tequila Blanco: feniletanol y feniletacetato

Tequila Reposado: feniletanol, feniletacetato y vainillina

Tequila Añejo: feniletanol, vainillina y un compuesto desconocido.

Se pudo concluir que el tequila añejo presenta un perfil de aroma más complejo y que la mayoría de éstos aromas son generados durante el proceso de añejamiento en barricas de roble blanco. Sin embargo, es importante mencionar que 3 de los compuestos potentes encontrados son aún desconocidos, por lo tanto se propuso mayor investigación para definir el perfil del aroma en los diferentes tipos de tequila.

3.3.2 Formación de compuestos durante el proceso térmico del *Agave*

En trabajos más recientes se ha estudiado por López, M.G. y Mancilla-Margalli, N.A. (2002)⁽²⁷⁾, la “formación de compuestos generados durante la cocción del *Agave*”, proceso que implica varias horas en hornos de ladrillo o en autoclaves. Los principales compuestos provenientes de reacciones de Maillard encontrados en los jugos exudados fueron: 5-Hidroximetilfurfural (5-HMF), metil-2-furoato, alcohol furfural, 2(5H)-furanona, 5-acetoximetil-2-furfural, y derivados etiléster y alanina. La mayoría de estos compuestos deben ser generados por reacciones entre fructosa y aminoácidos como alanina, fenilalanina y tirosina.

También se encontraron en los exudados compuestos que no son producto de reacciones de Maillard como ácidos grasos, aldehídos, alcoholes, terpenos y vainillina, los cuales perduran a través del proceso de producción del tequila, ya que éstos volátiles se han encontrado en muchos tipos y marcas de tequila. Más aún, es conocido que la mayoría de los ácidos grasos presentes en la bebida son usualmente convertidos a sus etilésteres más tarde durante el proceso de reposo o añejamiento debido a la abundancia del etanol.

Los principales compuestos de Maillard encontrados en los exudados de *Agave tequilana* fueron 5-Hidroximetilfurfural (5-HMF), maltol y 2-furanmetanol. La presencia de aminoácidos como alanina, fenilalanina y tirosina en los primeros exudados fue decisiva para la generación de algunos de los compuestos. Muchos componentes volátiles responsables del sabor del tequila como vainillina y terpenos dentro de los cuales se identificaron a linalol, linalilpropanoato, geraniol, 1-hidroxilinalol y escualeno, no relacionados a reacciones de encafecimiento también se formaron durante el proceso térmico^(27, 28).

Existe aún mucho camino por recorrer en el campo de la caracterización de perfiles de aromas y sabores en bebidas alcohólicas y particularmente en el tequila. Son muchos los factores que influyen en la elaboración de los productos fermentados y destilados como es el tequila y muchas otras bebidas similares, entre los que se encuentran: tipo de levadura empleada durante la fermentación, temperatura y tiempo de cocción de las piñas de *Agave*, destilación, añejamiento, etc., aunado a éstos, se involucran los característicos de la materia prima como: condiciones de cultivo, clima, desarrollo, madurez, cosecha y manejo postcosecha de la planta etc., factores todos determinantes en la producción de sabores y aromas de bebidas alcohólicas.

En varios trabajos se han evaluado por cromatografía de gases datos analíticos instrumentales de las sustancias responsables del aroma y sabor de bebidas alcohólicas y se ha correlacionado esta información con una evaluación sensorial del producto en estudio, sin embargo la dificultad principal de relacionar datos sensoriales con datos instrumentales consiste en que un sabor determinado no necesariamente se encuentra definido por un

compuesto específico, ya que pueden ser varios compuestos los que generen un sabor, incluso un compuesto puede generar sabores distintos dependiendo de la **concentración** en la que se encuentre.

3.4 Extracción de compuestos volátiles

3.4.1 Métodos de extracción de terpenos en bebidas alcohólicas

Las técnicas de extracción del aroma en alimentos se basan en las propiedades de sus constituyentes volátiles; volatilidad y afinidad con disolventes no polares y polímeros, para extraerlos selectivamente de la muestra. Tradicionalmente el análisis del aroma en bebidas alcohólicas se ha realizado mediante ELL empleando un disolvente de bajo punto de evaporación y enseguida inyectando el extracto a un sistema de CG-EM⁽³⁸⁾. Para el análisis de bebidas alcohólicas se han empleado mezclas de disolventes como pentano:diclorometano⁽³⁹⁾, tricloro-1,2,2-trifluoroetano (freon 113)⁽⁴⁰⁾ en el análisis de compuestos más volátiles. Para compuestos volátiles y semivolátiles se ha empleado diclorometano y cloroformo obteniendo buenos resultados en tequila^(6, 25) y en vino⁽⁴¹⁾.

La extracción de compuestos volátiles y semivolátiles presentes en plantas y sus derivados (bebidas fermentadas y destiladas) ha empleado diferentes técnicas como: extracción con disolventes o extracción líquido-líquido^(29, 30), destilación a presión reducida, extracción por head-space, extracción empleando membranas o adsorbentes (extracción y microextracción en fase sólida)^(30, 31, 32, 33), y extracción con fluidos supercríticos⁽³⁴⁾. Estos son métodos que permiten analizar compuestos como los aceites esenciales que se encuentran en muy baja concentración.

Para el análisis de los compuestos extraídos por las técnicas anteriores, regularmente se emplea la cromatografía de gases como método de separación de los compuestos de interés (analitos) y su identificación se realiza por diversos métodos usando los tiempos de retención de los analitos y un detector de ionización de flama, o el sistema acoplado a un espectrómetro de masas.

3.4.1.1 Extracción líquido-líquido (ELL)

La extracción líquido-líquido es uno de los métodos más utilizados en el aislamiento de compuestos orgánicos de muestras acuosas. Se ha empleado en el pasado como referencia para validar otros procedimientos analíticos. Los compuestos orgánicos son transferidos por agitación en un embudo de separación desde una fase líquida a otra inmiscible o parcialmente inmiscible. La separación está basada en el principio de que los analitos orgánicos se distribuyen entre las fases de acuerdo a sus solubilidades relativas y los disolventes empleados⁽³⁶⁾.

No existe un disolvente universal, sin embargo dentro de los más empleados se tienen disolventes no polares como: pentano, hexano, metilciclohexano, isooctano, tolueno, dietil-éter; de polaridad intermedia como: cloroformo, diclorometano y polares como: etanol, metanol. La mayoría de los compuestos orgánicos son más solubles en disolventes orgánicos que en agua, con excepción de compuestos de bajo peso molecular con uno o más grupos polares los cuales son solvatados a través de enlaces de hidrógeno ⁽³⁷⁾.

La ELL se ha probado como un método efectivo en concentrar los analitos de grandes volúmenes de muestras dentro de un pequeño volumen de disolvente, presentando una alta sensibilidad en el método. La ELL es aún un método comúnmente empleado, sin embargo, presenta algunos inconvenientes como ser un procedimiento que requiere un paso tedioso de extracción, el cual no puede ser completamente automatizado, requiriendo la intervención de un analista. Se requiere el empleo de grandes cantidades de disolventes de alta pureza y alto costo, cuyo manejo implica un riesgo, debido a su elevada toxicidad y la presencia de residuos peligrosos. Existe un riesgo de contaminación y pérdida de disolventes por evaporación durante la extracción, por lo tanto se requiere de un cuidado meticuloso del proceso aunado a un buen control de calidad. En ocasiones es necesario un paso de concentración después de la extracción, además de que las sustancias extremadamente solubles en agua son difíciles de extraer ⁽³⁷⁾. Se ha empleado ELL para extraer compuestos como aminas, ácidos orgánicos volátiles y no volátiles, los cuales fueron identificados por un análisis subsiguiente de los extractos por cromatografía de gases ⁽³⁷⁾.

3.4.1.2 Microextracción en fase sólida (MEFS)

La microextracción en fase sólida es una técnica desarrollada por Pawliszyn y colaboradores en 1990 y fue propuesta como un método rápido de extracción de compuestos orgánicos volátiles de muestras líquidas, libre de disolventes. Esta técnica emplea una fibra de sílice fundida que es recubierta en su exterior por una fase estacionaria o adsorbente en la mayoría de los casos polimérico ^(33, 35). El analito en la muestra es directamente extraído y concentrado en la fase estacionaria, y después es desorbido por temperatura en el inyector de un cromatógrafo de gases o mediante el empleo de un disolvente en una cámara especial de desorción previo a su análisis por cromatografía de líquidos ⁽³⁵⁾. Esta técnica se emplea para extraer compuestos orgánicos volátiles y semivolátiles de muestras acuosas, generalmente ambientales, biológicas y alimentos, aunque es útil también en muestras sólidas y gaseosas. Las aplicaciones de MEFS se han enfocado en la extracción de compuestos orgánicos volátiles y semivolátiles de varias matrices tales como agua, aire y suelos.

El principio en el que se basa la MEFS es la partición de los analitos entre la matriz de la muestra y el recubrimiento de la fibra, el transporte de los analitos desde la matriz de la muestra hasta la fibra comienza en el

momento en que la fibra entra en contacto con la muestra y la extracción termina cuando la concentración de analito ha alcanzado el equilibrio de distribución entre la fibra y la muestra.

El dispositivo para MEFS consiste de un contenedor de fibra similar a una jeringa, conteniendo una barra de acero inoxidable semejante a una aguja dentro de la cual esta insertada la fibra de sílice fundida, la cual puede ser expuesta o retraída dentro de la aguja por medio de un émbolo (Fig. 16).

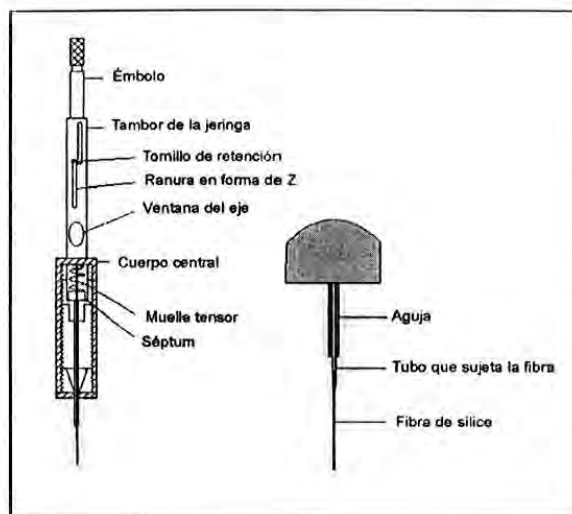


Fig. 16. Dispositivo para MEFS ⁽³³⁾

La aguja esta diseñada para reutilizarse reemplazando la fibra. La fibra de sílice fundida es recubierta con una capa relativamente delgada de alguna de las fases estacionarias poliméricas, la cual concentra los analitos orgánicos durante la adsorción o absorción desde la matriz de la muestra. La fibra por sí misma es químicamente inerte y muy estable aún a alta temperatura.

Existen 7 tipos de fibras disponibles comercialmente, con diferentes espesores de la fase estacionaria, éstas son: polidimetilsiloxano (PDMS), poliacrilato (PA), polidimetilsiloxano/divinilbenceno (PDMS/DVB), polietilenglicol/divinilbenceno (CW/DVB), polietilenglicol/resina (CW/TPR), y carbón activado/polidimetilsiloxano (CA/PDMS). La fase estacionaria puede estar químicamente unida a la fibra de sílice fundida y adicionalmente diferentes fases pueden entrecruzarse mediante enlace parcialmente cruzado o enlace altamente cruzado. Las ventajas de estas fases en MEFS son similares a las obtenidas como fases estacionarias en CGC ⁽³³⁾. La Fig. 17 esquematiza las propiedades de polaridad y retención de cada fase.

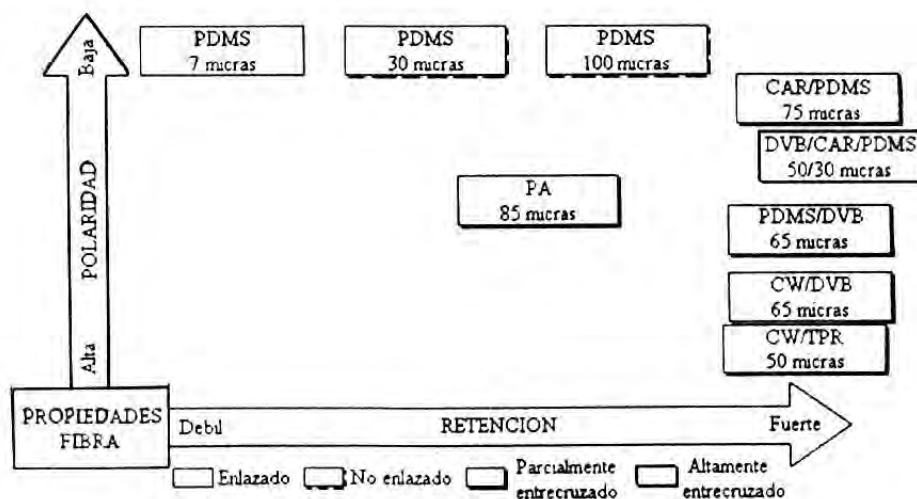


Fig. 17. Propiedades de Fibras para MEFS disponibles comercialmente. ⁽³⁵⁾

3.4.1.2.1 Procedimiento

La muestra se coloca dentro en un vial el cual se sella con un septum y un tapón de rosca horadado. La fibra deberá limpiarse previo al análisis para remover contaminantes que interfieren con los analitos de interés, esto se realiza por acondicionamiento en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases de acuerdo a las indicaciones del proveedor. La aguja que contiene la fibra en su interior se inserta en el septum extendiéndose posteriormente la fibra a través de la aguja hasta su exposición con la muestra, entonces se presenta el reparto de los analitos desde la matriz de la muestra hacia la fase estacionaria de la fibra (Fig. 18) ⁽³⁵⁾.

Aunque la MEFS tiene un máximo de sensibilidad en el equilibrio de partición de los analitos, se obtiene una relación proporcional entre la cantidad de los analitos adsorbidos por la fibra y su concentración inicial en la matriz de la muestra antes de alcanzar el equilibrio de partición. Por lo tanto el equilibrio completo no es necesario para el análisis cuantitativo por MEFS. Existen 2 modos de empleo de la MEFS para extraer los analitos: headspace (MEFS-HS) o inmersión directa (ID-MEFS). En el modo MEFS-HS la fibra se expone en la fase vapor o espacio de cabeza que existe sobre una muestra sólida, líquida o gaseosa. En el modo ID-MEFS la fibra se sumerge directamente en muestras líquidas.

La agitación de la muestra se realiza frecuentemente empleando una pequeña barra magnética para incrementar la velocidad para llegar al equilibrio. Después de un tiempo adecuado de extracción, la fibra se retrae dentro de la aguja y ésta se remueve del septum e inserta directamente en el puerto de inyección de un CG o dentro de la cámara de desorción de la interfase MEFS-HPLC. La desorción del analito desde la cubierta de la fibra se realiza por calentamiento de ésta en el puerto de inyección del CG o por dilución con disolvente dentro de la cámara de

desorción de la interfase MEFS-HPLC, donde los analitos son transferidos directamente a la columna cromatográfica para su análisis.

Para el análisis de compuestos volátiles en muestras con matrices complejas, el modo MEFS-HS es más adecuado debido a que la fibra no está en contacto directo con la muestra y por lo tanto prolonga su tiempo de vida. En el caso de inmersión de la fibra su deterioro se ocasiona por la influencia de adición de sales con saturación, pH de la solución o la presencia de compuestos en una matriz compleja. Otro problema se causa por la relativamente alta concentración de etanol u otros compuestos en muestras tales como bebidas alcohólicas, los cuales interfieren en la extracción de los analitos. Los compuestos de alto peso molecular como las proteínas pueden adsorberse de manera irreversible en la fibra cambiando las propiedades de la fase estacionaria y haciéndola inutilizable.

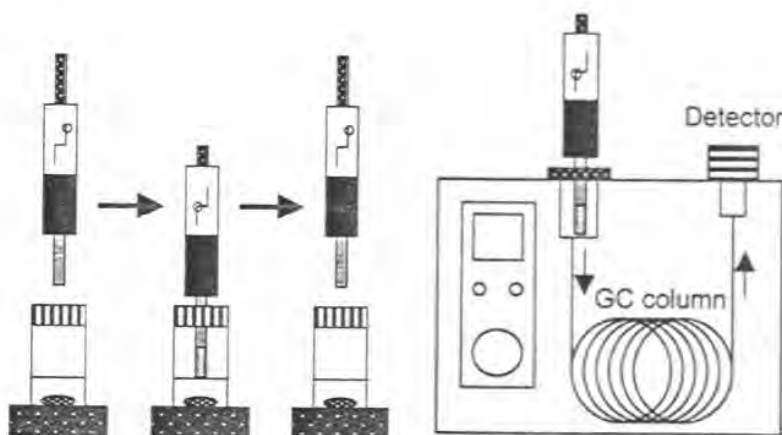


Fig. 18. Procedimiento de MEFS-HS ⁽³⁵⁾

3.4.1.2.2 Optimización

La técnica más adecuada de extracción por MEFS deberá seleccionarse considerando la naturaleza de la matriz en la muestra y de los analitos de interés a extraer, la selección de fibra para la extracción y la selección de los parámetros de microextracción como son: agitación de la muestra, fuerza iónica de la solución, tiempo y temperatura de extracción, que permitan la mayor extracción de los compuestos de interés. Por ejemplo, la técnica de MEFS en combinación con CG-EM es inadecuada para la extracción de compuestos menos volátiles o térmicamente lábiles, sin embargo, MEFS combinada con HPLC resulta más adecuada para éstos compuestos⁽³⁵⁾.

3.4.1.2.3 Selección de la fibra

La afinidad del analito por la fibra depende de las interacciones moleculares entre el analito y la fibra, y las distintas fases estacionarias que recubren las fibras, por tener diferentes propiedades y espesores se seleccionan

de acuerdo a los diferentes compuestos que se desean extraer. Polidimetilsiloxano (PDMS) se prefiere para la extracción de analitos no polares, sin embargo se puede aplicar a compuestos más polares si se optimizan las condiciones de extracción, además ésta fibra es capaz de resistir altas temperaturas en el inyector, por arriba de 300 °C. En general, los compuestos volátiles requieren una cubierta de polímero gruesa, mientras que una cubierta delgada es efectiva para compuestos semivolátiles. Por otro lado, fibras cubiertas con películas más gruesas requieren mayor tiempo para alcanzar el equilibrio de extracción, pero proveen mayor sensibilidad debido a la mayor masa de analitos que se pueden extraer. Una fibra polar como la de poliacrilato (PA), es adecuada para la extracción de analitos más polares como fenoles y alcoholes. Fibras con fases estacionarias mixtas que contienen copolímeros de divinilbenceno (DVB), resina (TPR), o carboxen (CAR: soporte poroso de carbón activado), incrementan la capacidad de retención debido al efecto potencial de adsorción y distribución hacia la fase estacionaria. PDMS/DVB, CAR/DVB, Carbowax (CW: polietilenglicol)/DVB y CW/TPR pueden emplearse para la extracción de analitos polares de bajo peso molecular. La fibra CAR/PDMS muestra mejor eficiencia de extracción que una fibra PDMS de 100 µm de espesor, pero su repetibilidad es más pobre y consume mayor tiempo para alcanzar el equilibrio⁽³⁵⁾.

3.4.1.2.4 Optimización de la extracción

En MEFS la cantidad de analitos extraídos en la fibra depende no sólo de la polaridad y espesor de la fase estacionaria, sino también del tiempo de extracción y la concentración de analitos en la muestra. Ésta extracción se mejora por agitación de la muestra, adición de sal, cambio del pH y variación de la temperatura. El tiempo de extracción está principalmente determinado por la velocidad de agitación y el coeficiente de partición del analito entre la cubierta de la fibra y la matriz de la muestra. La MEFS tiene la máxima sensibilidad si se alcanzan las condiciones de equilibrio, sin embargo, el total equilibrio no es necesario para un análisis preciso y exacto por MEFS debido a la relación lineal entre la cantidad de analito adsorbido por la fibra y su concentración inicial en la matriz de la muestra en condiciones de no equilibrio. En tales casos, el tiempo de extracción y las condiciones de transferencia de masa deben combinarse cuidadosamente⁽³⁵⁾.

La agitación magnética se utiliza ampliamente porque acelera la transferencia de analitos desde la matriz de la muestra hacia la cubierta de la fibra. El tiempo de equilibrio progresivamente decrece con el incremento en la velocidad de agitación; sin embargo, debe evitarse una agitación incontrolable ya que podría causar baja reproducibilidad en este tiempo de equilibrio.

La eficiencia de la extracción también se mejora por la adición de sales solubles a la muestra, generalmente se emplea cloruro de sodio, carbonato de sodio, carbonato de potasio y sulfato de amonio. La adición de sales propicia la extracción de analitos sobre la fibra debido al efecto salino (“salting-out”) el cual produce un cambio

en la fuerza iónica de la solución favoreciendo la extracción de los compuestos. La adición de sales se prefiere en el modo MEFS-HS, ya que si se emplea por inmersión en la solución de la muestra y la fibra tiene contacto con soluciones de alta fuerza iónica o valores de pH extremos, se acelera el deterioro de la fibra.

Para incrementar la concentración de analitos en la fase gaseosa en el modo MEFS-HS, usualmente se calienta la muestra. Un incremento en la temperatura de extracción causa un incremento en la velocidad de extracción y simultáneamente un efecto sobre las constantes de distribución que dependen del analito y del intervalo de temperatura en que se esté trabajando. Por lo tanto una adecuada temperatura provee mayor sensibilidad y velocidad de extracción de los analitos.

Para un análisis con mayor exactitud y precisión, se requiere un tiempo de extracción consistente, así como el empleo del mismo tamaño de vial y volumen de la muestra durante todo el análisis.

3.4.1.2.5 Optimización de la desorción

La desorción térmica eficiente de un analito en el puerto de inyección de un CG depende de su volatilidad, del espesor de la cubierta de la fibra, de la profundidad de la inyección, de la temperatura del inyector y tiempo de exposición. Se requiere un inyector de CG con un inserto de calibre angosto para asegurar alto flujo lineal y exponer la fibra inmediatamente después de que la aguja se introduzca dentro del inserto. La profundidad de exposición de la aguja deberá ajustarse para colocar la fibra en el centro de la zona caliente del inyector. Los inyectores split/splitless deben operarse en el modo splitless. Generalmente la temperatura óptima de desorción es aproximadamente igual al punto de ebullición del analito menos volátil. Para prevenir el ensanchamiento de los picos en el cromatograma, la temperatura inicial de la columna del CG se deberá mantener baja, o aún enfriada (crioenfoque), logrando así la concentración de los analitos en la cabeza de la columna. El tiempo de desorción depende de la temperatura del inyector y de la velocidad de flujo lineal alrededor de la fibra⁽³⁵⁾.

3.4.1.3 Aplicación de MEFS-HS en bebidas alcohólicas

Se han identificado alrededor de 1000 compuestos causantes del aroma en vinos⁽³⁵⁾, la mayoría de éstos compuestos se originan de la uva y son formados durante la pre y post-fermentación. El aroma de los vinos contiene compuestos como hidrocarburos, terpenos, alcoholes, ésteres, aldehídos y ácidos que presentan un amplio intervalo de polaridad y volatilidad. A pesar de que algunos compuestos están presentes en mayor concentración (del orden de centenas de mg/L), la mayoría se encuentran en niveles de µg/L o ng/L. Por lo tanto es necesaria la extracción y concentración de los analitos antes del análisis en el CG-EM.

Los patrones aromáticos son útiles para la clasificación química de variedades de vinos. En trabajos previos⁽⁴²⁾ se analizaron los componentes del bouquet del vino usando MEFS con inmersión directa (ID-MEFS) de la fibra en la muestra y MEFS en modo headspace o espacio de cabeza (MEFS-HS) acoplada a CG-EM empleando la fibra de PA. Se alcanzó un perfil completo del bouquet del vino, y MEFS-HS proporcionó algunas ventajas esenciales como mayor tiempo de vida de la fibra y mayor sensibilidad para extracción de terpenos en comparación con ID-MEFS. Los resultados obtenidos por estos métodos son adecuados para comparar y optimizar condiciones de fermentación y pueden ser correlacionados a una evaluación sensorial⁽³⁵⁾.

En el análisis de tequila blanco, reposado y añejo, se ha empleado microextracción en fase sólida y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas para caracterizar y cuantificar compuestos volátiles del tequila⁽⁴³⁾, considerando algunos factores importantes en el análisis por MEFS como tipo de muestreo, tipo de fibra y tiempo de exposición de la fibra en el espacio de cabeza, los cuales fueron determinantes en el análisis cualitativo y cuantitativo del perfil de volátiles en esta bebida. La extracción de los compuestos se realizó por inmersión directa de la fibra de Polidimetilsiloxano (PDMS) en 40 mL de tequila mantenido a 40 °C, la fibra fue sumergida en la muestra durante 60 min y desorbida durante 5 min dentro del cromatógrafo de gases. Los compuestos volátiles identificados fueron principalmente alcoholes, ésteres y cetonas y se cuantificaron etil ésteres por considerarse que mostraban marcadas diferencias en el perfil de diferentes tipos de tequila (blanco, reposado, añejo y extra-añejo), éstos compuestos se encontraron dentro del intervalo de 0.27-15.03 µg/mL, reportando coeficientes de variación menores a 10% lo que indica que la técnica fue reproducible.

Los métodos cromatográficos se han empleado frecuentemente en el análisis de bebidas alcohólicas ya que siempre se ha relacionado la calidad con sus características sensoriales proporcionadas por su aroma y sabor. Numerosos estudios de investigación en este rubro emplean la cromatografía de gases acoplada a un detector de masas para la identificación y cuantificación de los compuestos volátiles involucrados en el aroma y sabor de bebidas alcohólicas. La cromatografía de gases-espectrometría de masas es probablemente la técnica analítica más completa empleada en el análisis de aromas y sabores en alimentos.

3.5 Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas

La cromatografía de gases – espectrometría de masas (CG-EM) es la técnica analítica más ampliamente usada para el análisis de mezclas complejas. El poder de esta metodología reside en la unión de dos poderosas técnicas dentro de un sistema acoplado. La cromatografía de gases (CG) se emplea para separar los componentes de una mezcla basada en sus diferentes afinidades por la fase estacionaria en la columna. La espectrometría de masas (MS) se emplea no sólo para detectar y cuantificar las diferentes especies que eluyen de la columna sino que además provee información definitiva sobre su identidad.

El equipo más simple de CG-EM emplea un cromatógrafo de gases con un inyector split/splitless, una columna capilar y una trampa cuadrupolar o ion cuadrupolar como analizador de masas. Se requiere un alto grado de automatización y un sistema de control de los datos generados (tiempo, relación masa/carga e intensidad). La muestra conteniendo los analitos de interés se introduce en el puerto de inyección del CG para su análisis subsiguiente por CG-EM. En algunos casos la muestra requiere algún tratamiento o derivatización previo a su inyección en el CG. El análisis de compuestos orgánicos presentes en muestras acuosas y muestras sólidas, usualmente ha requerido de técnicas de extracción laboriosas como extracción líquido-líquido o extracción por Soxhlet previo al análisis por CG-EM, sin embargo, la MEFS técnica que permite extraer y concentrar los analitos de interés en la fibra y directamente inyectar el extracto en el CG, resulta un procedimiento adecuado de preparación de muestra para el análisis por CG-EM (Fig. 19).⁽⁴⁷⁾

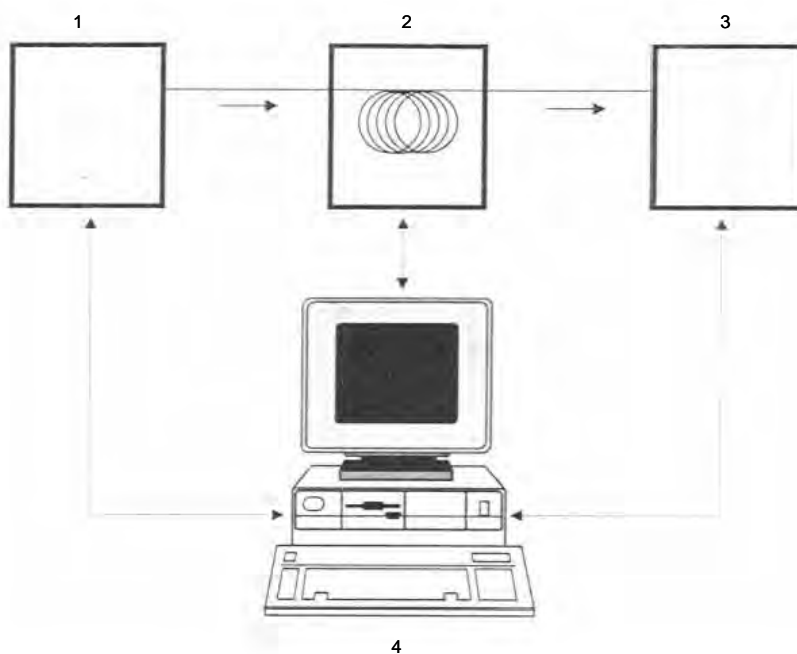


Fig. 19 Sistema de análisis por CG-EM. 1. Introducción de muestra, 2. Cromatógrafo de gases, 3. Espectrómetro de masas, 4. Control y análisis de datos

Las principales ventajas de la cromatografía de gases son: análisis rápido (minutos) y eficiente ya que provee alta resolución, es sensible pues detecta fácilmente ppm y ppb, es un método de análisis no destructivo de la muestra haciendo posible el acoplamiento al espectrómetro de masas, es muy preciso en análisis cuantitativo, requiere pequeñas cantidades de muestra (del orden de μL), es reproducible y relativamente simple.

La cromatografía de gases está limitada a muestras volátiles y no es adecuada para muestras termolábiles y grandes muestras preparativas. Usualmente emplea espectrometría de masas para la confirmación de la identidad del pico cromatográfico, ya que una de las desventajas de la cromatografía de gases es que no se puede confirmar la identidad o estructura de las señales cromatográficas. Los tiempos de retención de los analitos están relacionados con el coeficiente de partición, este tiempo es característico pero no es único o específico de cada compuesto. Por lo tanto, los datos del cromatógrafo de gases (CG) por sí solos no proporcionan información contundente, ya que no dan certeza sobre la identificación de los compuestos. ⁽⁴⁴⁾

En el análisis de aromas la espectrometría de masas es uno de los métodos efectivos más poderosos en términos de identificación. Junto con la cromatografía de gases provee información cualitativa y cuantitativa sobre el aroma de una matriz compleja. El efluente que sale de la columna del CG es primero ionizado por un bombardeo de electrones para formar los iones fragmento y entonces el espectrómetro de masas (EM) selectivamente permite a los fragmentos de una cierta relación masa/carga (m/z) ser analizados. ⁽⁴⁵⁾ El espectro de masas obtenido es característico del analito. Para la identificación, los datos del espectro de cada compuesto desconocido son analizados comparándolos con los espectros de una base de datos de compuestos conocidos. El espectro de masas de un compuesto individual es único. Sin embargo, cierta clase de compuestos exhiben algunos espectros comunes, características útiles en la diferenciación de la identidad. La estructura de un espectro resulta de la fragmentación de una molécula la cual la caracteriza a ella misma y la diferencia de otras moléculas y de otros grupos de compuestos. Dentro de los constituyentes del aroma y sabor se encuentran aldehídos, cetonas, alcoholes y ácidos hasta compuestos heterocíclicos los cuales exhiben sus propios patrones de fragmentación característicos ⁽⁴⁶⁾.

CG-EM es tal vez la metodología más exitosa de las técnicas acopladas, CG separa los compuestos sobre la base de sus diferentes afinidades por la fase estacionaria, EM registra el proceso de separación en tiempo, relación masa/carga e intensidad. La identificación de los compuestos individuales es usualmente alcanzada a través de la comparación de un tiempo de retención relacionado con un estándar conocido y un espectro de masas obtenido experimentalmente por impacto electrónico (EI) comparado contra el espectro de masas de una biblioteca como la biblioteca NIST (Nacional Institute of Standard and Technology). La cuantificación es obtenida por relacionar la respuesta del ion seleccionado de la muestra a aquella de un estándar de concentración conocida.

La metodología CG-EM requiere que los compuestos de interés sean adecuados para el análisis por CG: peso molecular relativamente bajo, no lábil, térmicamente estable, razonablemente volátil o derivatizable. La sensibilidad de los detectores de masas es casi comparable o mejor que muchos otros detectores de CG, con la notable excepción del detector de captura de electrones. Esta técnica es muy sensible ya que alcanza límites de

detección del orden de picogramos, puede ser altamente selectiva y adecuada por la flexibilidad con respecto al tipo y calidad de los datos del espectro de masas, el analista puede escoger entre varios modos de ionización y modos de lectura del espectro, el control del rango y resolución de masas, así como otros parámetros experimentales.

La selectividad en el análisis por CG-EM es sobresaliente ya que provee evidencia concluyente para la presencia de un compuesto debido a la combinación de la información proporcionada por el CG y la información estructural proveniente del EM. La selectividad y sensibilidad se pueden mejorar a través del uso de técnicas de ionización química selectiva y/o técnicas de monitoreo del ion selectivo (SIM). La técnica se considera madura, robusta y adecuada para una amplia variedad de aplicaciones ⁽⁴⁷⁾.

La CG-EM representa la técnica más poderosa y ampliamente usada para el análisis de mezclas complejas. Sus aplicaciones primarias incluyen el análisis de drogas, explosivos, productos del petróleo y contaminantes en aire, agua y suelos; su empleo abarca diversas áreas como química clínica, ciencia ambiental, análisis de alimentos y bebidas, ciencia forense y monitoreo industrial de proceso ⁽⁴⁷⁾. La CG-EM ha tenido gran aplicación en la separación, identificación y cuantificación de compuestos volátiles causantes del aroma y sabor de los alimentos y por lo tanto ha sido de gran importancia en el análisis de bebidas alcohólicas.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

- Desarrollar un método analítico para cuantificar los principales terpenos (linalol, 4-terpineol, α -terpineol, β -citronelol, eugenol, *cis*-nerolidol y *trans*, *trans*-farnesol) que se encuentran presentes en tequila 100% *Agave*.

4.2 Objetivos particulares

- Desarrollar un procedimiento para determinar terpenos en tequila 100% *Agave* utilizando microextracción en fase sólida acoplada a cromatografía de gases-espectrometría de masas (MEFS-CG-EM).
- Evaluar y aplicar un procedimiento de extracción líquido-líquido (ELL) desarrollado previamente en el laboratorio ⁽⁶⁾ para determinar terpenos en tequila 100% *Agave* por el análisis por cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM).
- Aplicar y comparar ambas metodologías para el análisis de terpenos en muestras comerciales de tequila 100% *Agave*.

5. Desarrollo experimental

5.1 Extracción de terpenos

La concentración de terpenos en la matriz de etanol-agua (38-40% etanol) del tequila, es muy baja y fue necesario realizar una extracción para concentrar los analitos antes del análisis cromatográfico. De los 28 terpenos identificados en el tequila en trabajos previos ⁽⁶⁾, se cuantificaron 7 (linalol, 4-terpineol, α -terpineol, β -citronelol, eugenol, *cis*-nerolidol y *trans*, *trans*-farnesol). Para la extracción y concentración de terpenos en tequila, se desarrolló la técnica de microextracción en fase sólida en modo headspace (MEFS-HS) y la selección de los parámetros: tipo de fibra, temperatura de extracción, adición de sal y tiempo de extracción. Se comparó la MEFS-HS con la técnica de extracción líquido-líquido (ELL) en la cual se empleó cloroformo como disolvente extractante (por presentar mayor extracción de estos compuestos como lo reportan trabajos previos ⁽⁶⁾). Se determinó la linealidad, precisión y los límites de detección en ambas metodologías. La cuantificación de los compuestos se realizó utilizando curvas de calibración relativas en cada una de las técnicas aplicadas.

5.1.1 Materiales y equipo

Balanza Analítica Ohaus, modelo AP250D

Parrilla con agitador magnético Bornstead-Thermolyne, modelo SPA 1025B

Jeringas Hamilton de 10, 50, 100 y 500 μ L.

Material de vidrio Pirex: pipetas volumétricas de 1, 2, 3, 4, 10 y 20 mL, matraz Erlenmeyer de 250 y 500 mL, Embudo de separación de 500 mL, probeta de 250 mL, matraz aforado de 2, 10, 50 y 100 mL. Viales de vidrio (11 mL de capacidad) con tapón horadado de polipropileno y septa de Teflón (politetrafluoretileno).

Fibras: Polidimetilsiloxano (PDMS, 100 μ m), Polidimetilsiloxano-divinilbenceno (PDMS/DVB, 65 μ m), Poliacrilato (PA, 65 μ m) y Carbowax- divinilbenceno (CW/DVB 65 μ m) y soporte de la fibra para inyección manual (Supelco, Bellafonte, PA. USA). Las fibras fueron acondicionadas de acuerdo a las indicaciones del proveedor (Tabla 6).

Tabla 6. Características de las fibras

Fibra	Espesor de la película (μ m)	Temperatura de Acondicionamiento ($^{\circ}$ C)	Tiempo de Acondicionamiento (hr)
CW/DVB	65	250	0.5
PDMS/DVB	65	260	0.5
PA	85	300	2.0
PDMS	100	250	1.0

5.1.2 Reactivos

Alcohol etílico absoluto anhidro y cloroformo ambos de 99.9% de pureza, cloruro de sodio, sulfato de sodio anhidro grado reactivo (J.T.Baker. Cd. México) y bicarbonato de sodio (grado técnico, Carlo Erba. Cd. México).

5.1.3 Estándares

Estándares (pureza > 97%): p-cimeno, linalol, 4-terpineol, α -terpineol, eugenol, β -citronelol, *cis*-nerolidol y *trans*, *trans*-farnesol (Fluka Chemika, Sigma-Aldrich Suiza).

Las disoluciones estándar de cada terpeno se prepararon pesando con exactitud y por separado aproximadamente 10 mg de cada compuesto, se disolvieron y aforaron con etanol a un volumen final de 10 mL obteniendo disoluciones concentradas de aproximadamente 1000 ppm. Se almacenaron a 4 °C, en viales de vidrio ámbar con tapón de rosca y septa sellados con teflón, para su uso posterior.

5.1.4 Muestras

Se analizaron 21 muestras de tequila 100% *Agave*: 18 tequilas reposados, 2 tequilas blancos y un tequila añejo, cuyas características indicadas en el marbete se presentan en la Tabla 7.

Tabla 7. Muestras de Tequila

Muestra	Tipo 100% <i>Agave</i>	Región Geográfica	Alcohol %
1	reposado	Tequila, Jalisco	38
2	reposado	Arenal, Jalisco	38
3	reposado	Tequila, Jalisco	38
4	reposado	Tequila, Jalisco	35
5	reposado	Guadalajara, Jalisco	40
6	reposado	San Juanito de Escobedo, Jalisco	38
7	reposado	El Salto, Jalisco	40
8	reposado	Amatitlán, Jalisco	40
9	reposado	Atotonilco El Alto, Jalisco	38
A10	añejo	Zapotlanejo, Jalisco	38
11	reposado	Guadalajara, Jalisco	35
12	reposado	Amatitlán, Jalisco	38
13	reposado	Tequila, Jalisco	38
B14	blanco	Amatitlán, Jalisco	40
15	reposado	Tequila, Jalisco	40
16	reposado	Tequila, Jalisco	40

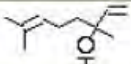
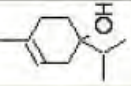
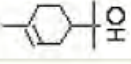


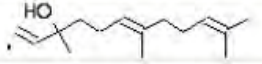
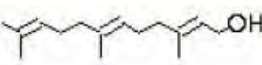
17	reposado	La Laja, Jalisco	35
18	reposado	Atotonilco El Alto, Jalisco	38
19	reposado	Acatic, Jalisco	35
20	reposado	Tototlán Jalisco	38
B21	blanco	Atotonilco El Alto, Jalisco	38

A= añejo, B= blanco

5.1.5 Terpenos

La estructura de los terpenos estudiados así como el ion fragmento utilizado para la cuantificación de cada compuesto se presenta en la Tabla 8.

Tabla 8. Terpenos analizados

Terpeno	Estructura Química	Peso Molecular (uma)	Ion fragmento m/z
linalol (monoterpeno)		154	71
4-terpineol (monoterpeno)		154	71
α -terpineol (monoterpeno)		154	59
β -citronelol (monoterpeno)		156	69
eugenol (monoterpeno)		164	164
<i>cis</i> -nerolidol (sesquiterpeno)		222	69
<i>trans, trans</i> -farnesol (sesquiterpeno)		222	69

5.2 Análisis cromatográfico

5.2.1 Condiciones cromatográficas

Se utilizó un Cromatógrafo de Gases con inyector split/splitless (6890N Agilent Technologies) acoplado a un Detector Selectivo de Masas (5973 Agilent Technologies) y una columna capilar de sílice fundida, 5% difenil 95% polidimetilsiloxano de 30.0 m de longitud x 250 μ m de diámetro interno x 0.25 μ m grosor de película

(Zebron Phenomenex), USA 7HG-6002-11. Temperatura del inyector: 250 °C, en modo “splitless” (1min). Programa de Temperatura: Temperatura inicial 40 °C isotérmicamente durante 1 min, rampa de 5 °C/min, hasta 210 °C y rampa de 10 °C/min, hasta 280 °C, durante 5 min. Gas acarreador He con un flujo constante de 1 mL/min. La temperatura de la línea de transferencia fue de 280 °C, la temperatura de la fuente de ionización fue de 230 °C y la temperatura del analizador (cuadrupolar) de 150 °C. Los análisis se realizaron por impacto electrónico a 70 eV, se utilizó el modo de barrido total del espectro (scan) de 50 a 550 m/z para la identificación y extracción de iones para la cuantificación.

5.2.2 Identificación de terpenos

Para la identificación de los terpenos en las muestras, se compararon los tiempos de retención y los espectros de masas con los obtenidos con los estándares, y con los espectros de masas de la base de datos (The NIST Mass Spectral Search Program for the NIST/EPA/NIH Mass Spectra library versión 2.0 build 19 Nov. 2001).

5.2.3 Cuantificación de terpenos

La cuantificación se realizó con base en la intensidad del ion fragmento seleccionado para cada terpeno utilizando curvas de calibración relativas (p-cimeno como estándar interno), (Anexo incisos 9.1 y 9.2).

5.3 Extracción líquido-líquido (ELL)

5.3.1 Procedimiento para el análisis por ELL-CG-EM.

Se transfirieron 30 mL de muestra fría (4 °C) a un embudo de separación de 500 mL y se adicionaron 300 mL de agua destilada fría (4 °C) y se extrajo con 6 mL de cloroformo conteniendo el estándar interno (5.0 µg/mL). Se agitó durante 1 min y se dejó reposar 5 min para que las fases se separaran. La fase orgánica se separó y se lavó 5 veces con 2 mL de disolución saturada de bicarbonato de sodio y 3 veces con 2 mL de agua destilada fría (4 °C), el extracto orgánico se filtró a través de sulfato de sodio anhidro y se inyectó 1.0 µL de este extracto en el CG-EM. Este procedimiento se ha empleado en trabajos previos para la identificación de terpenos en tequila ⁽⁶⁾. Las muestras se analizaron por triplicado.

5.3.2 Linealidad

Se prepararon disoluciones de etanol al 38% de los 7 terpenos en estudio a las siguientes concentraciones: 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 µg/mL. Se realizó la ELL para cada concentración transfiriendo 30 mL de disolución fría (4 °C) de etanol al 38% fortificada con la disolución estándar de terpenos correspondiente y 6 mL de cloroformo (conteniendo el estándar interno p-cimeno, 1.0 µg/L) y se siguió el procedimiento de extracción descrito en el inciso 5.3.1. Del extracto obtenido se inyectó 1.0 µL al CG-EM.

5.3.3 Precisión

Para calcular la precisión se preparó una disolución de etanol al 38% fortificada con los 7 terpenos a una concentración de 0.05 µg/mL. De esta disolución se realizaron 5 extractos independientes utilizando 6 mL de cloroformo (conteniendo el estándar interno a 1.5 µg/mL) y siguiendo el procedimiento descrito en el inciso 5.3.1. De cada extracto se inyectó 1.0 µL al CG-EM. Con los resultados obtenidos se calculó la desviación estándar (DE) y el coeficiente de variación (% CV) y los límites de detección (LD = 2 DE) y cuantificación (LQ = 10 DE).

5.4 Microextracción en fase sólida en modo headspace (MEFS-HS)

5.4.1 Selección de parámetros para MEFS-HS

La cantidad de analitos que pueden ser extraídos por MEFS-HS está determinada por la constante de equilibrio del analito entre la fase acuosa y la fase gas y por el coeficiente de partición del analito entre la fase gas y la fase polimérica de la fibra. Para optimizar la adsorción de los analitos sobre la fibra (colocada en el espacio de cabeza de la muestra) y por consiguiente las condiciones de extracción, se consideraron los factores que influyen en los equilibrios involucrados: tipo de fibra, temperatura de extracción, adición de sal y tiempo de extracción. La selección de parámetros para MEFS-HS se describe en el esquema de la Fig.20.

5.4.1.1 Selección de fibra

Se evaluaron 4 fibras de diferente polaridad: PA, PDMS, PDMS/DVB y CW/DVB utilizando una muestra de tequila como referencia. Cada una de las fibras se acondicionó de acuerdo a las indicaciones del proveedor (Tabla 6). La evaluación se realizó a dos diferentes temperaturas; 25 y 65 °C. La extracción se realizó transfiriendo 1.0 mL de muestra a un vial de 11 mL de capacidad y adicionando 4 mL de agua destilada y un agitador magnético, se selló con un tapón horadado de polipropileno con septa de Teflón y se dejó equilibrar la muestra durante 5 min. Después de este tiempo se bajó la fibra y se realizó la extracción durante 30 min. Posterior a la extracción se retiró la fibra y se desorbió en el inyector del CG-EM durante 10 min.

5.4.1.2 Influencia de la fuerza iónica en la extracción

Una vez evaluadas las 4 fibras (inciso 5.4.1.1) se seleccionaron, de acuerdo a los resultados, las fibras de PA y PDMS/DVB para estudiar la influencia de la fuerza iónica en la extracción. Se evaluó la adición de NaCl a la muestra en concentraciones equivalentes a 0, 50 y 100 % del valor de saturación, (de aquí en adelante al mencionar en el presente trabajo % de NaCl se referirá al % de saturación de NaCl a 25 °C). Este factor se estudió a 25 y 65 °C. Las condiciones de la extracción fueron las mismas que las descritas en el inciso 5.4.1.1.

5.4.1.3 Temperatura de extracción

De acuerdo a los resultados obtenidos de la selección de fibra (inciso 5.4.1.1) e influencia de la fuerza iónica (inciso 5.4.1.2), se eligió la fibra de PDMS/DVB y la adición de 100 % de saturación de NaCl (2.0 g) para realizar el estudio de la temperatura de extracción. Las temperaturas evaluadas para la extracción fueron 25, 35, 45, 65 y 75 °C.

5.4.1.4 Perfil de tiempo de extracción

Se determinó el perfil de tiempo de extracción utilizando la fibra PDMS/DVB, 100% NaCl y 25 °C. Los tiempos de extracción evaluados fueron: 5, 15, 30, 45 y 60 min.

5.4.2 Procedimiento para la MEFS-HS

El procedimiento seleccionado para realizar la MEFS-HS fue: fibra PDMS-DVB, adición de 100% de NaCl, agitación a 1200 rpm y extracción a 25 °C durante 30 min.

5.4.2.1 Linealidad

Una vez optimizada la técnica MEFS-HS, se prepararon disoluciones estándar en etanol al 38% fortificadas con los 7 terpenos de estudio en concentraciones de: 0.05, 0.075, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0 µg/mL y estándar interno (p-cimeno 0.7 µg/mL). Se tomó una alícuota de 1 mL de cada disolución y se diluyó con 4 mL de agua destilada, se colocaron en el vial y se procedió a realizar la microextracción de acuerdo a las condiciones mencionadas en el inciso 5.4.2.

5.4.2.2 Análisis de terpenos por MEFS-HS-CG-EM

Se tomó una alícuota de 1.0 mL de tequila conteniendo el estándar interno (0.7 µg/L) y se diluyó con 4 mL de agua destilada, en un vial de 11 mL con tapón horadado de polipropileno con septa de teflón, se adicionó 100 % de NaCl (2.0 g) y un agitador magnético (10 mm x 3 mm), se colocó en una parrilla de calentamiento y agitación manteniendo la muestra a 25 °C (baño María) y agitación de 1200 rpm. La muestra se mantuvo bajo estas condiciones durante 5 min antes de la extracción para establecer el equilibrio líquido-vapor, después se insertó la fibra dentro del vial en el espacio de cabeza y se extrajo durante 30 min, en seguida se retrajo la fibra dentro del dispositivo y se colocó en el inyector del CG-EM durante 10 min para la desorción. El análisis cromatográfico se efectuó de acuerdo a las condiciones descritas en el inciso 5.2.1. El análisis de las muestras se realizó por triplicado.

5.4.2.3 Precisión

Para calcular la precisión se preparó una disolución de etanol al 38% fortificada con los 7 terpenos a una concentración de 0.075 µg/mL y adicionada con el estándar interno (0.7 µg/mL), para la extracción se tomó una alícuota de 1.0 mL y se siguió el procedimiento descrito en el inciso 5.4.2.2 Se realizaron 3 extractos independientes y cada uno se inyectó 1.0 µL al CG-EM. Con los resultados obtenidos se calculó la desviación estándar (DE), el coeficiente de variación (% CV) y los límites de detección (LD = 2 DE) y cuantificación (LQ = 10 DE).

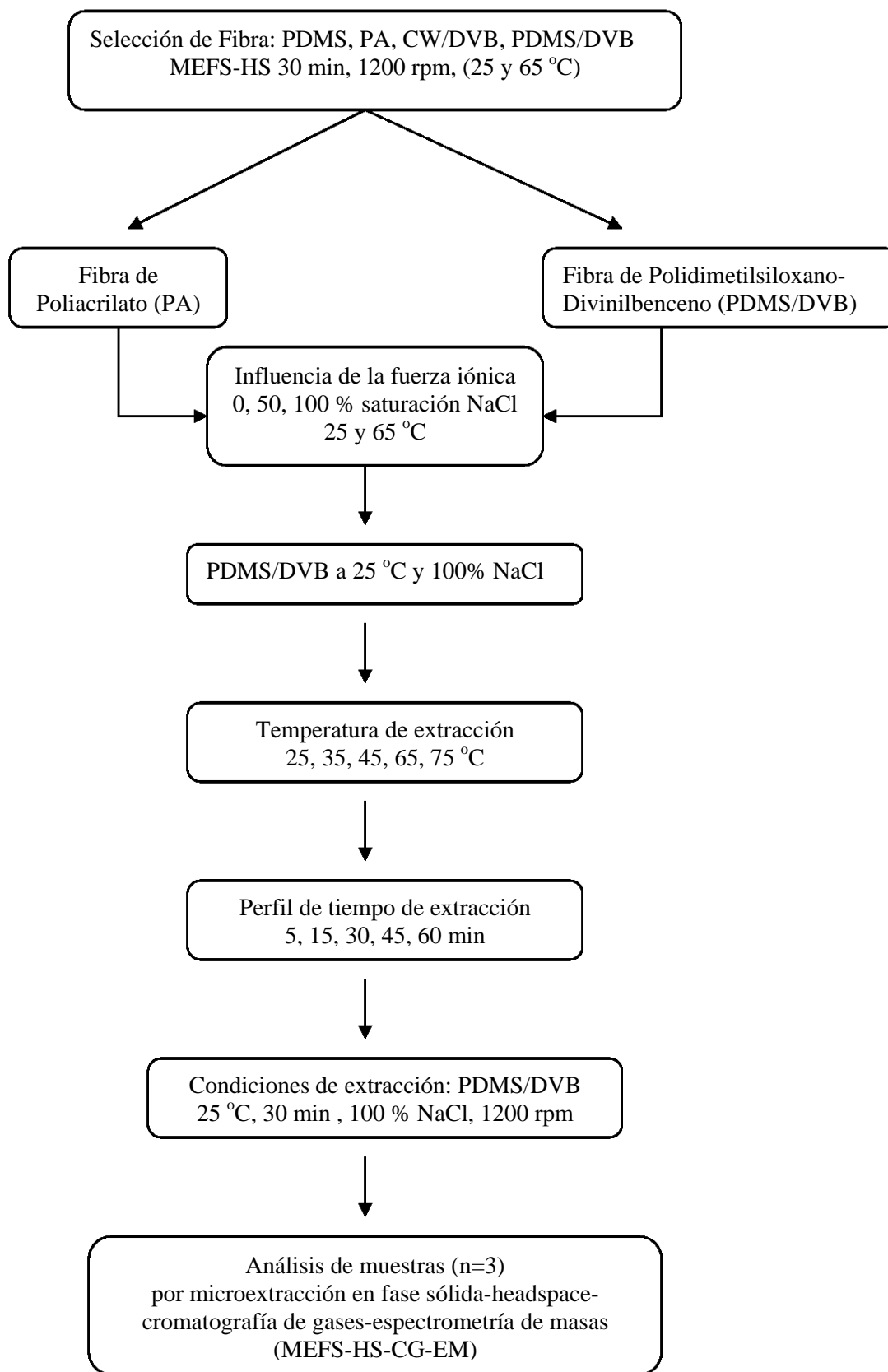


Fig. 20. Selección de parámetros para MEFS-HS

6. Resultados y análisis de resultados

6.1 Resultados y análisis de resultados por ELL-CG-EM

6.1.1 Linealidad

Considerando las condiciones del método de ELL-CG-EM descritas en el inciso 5.3.1, se procedió a evaluar la linealidad en el siguiente intervalo de concentración: 50, 100, 250, 500, 750, 1000 ng/mL. La linealidad fue aceptable para los terpenos en el intervalo estudiado (Tabla 9), obteniéndose un coeficiente de correlación $r > 0.990$ en todos los terpenos. (Anexo inciso 9.1).

Tabla 9. Linealidad del método ELL-CG-EM

Terpeno	r	Intervalo Lineal (ng/mL)
linalol	0.998	51 – 1033
4-terpineol	0.998	49 – 990
α -terpineol	0.998	50 – 1007
β -citronelol	0.998	50 – 1008
eugenol	0.997	50 – 1006
<i>cis</i> -nerolidol	0.998	49 – 991
<i>trans, trans</i> -farnesol	0.992	50 – 1002

6.1.2 Precisión

Se evaluó la precisión de acuerdo a las condiciones descritas en el inciso 5.3.3. La precisión obtenida expresada como coeficiente de variación (% CV) estuvo dentro del rango 3 - 9.8 % ($n = 5$) (Tabla 10).

Se calcularon el límite de detección ($LD = 2 DE$) y el límite de cuantificación ($LQ = 10 DE$) para cada uno de los terpenos obteniendo los valores que se reportan en la Tabla 10. Los valores obtenidos de LQ fueron menores a la concentración obtenida de los compuestos, lo cual permitió cuantificar sin problema los terpenos en las muestras de tequila.

Tabla 10. Precisión del método ELL-CG-EM

n = 5	Disolución estándar Terpenos	DE	CV	LD	LQ
Terpeno	ng/mL	ng/mL	%	ng/mL	ng/mL
linalol	51.6	2.47	4.79	4.9	24.7
4-terpineol	50.1	1.71	3.43	3.4	17.1
α -terpineol	53.4	2.38	4.46	4.7	23.8
β -citronelol	51.0	4.11	8.08	8.2	41.1
eugenol	50.3	3.37	6.71	6.7	33.7
<i>cis</i> -nerolidol	51.6	2.49	4.83	4.9	24.9
<i>trans, trans</i> -farnesol	50.1	4.95	9.88	9.9	49.5

6.1.3 Análisis de terpenos por ELL-CG-EM

La Fig. 21 presenta el análisis por ELL-CG-EM de la disolución estándar de terpenos. Se puede observar una buena resolución y eficiencia del sistema cromatográfico para todos los terpenos en un tiempo de análisis de 30 min.

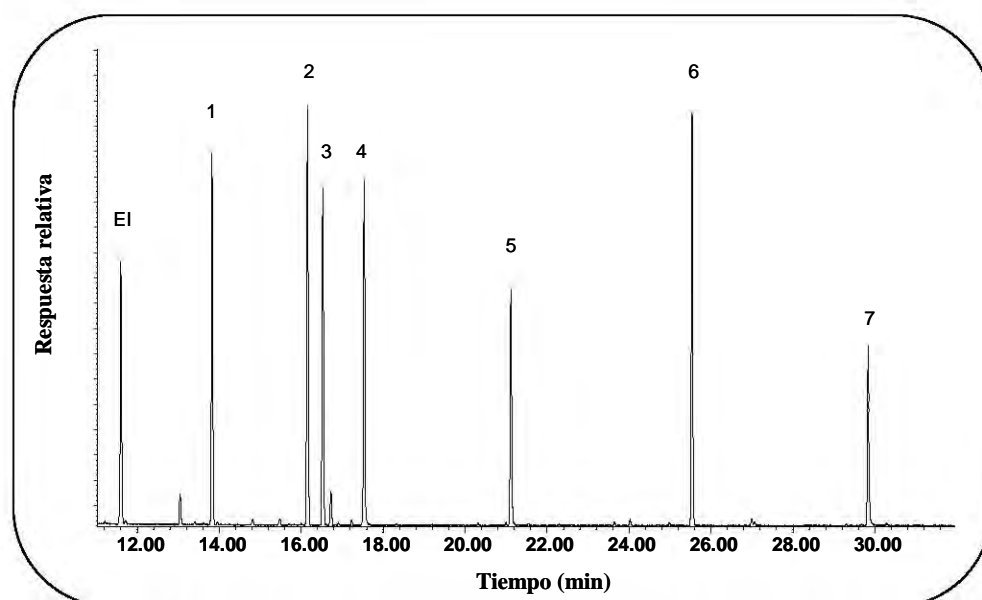


Fig. 21. Cromatograma iónico total del análisis por ELL-CG-EM de la disolución estándar de terpenos. 1. linalol; 2. 4-terpineol; 3. α -terpineol; 4. β -citronelol; 5. eugenol; 6. *trans*-nerolidol; 7. *trans, trans*-farnesol; E I p-cimeno. Condiciones cromatográficas descritas en el inciso 5.2.1

La Tabla 11 muestra el intervalo de concentración de cada terpeno que presentaron los tequilas analizados. El α -terpineol fue el de mayor concentración en todas las muestras y el 4-terpineol el de menor. La concentración de terpenos en tequila fue muy diferente en las muestras evaluadas, observando bajas concentraciones como 49 ng/mL para 4-terpineol hasta concentraciones muy altas de 1814 ng/mL para α -terpineol.

Tabla 11. Intervalo de concentración de terpenos en tequilas por ELL-CG-EM

Terpeno	Conc. mínima ng/mL	Conc. máxima ng/mL
linalol	143	777
4-terpineol	49	206
α -terpineol	422	1814
β -citronelol	177	488
eugenol	257	408
<i>trans</i> -nerolidol	216	456
<i>trans, trans</i> -farnesol	439	684

La Fig. 22 muestra el cromatograma del análisis por ELL-CG-EM de una muestra de tequila reposado en el cual se observan los picos correspondientes a los 7 terpenos en estudio presentando buena resolución y eficiencia en la separación en un tiempo de análisis de 30 min. En las muestras de tequila no se identifica el *cis*-nerolidol sin embargo, se detecta el isómero *trans*-nerolidol (tr = 26.9 min) cuya identidad se confirma con una certeza del 90% utilizando los espectros de la base de datos de la biblioteca NIST.

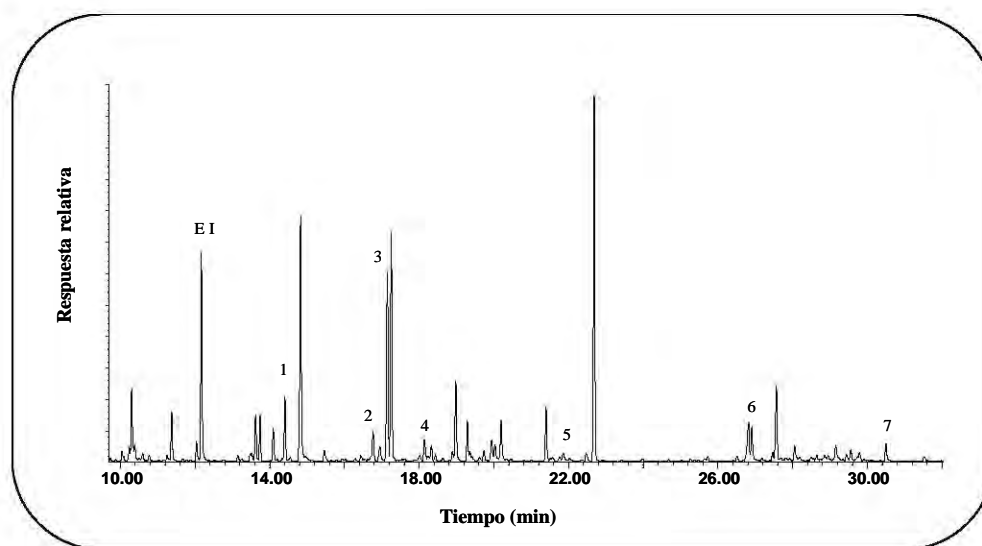


Fig. 22. Cromatograma iónico total del análisis por ELL-CG-EM de tequila reposado 16. 1. linalol; 2. 4-terpineol; 3. α -terpineol; 4. β -citronelol; 5. eugenol; 6. *trans*-nerolidol; 7. *trans, trans*-farnesol; E I p-cimeno. Condiciones cromatográficas descritas en el inciso 5.2.1

La Fig. 23 presenta el perfil de terpenos obtenido para las muestras de tequila analizadas mostrando que el α -terpineol es el de mayor concentración en 19 de los 21 tequilas analizadas y el 4-terpineol el de menor concentración en todas las muestras, (Anexo inciso 9.5).

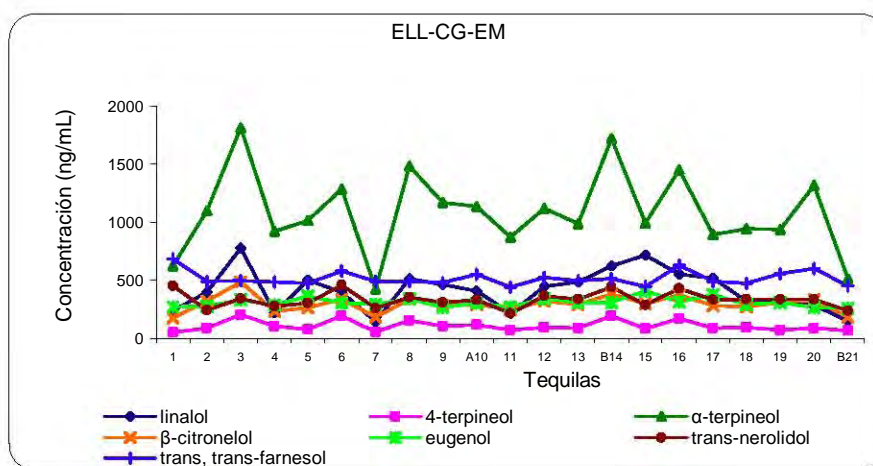


Fig. 23. Perfil de terpenos en muestras de tequila 100% Agave

En la Fig. 24 se observa que 12 muestras de tequila, incluyendo el tequila blanco B21 y el añejo A10 presentaron un perfil de terpenos similar, siendo el orden el siguiente: α -terpineol, *trans, trans*-farnesol y linalol, como terpenos en mayor concentración; eugenol, β -citronelol y *trans*-nerolidol en baja concentración; y 4-terpineol el compuesto en menor concentración. 7 muestras de tequila incluyendo el tequila blanco B14 presentaron el perfil siguiente: α -terpineol, linalol y *trans-trans*-farnesol como terpenos mayoritarios, en seguida *trans*-nerolidol, eugenol, β -citronelol y 4-terpineol el de menor concentración. Sin embargo, la muestra 1 presentó un perfil diferente siendo en este caso el *trans, trans*-farnesol muy semejante en cantidad al α -terpineol, después *trans*-nerolidol, eugenol, linalol, β -citronelol y 4-terpineol, (Fig. 24), la muestra 7 al igual que la muestra 1, presentó una concentración de *trans, trans*-farnesol ligeramente mayor al α -terpineol, siendo el *trans, trans*-farnesol el terpeno mayoritario en ese tequila, (Anexo inciso 9.3).

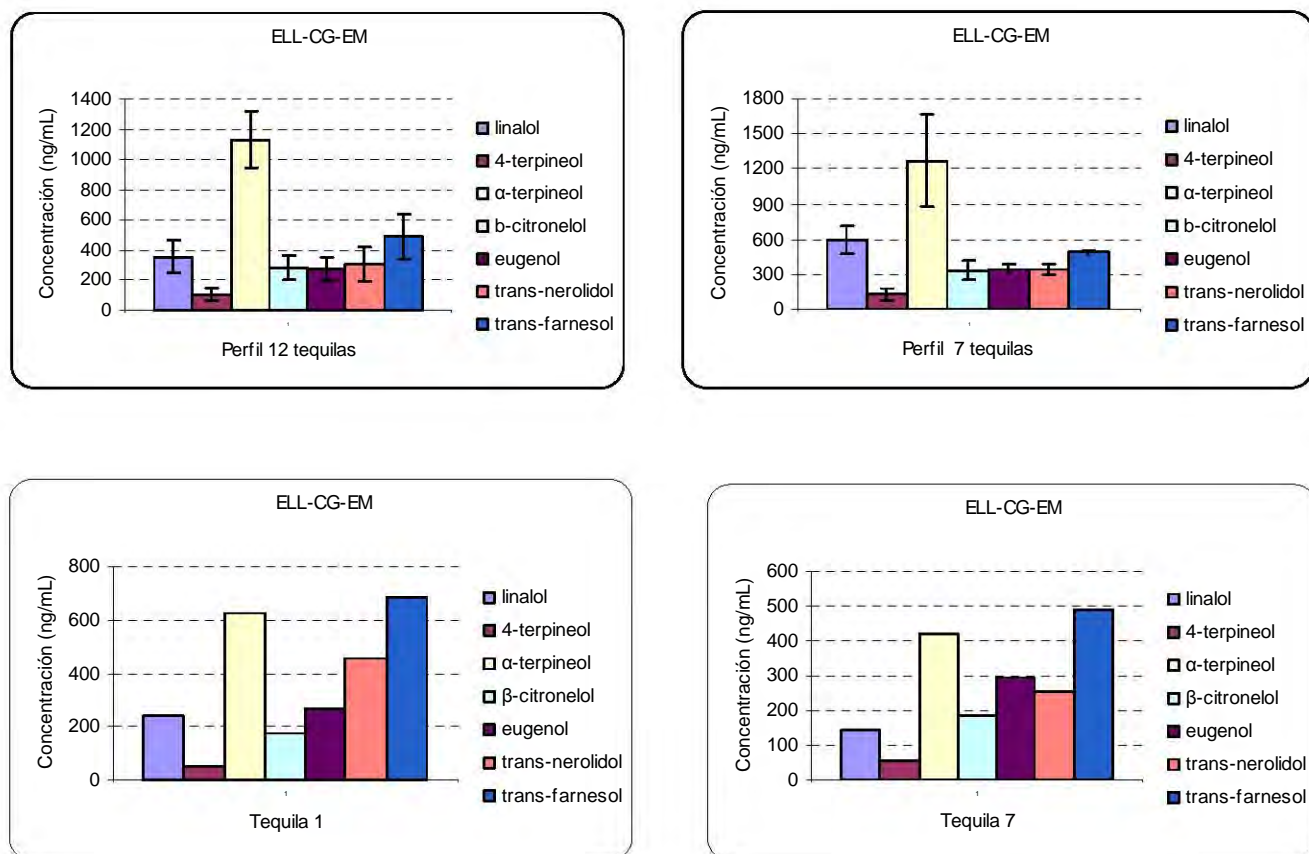


Fig. 24. Perfil de terpenos en muestras de tequila reposado 100% Agave

Como puede observarse en la Tabla 12, aunque los perfiles obtenidos fueron similares en la mayoría de los tequilas, la concentración individual de cada terpeno, así como la total fue diferente para cada una de las muestras analizadas.

Tabla 12. Cuantificación de terpenos (ng/mL) en muestras de tequila 100% *Agave* por ELL-CG-EM.

Terpeno	linalol	4-terpineol	α -terpineol	β -citronelol	eugenol	<i>trans</i> -nerolidol	<i>trans</i> -farnesol	Total ng/mL
Clave tequila								
1	238	49	622	177	269	453	684	2942
2	397	87	1094	321	274	240	491	2904
3	777	206	1814	488	331	343	498	4457
4	220	102	918	233	285	276	483	2516
5	502	79	1016	262	364	301	474	2997
6	398	190	1283	334	302	456	579	3543
7	143	54	422	184	293	256	492	1845
8	510	155	1482	338	343	350	492	3671
9	464	106	1168	284	265	310	481	3078
A10	410	113	1134	292	304	331	549	3133
11	214	69	871	246	272	216	439	2327
12	446	92	1116	320	344	365	521	3203
13	482	90	985	291	306	335	496	2985
B14	623	195	1717	382	308	438	514	4177
15	718	85	993	298	408	287	446	3234
16	552	173	1448	373	315	428	627	3916
17	517	86	892	282	373	329	491	2970
18	321	92	942	272	294	334	475	2730
19	332	74	934	310	308	337	556	2851
20	288	88	1318	332	265	337	601	3228
B21	150	67	512	180	257	237	452	1855
							Prom.	3053
							DE	667
							± 1 DE	2386-3720
							± 2 DE	1719-4387

A = tequila añejo, B = tequila blanco, DE = desviación estándar, Prom. = promedio

La Fig. 25 presenta, los valores estandarizados de la concentración total de terpenos de las muestras analizadas y podemos observar lo siguiente: el promedio de concentración total de terpenos en las 21 muestras de tequila fue de 3053 ng/mL. En el intervalo de ± 1 DE se localizaron 17 muestras de las 21 analizadas y 4 muestras (3, 16, B14, 7 y B21) estuvieron dentro del intervalo de ± 2 DE.

La concentración total de terpenos de la mayoría de las muestras estuvo dentro del intervalo de ± 1 DE, indicando probablemente una similitud en el contenido total, aunque la concentración individual fue diferente para cada tequila. Las muestras de tequila blanco B14 y B21 presentaron concentración total de terpenos arriba y abajo del intervalo de ± 1 DE, sin embargo, con este dato no podemos pensar que sea una diferencia entre tequila blanco y reposado debido a que 3 muestras de tequila reposado (3, 7 y 16) también presentaron un comportamiento similar en el contenido total de terpenos. La muestra de tequila añejo (A10) no presentó diferencia en sus resultados comparados con los obtenidos para tequila reposado, sin embargo, el análisis de una muestra de tequila añejo no es suficiente para dar una conclusión acerca de este tipo de tequila.

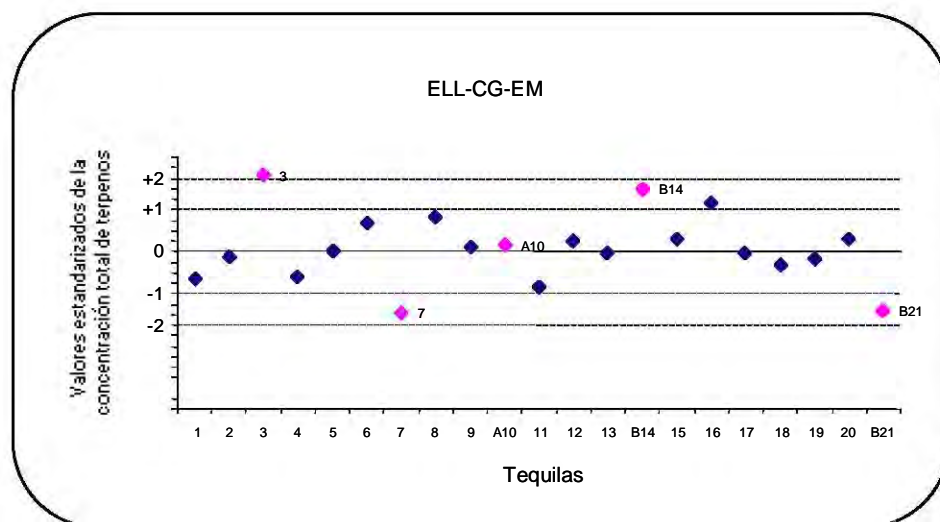


Fig. 25. Concentración total de terpenos en tequila por ELL-CG-EM.

La ELL-CG-EM con el cloroformo permitió la extracción adecuada de los terpenos con buena repetibilidad en todos los compuestos. Se tuvo buena resolución y eficiencia del sistema cromatográfico y los lavados con bicarbonato de sodio redujeron la concentración de ácidos grasos en el extracto que interferían con la identificación y cuantificación de 4-terpineol y *trans*-nerolidol.

6.2 Resultados y análisis de resultados por MEFS-HS-CG-EM

6.2.1 Selección de parámetros para MEFS-HS-CG-EM

6.2.1.1 Selección de fibra

Para el análisis de terpenos y compuestos de la fermentación en vinos, se ha reportado en diferentes trabajos el uso de fibras de PDMS y PA ^(12, 42), y el de fibras duales con recubrimientos de diferente polaridad como DVB, PDMS, CAR o CW que incrementan la capacidad de extracción de los analitos debido al efecto sinérgico de adsorción y distribución dentro de la fase estacionaria, obteniendo mayor sensibilidad ⁽¹²⁾.

Las Fig. 26 y 27 muestran que todas las fibras extraen los terpenos en diferente cantidad. Sin embargo, se observa (Fig. 26) que las fases de PA, PDMS y CW/DVB no extraen arriba del límite de detección al 4-terpineol y eugenol a 25 °C y con PDMS/DVB no se extrae el eugenol en cantidades detectables en ambas temperaturas. A 25 °C el trans-nerolidol es el que mayor se extrae en todas las fibras sin embargo, es con el PA que se obtiene la mayor extracción de este compuesto. Por otro lado, con PDMS/DVB se presentó la mayor extracción en general para los compuestos, con excepción del eugenol y trans-nerolidol, por lo que esta fase obtuvo mejor extracción a temperatura ambiente que las otras fibras estudiadas.

Al incrementar la temperatura a 65 °C (Fig. 27) se observa un aumento general en la extracción. Se detectan 4-terpineol utilizando PA, PDMS y CW/DVB, y eugenol empleando PA y CW/DVB los cuales no se extraían en cantidades detectables a temperatura ambiente. A mayor temperatura, el PA presentó mayor extracción de casi todos los terpenos (excepto α -terpineol). Con todas las fibras fue notable el incremento de extracción de *trans*-nerolidol y *trans*, *trans*-farnesol al aumentar la temperatura (en la gráfica, el valor reportado de trans-nerolidol y trans, trans-farnesol está expresado una unidad de magnitud mayor). A 65 °C presentaron mayor extracción en general los terpenos con PA y PDMS/DVB que con PDMS y CW/DVB. Lo anterior indica un efecto favorable de la temperatura sobre la extracción y son las fases PA y PDMS/DVB las que obtienen mayor extracción de los terpenos. De acuerdo a lo anterior, se seleccionaron PA y PDMS/DVB para evaluar el efecto de la adición de sal (NaCl) en la extracción de los analitos.

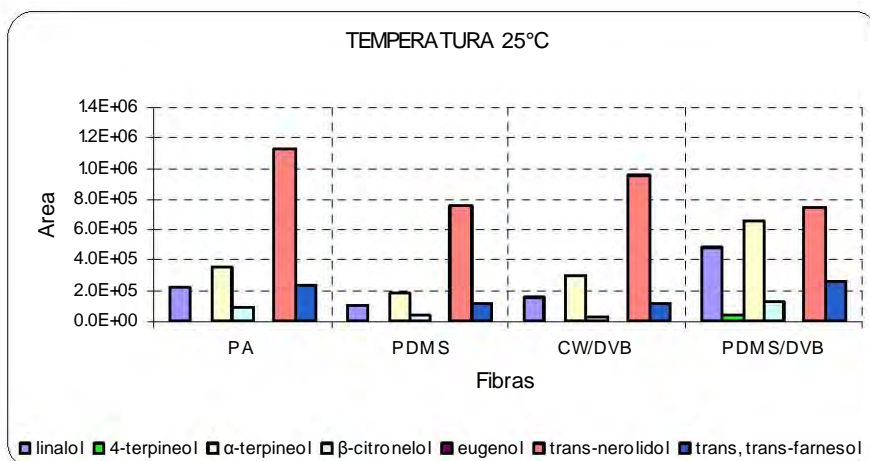


Fig. 26. Evaluación de fibras por MEFS-HS a 25 °C

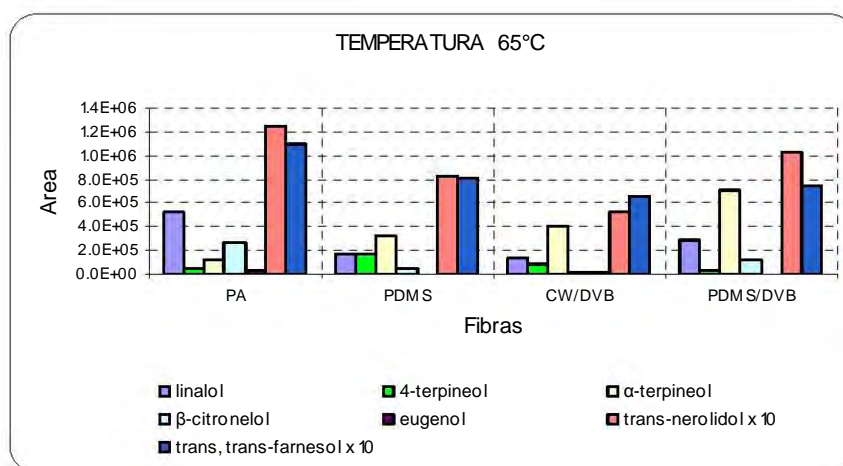


Fig. 27. Evaluación de fibras por MEFS-HS a 65 °C

6.2.1.2 Efecto de la adición de NaCl

Se evaluaron las fibras de PA y PDMS/DBV a 25 y 65 °C, adicionando 0, 50 y 100 % de NaCl durante la extracción. La adición de sal favoreció la cantidad de analitos extraídos, debido al incremento en la fuerza iónica de la disolución, el desplazamiento salino permitió la mayor concentración de los analitos en el espacio de cabeza sobre la muestra, permitiendo que éstos fueran más fácilmente adsorbidos por la fibra mejorando la extracción. En la Fig. 28 se observa que en ambas fibras (25 °C), al aumentar la concentración de sal a 50% y 100% se incrementó la extracción de los terpenos, excepto el eugenol, el cual no se observó en cantidades detectables a temperatura ambiente. Bajo estas condiciones se favoreció la extracción de 4-terpineol y β-citronelol compuestos presentes en baja concentración en el tequila.

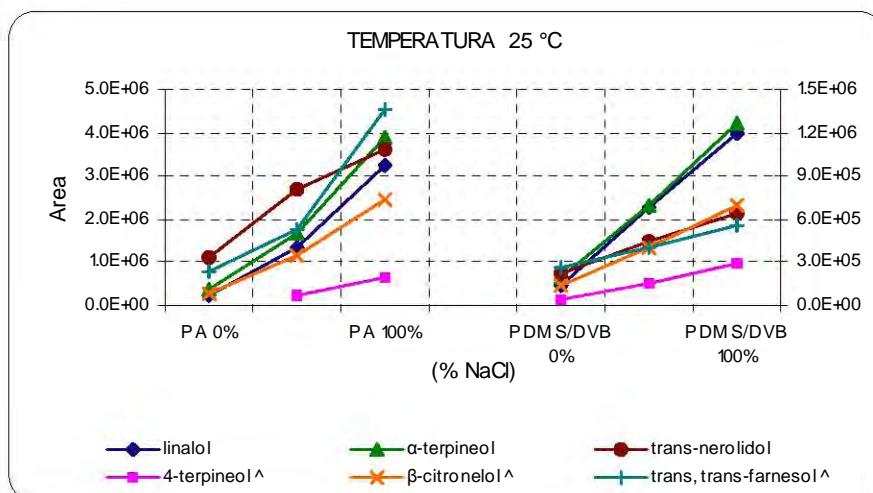


Fig. 28. Influencia de la concentración de NaCl a 25 °C (^ terpenos graficados con la escala derecha)

En la Fig. 29 se muestra que a 65 °C la extracción de terpenos con la fibra de PA presentó un decremento en la extracción de los compuestos al aumentar la adición de sal de 50 a 100 %. Esto no ocurrió con PDMS/DBV, donde se observó un incremento en la extracción de analitos al aumentar la concentración de sal. En ambas fibras a 65 °C se observó la extracción del eugenol, incrementándose con PDMS/DVB al aumentar a 100% la concentración de sal en la disolución. Sin embargo, a 65 °C se presentó un decremento de la extracción de 4-terpineol y linalol (terpenos graficados con la escala derecha) que la que se obtuvo a 25° C en ambas fibras.

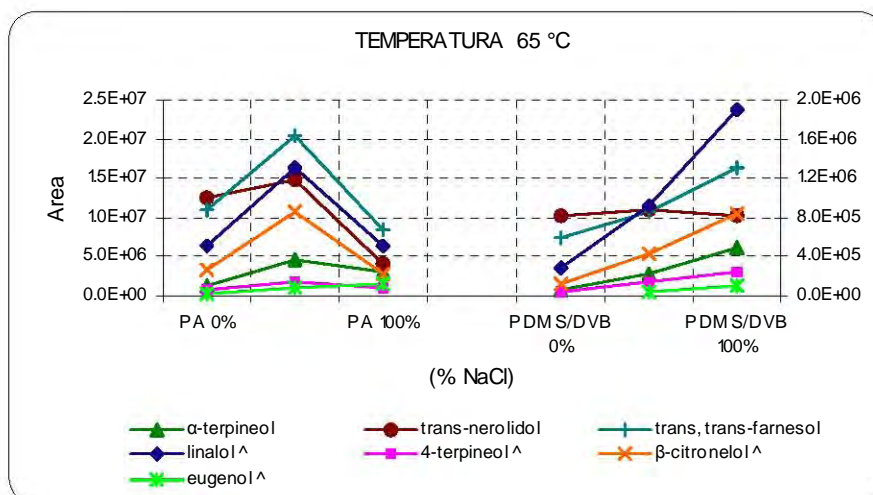


Fig. 29. Influencia de la concentración de NaCl a 65 °C (^ terpenos graficados con la escala derecha)

Se observó mayor extracción en la mayoría de los analitos a 25 °C y 100 % de sal, que la que se obtuvo a 0 y 50% con las fibras estudiadas, siendo PDMS/DVB la que reportó mejores resultados bajo estas condiciones. La fibra de PA presentó buena extracción de todos los terpenos a 65 °C con adición de 50 % de NaCl (Fig. 29) y a 25 °C con adición de 50 y 100 % de sal (Fig. 28), sin embargo se ha reportado su baja reproducibilidad en el análisis por MEFS-HS de compuestos volátiles ⁽³³⁾. De acuerdo a estos resultados, se seleccionó la fibra de PDMS/DVB y 100% de saturación con NaCl como una opción adecuada para el análisis de los terpenos.

La fibra de PDMS/DVB presenta características de polaridad intermedia, alcanzó una alta reproducibilidad y se recomienda para la extracción de analitos polares de bajo peso molecular ^(33, 35), con esta fibra se obtuvo buena extracción de los analitos considerando la diferente polaridad que éstos presentan debido a su estructura química, fue eficiente para la extracción de los monoterpenos, linalol, 4-terpineol y α -terpineol y también resultó adecuada para los demás compuestos, cuyo peso molecular y longitud de la cadena hidrocarbonada es mayor.

6.2.1.3 Temperatura de extracción

Una vez seleccionada la fibra PDMS/DVB (incisos 6.2.1.1 y 6.2.1.2), se procedió a evaluar la temperatura de extracción. En la Fig. 30 se observa que la extracción se incrementó ligeramente en los terpenos al aumentar la temperatura a 35 °C. Sin embargo, α -terpineol, β -citronelol y linalol presentaron un decremento en la extracción a mayor temperatura. El *trans*-nerolidol y principalmente el *trans*, *trans*-farnesol incrementaron considerablemente su extracción a temperatura mayor de 65 °C. Sin embargo, en la extracción del *trans*-nerolidol al aumentar la temperatura coeluye el éster del ácido dodecanoico, interfiriendo en su determinación, debido a que se traslapan los picos en el análisis cromatográfico. Por lo tanto, considerando el comportamiento y las características de cada compuesto, se seleccionó la temperatura de 25 °C para realizar la extracción, ya que se extraen bien los 7 terpenos y se evita la coelución de otros compuestos.

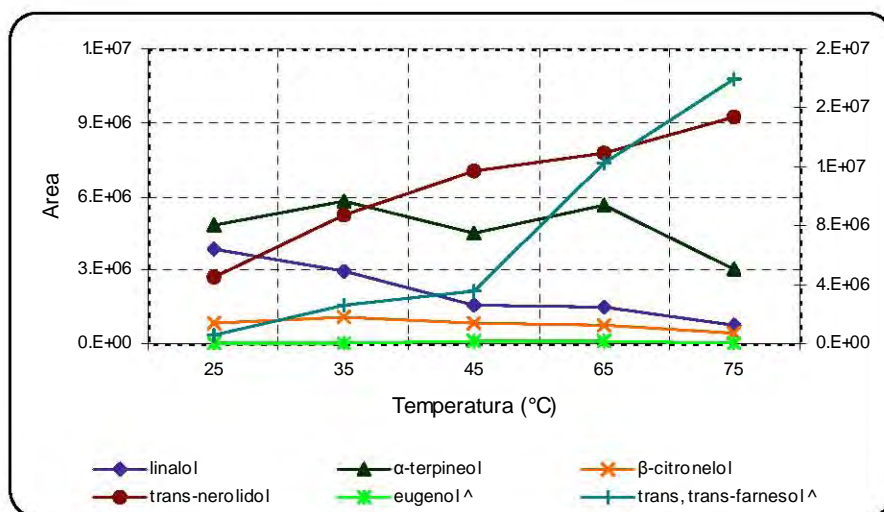


Fig. 30. Temperatura de extracción de terpenos con PDMS/DVB (^ terpenos graficados con la escala derecha)

6.2.1.4 Perfil de tiempo de extracción

Se evaluó el perfil de tiempo de extracción con la fibra de PDMS/DVB a 25° C. En la Fig. 31 se observa que no todos los terpenos alcanzaron el equilibrio de extracción. 4-terpineol y eugenol (presentes en baja concentración) incrementaron ligeramente su extracción al aumentar el tiempo; α -terpineol, β -citronelol, trans-nerolidol y trans, trans-farnesol no alcanzan el equilibrio aún a 60 min de extracción. El tiempo de extracción favoreció la concentración de analitos en la fibra, sin embargo mientras que algunos no alcanzaron el equilibrio aún después de 60 min, los compuestos presentes en menor concentración si incrementaron su extracción al aumentar el tiempo. De acuerdo a lo anterior, se seleccionaron 30 min de extracción, como el tiempo que permitió adecuada extracción en los 7 terpenos.

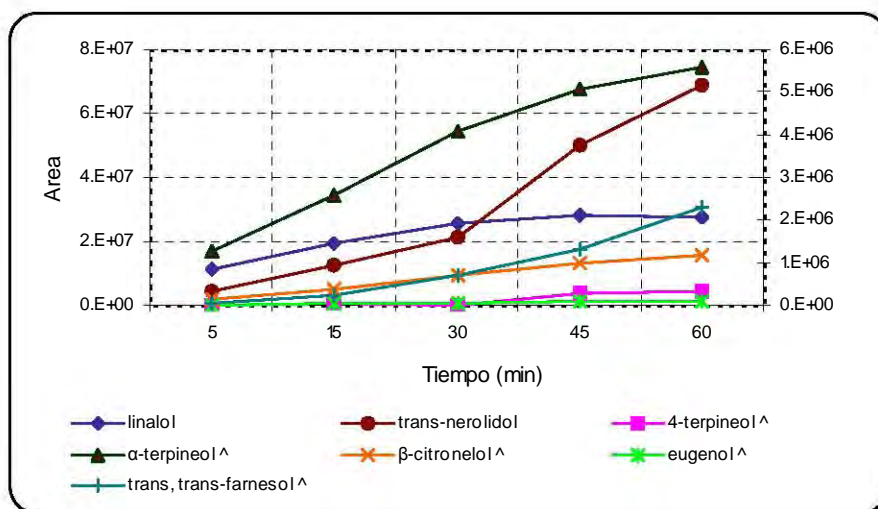


Fig. 31. Perfil de tiempo de extracción de terpenos con PDMS/DVB
(^ terpenos graficados con la escala derecha)

6.2.2 Linealidad

Una vez seleccionados todos los parámetros para la MEFS-HS se procedió a evaluar la linealidad del método. En la Tabla 13 se observa que la linealidad fue aceptable para los terpenos estudiados en el intervalo de concentración de 50 a 1000 ng/mL con $r > 0.990$ para la mayoría de los compuestos, excepto para *cis*-nerolidol ($r = 0.989$) y *trans, trans*-farnesol ($r = 0.981$) (Anexo inciso 9.2).

Tabla 13. Linealidad del método MEFS-HS-CG-EM

Terpeno	r	Intervalo Lineal (ng/mL)
Linalol	0.995	51 – 1033
4-terpineol	0.996	49 – 990
α -terpineol	0.996	50 – 1006
β -citronelol	0.995	50 – 1007
eugenol	0.997	50 – 1006
<i>cis</i> -nerolidol	0.989	49 – 990
<i>trans, trans</i> -farnesol	0.981	50 – 1002

6.2.3 Precisión

La precisión expresada como coeficiente de variación (%CV) fue en general menor a 10% (n=3) para la mayoría de los terpenos como se muestra en la Tabla 14, excepto para eugenol y *trans, trans*-farnesol que fue mayor. Esta reproducibilidad es aceptable para análisis de compuestos traza por MEFS-HS-CG-EM. Se calculó el límite de detección (LD = 2 DE) y límite de cuantificación (LQ = 10 DE) para cada uno de los terpenos obteniendo los valores que se reportan en la Tabla 14. Los valores obtenidos de LQ son menores a los valores de concentración obtenidos en las muestras de tequila, lo cual permite cuantificar sin problema los terpenos en los tequilas. Estos límites fueron menores por MEFS-HS-CG-EM que los obtenidos por ELL-CG-EM.

Tabla 14. Precisión del método MEFS-HS-CG-EM

n = 3	Solución estándar de terpenos	DE	CV	LD	LQ
Terpeno	ng/mL	ng/mL	%	ng/mL	ng/mL
linalol	15.49	0.86	5.56	1.7	8.6
4-terpineol	14.85	0.89	6.02	1.7	8.9
α -terpineol	15.10	1.34	8.92	2.6	13.4
β -citronelol	15.11	1.4	9.31	2.8	14
eugenol	15.09	1.97	13.02	3.9	19.7
<i>cis</i> -nerolidol	14.86	1.44	9.73	2.8	14.4
<i>trans, trans</i> -farnesol	15.03	3.76	25	7.5	37.6

6.2.4 Análisis de terpenos por MEFS-HS-CG-EM

La Fig. 32 presenta el análisis por MEFS-HS-CG-EM de la disolución estándar de terpenos, observando buena resolución y eficiencia del sistema cromatográfico y un tiempo de análisis de 30 min. En el cromatograma se observan unos picos a 16, 21, 25 y 29 min del tiempo de análisis los cuales corresponden a polisiloxanos, compuestos provenientes de la fibra.

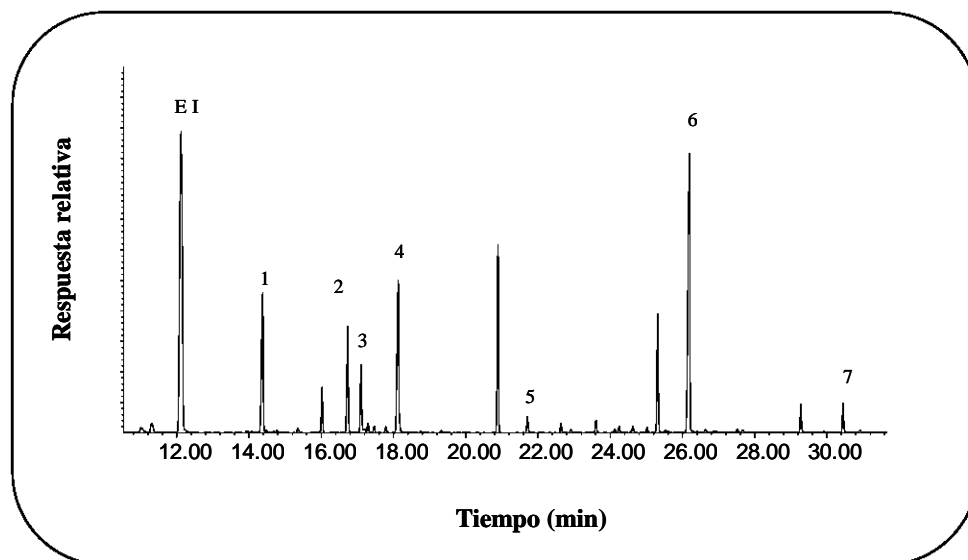


Fig. 32. Cromatograma iónico total del análisis por MEFS-HS-CG-EM de la disolución estándar de terpenos. 1. linalol; 2. 4-terpineol; 3. α -terpineol; 4. β -citronelol; 5. eugenol; 6. *trans*-nerolidol; 7. *trans, trans*-farnesol; E I p-cimeno. Condiciones cromatográficas descritas en el inciso 5.2.1.

En el análisis por MEFS-HS-CG-EM se obtuvo en la mayoría de las muestras un perfil de terpenos similar sin embargo, la concentración de cada uno de los compuestos fue diferente en las muestras de tequila analizadas.

En la Tabla 15 se presenta el intervalo de concentración de terpenos obtenido por MEFS-HS-CG-EM en las muestras, encontrando, al igual que en ELL, que el α -terpineol fue el compuesto en mayor concentración en todos los tequilas y el *trans*-nerolidol, eugenol y 4-terpineol fueron los de menor concentración.

Tabla 15. Intervalo de concentración de terpenos en tequilas por MEFS-HS-CG-EM

Terpeno	Conc. mínima ng/mL	Conc. máxima ng/mL
linalol	162	1684
4-terpineol	54	455
α -terpineol	1004	4555
β -citronelol	66	697
eugenol	44	241
<i>trans</i> -nerolidol	15	188
<i>trans, trans</i> -farnesol	51	514

La Fig. 33 presenta el cromatograma del análisis de una muestra de tequila por MEFS-HS-CG-EM en el cual se indican los picos correspondientes a los 7 terpenos en estudio presentando buena resolución y eficiencia en la separación en un tiempo de análisis de 30 min. En las muestras de tequila no se identifica el *cis*-nerolidol sin embargo, se detecta el isómero *trans*-nerolidol ($t_r = 26.8$ min) cuya identidad se confirma con una certeza del 95% utilizando los espectros de la base de datos de la biblioteca NIST.

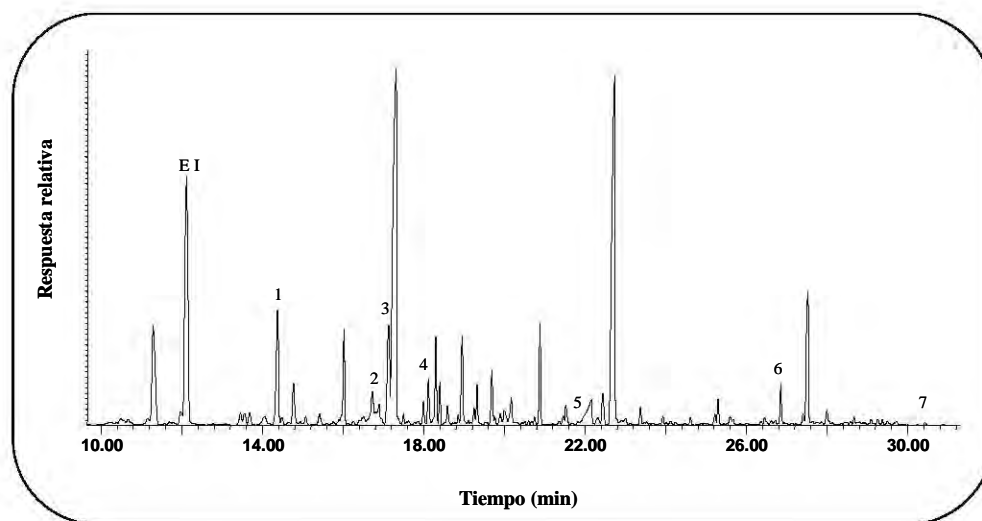


Fig. 33. Cromatograma iónico total del análisis por MEFS-HS-CG-EM de tequila reposado 16. 1. linalol; 2. 4-terpineol; 3. α -terpineol; 4. β -citronelol; 5. eugenol; 6. *trans*-nerolidol; 7. *trans, trans*-farnesol; E I p-cimeno. Condiciones cromatográficas descritas en el inciso 5.2.1

La Fig. 34 presenta el perfil de terpenos obtenido para las muestras de tequila analizadas por MEFS-HS-CG-EM observando que el α -terpineol es el de mayor concentración seguido del linalol para casi todas las muestras, y que eugenol, nerolidol y 4-terpineol se encontraron en menor concentración en los tequilas evaluados, (Anexo inciso 9.6).

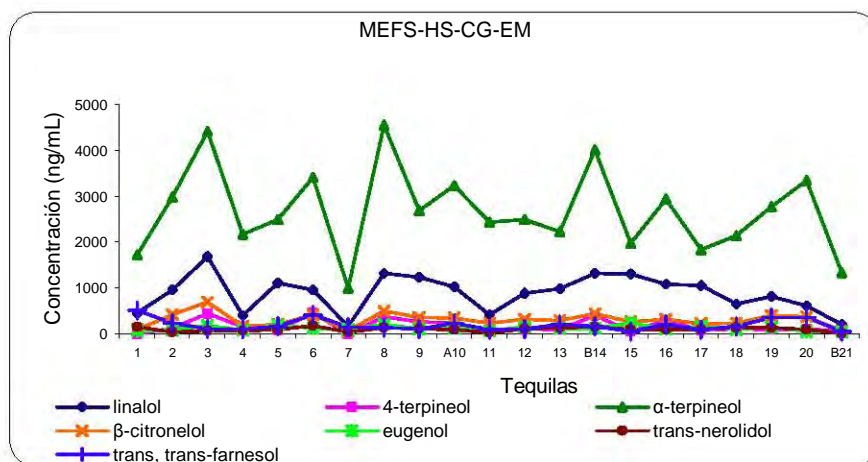


Fig. 34. Perfil de terpenos en muestras de tequila 100% Agave

La Fig. 35 muestra el perfil de terpenos obtenido, la mayoría de los tequilas evaluados (19 muestras) presentaron un perfil similar, donde el orden fue el siguiente: α -terpineol, linalol y β -citronelol los compuestos en mayor concentración, y 4-terpineol, eugenol, *trans*-nerolidol y *trans, trans*-farnesol presentes en menor concentración. Al igual que en ELL-CG-EM, la muestras 1 y 7 de tequila presentaron por MEFS-HS-CG-EM un perfil similar pero diferente a la mayoría, siendo el orden: α -terpineol, *trans, trans*-farnesol (cuya concentración en tequila 1 fue la mayor de todos los tequilas evaluados), enseguida linalol, *trans*-nerolidol, β -citronelol, eugenol y no se identificó el 4-terpineol en cantidades detectables en las muestras 1 y 7. (Anexo inciso 9.4). No se encontró diferencia en el perfil de las muestras de tequila blanco (B14 y B21) y añejo (A10) comparado con el obtenido para tequila reposado, aunque el análisis de una muestra no permite una conclusión definitiva de su perfil de terpenos.

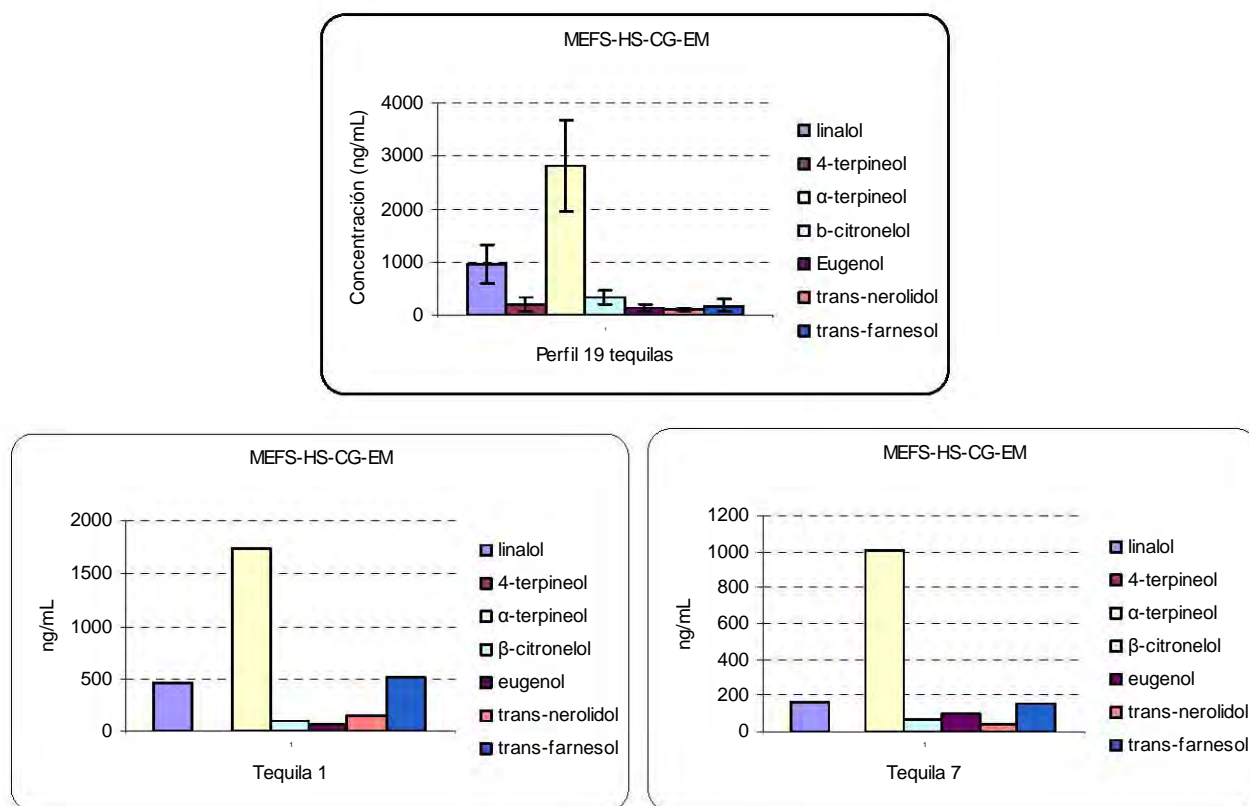


Fig. 35. Perfil de terpenos en muestras de tequila reposado 100% *Agave*

En la Tabla 16 se presenta la concentración total de terpenos obtenida por MEFS-HS-CG-EM en los tequilas analizados, aunque el perfil de compuestos fue semejante en la mayoría de las muestras, la concentración de cada terpeno fue diferente, lo que podría influir en las diferencias de aroma y sabor característico de cada tequila. Los tequilas blanco (B14 y B21), así como el tequila añejo (A10), no presentaron diferencia con el perfil de terpenos de los tequilas reposados (Anexo incisos 9.4 y 9.6).

Tabla 16. Cuantificación de terpenos (ng/mL) en muestras de tequila 100% *Agave* por MEFS-HS-CG-EM.

Terpeno	linalol	4-terpineol	α -terpineol	β -citronelol	eugenol	<i>trans</i> -nerolidol	<i>trans</i> -farnesol	Total ng/mL
Clave tequila								
1	460	NI	1732	93	74	155	514	3028
2	966	131	2978	412	95	44	235	4862
3	1684	449	4414	697	188	70	106	7608
4	404	148	2167	163	84	66	117	3149
5	1120	88	2493	211	193	100	168	4373
6	959	455	3409	411	129	187	424	5976
7	162	NI	1004	66	101	39	153	1526
8	1323	371	4555	499	212	145	139	7244
9	1246	271	2694	365	111	106	118	4911
A10	1029	233	3227	342	135	98	239	5302
11	421	67	2434	240	72	35	92	3361
12	897	106	2499	316	153	112	118	4199
13	996	104	2226	295	120	146	211	4098
B14	1323	398	4005	448	132	160	171	6637
15	1305	54	1971	262	241	91	59	3982
16	1081	297	2940	325	105	93	206	5047
17	1064	85	1844	229	164	100	95	3582
18	650	114	2151	237	103	136	167	3558
19	824	92	2776	407	149	136	356	4739
20	617	117	3341	372	62	91	361	4961
B21	209	54	1331	71	44	15	51	1775
							Prom.	4472
							DE	667
							± 1 DE	2903-6041
							± 2 DE	1334-7610

A = tequila añejo, B = tequila blanco, NI = No Identificado, DE = desviación estándar, Prom. = promedio

La Fig. 36 presenta los valores estandarizados de la concentración total de terpenos calculada para las muestras de tequila evaluadas, generando la siguiente información: la concentración total de los tequilas analizados obtuvo un valor promedio de concentración total de terpenos en las 21 muestras de tequila de 4472 ng/mL. Se calcularon dos intervalos de concentración a ± 1 DE y ± 2 DE. Se observa que 16 muestras de las 21 analizadas se encontraron dentro de ± 1 DE; las muestras 3, 8 y B14 por arriba de +1 DE y las muestras 7 y B21 por debajo de -1 DE.

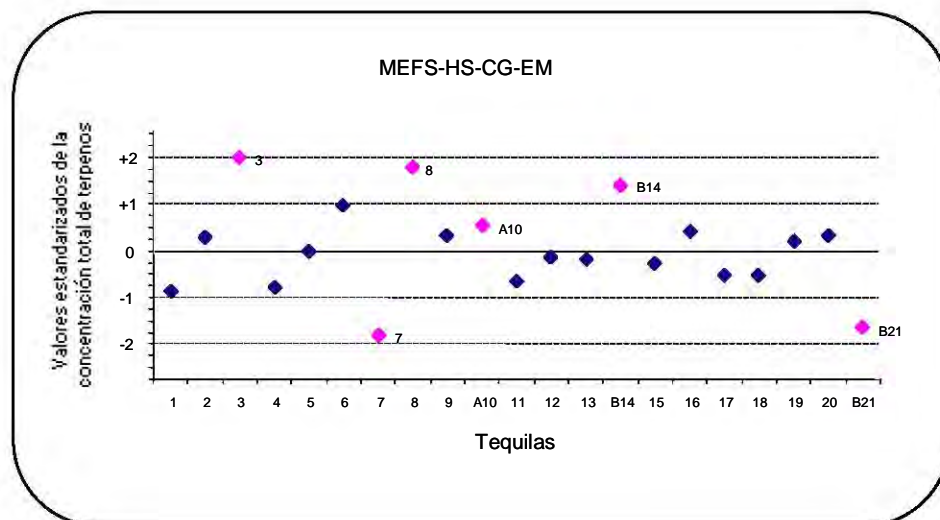


Fig. 36. Concentración total de terpenos en tequilas por MEFS-HS-CG-EM.

Se observa que los tequilas blanco B14 y B21 tuvieron la concentración total de terpenos por arriba y por debajo de ± 1 DE y las muestras de tequila reposado 3, 7 y 8 presentaron un comportamiento similar, encontrándose fuera de los límites superior e inferior de este intervalo, lo que no indica diferencia entre los tequilas blancos y reposados. La muestra de tequila añejo (A10) no presentó diferencia en la concentración total de terpenos comparada con los resultados obtenidos para los tequilas reposados (Anexo incisos 9.4 y 9.6).

6.3 Comparación de ELL-CG-EM y MEFS-HS-CG-EM.

Si comparamos ambas metodologías utilizadas, se observa de las gráficas (Anexo inciso 9.7) que se obtuvo por ELL-CG-EM mayor extracción de eugenol, *trans*-nerolidol y *trans, trans*-farnesol, que de linalol, α -terpineol y 4-terpineol, probablemente debido a la afinidad de los analitos ligeramente menos polares hacia el cloroformo, lo que favoreció su extracción.

La metodología desarrollada por MEFS-HS-CG-EM requirió de la selección de los parámetros para la determinación simultánea de los 7 analitos de estudio en la matriz de la muestra. El linalol, 4-terpineol, y α -terpineol presentaron mayor extracción que eugenol, *trans*-nerolidol y *trans*-farnesol por MEFS-HS-CG-EM lo cual es probablemente debido a una mayor afinidad de estos terpenos por la fibra debido a su ligera mayor polaridad y bajo peso molecular favoreciendo su extracción. El compuesto β -citronelol no presentó diferencia en su extracción por ambas metodologías (Anexo inciso 9.7).

6.4 Evaluación estadística del análisis cuantitativo de terpenos en tequila

La cantidad total de terpenos calculada en las muestras de tequila presentó un comportamiento muy similar empleando ambas metodologías ELL-CG-EM y MEFS-HS-CG-EM, como puede observarse en las Fig. 25 y 36, donde la mayoría de las muestras (17 tequilas) se ubicaron por su concentración total dentro de ± 1 DE y las muestras 3, B14, 7 y B21 fuera de los límites superior e inferior de este intervalo pero ubicadas dentro de ± 2 DE. La mayoría de las muestras de tequila presentaron un perfil de terpenos semejante en las dos metodologías (Anexo incisos 9.3 y 9.4). Sin embargo, se observa que en general para todos los terpenos, la concentración calculada por MEFS-HS-CG-EM fue mayor que la calculada por ELL-CG-EM.

Para comparar y evaluar los resultados obtenidos por ambas metodologías se realizó una prueba estadística denominada contraste de significación ⁽⁵³⁾, ésta aproximación contrasta si son significativas las diferencias entre los resultados obtenidos en los métodos analíticos empleados o si se pueden justificar sólo por variaciones aleatorias. Los resultados obtenidos por ELL-CG-EM y MEFS-HS-CG-EM se evaluaron por la comparación de las medias experimentales de los métodos de análisis calculando el estadístico “t”. Este método evalúa si la diferencia entre las medias muestrales (μ_1 y μ_2) de ambos métodos analíticos es significativa. Este procedimiento estadístico supone que las muestras se extraen de poblaciones con desviaciones estándar iguales. Para lo cual se calculó primero la variación estadística de los métodos comparando sus desviaciones estándar σ_1 y σ_2 , (para evaluar si difieren en su precisión) y se encontró que no existe diferencia significativa en ambos métodos de análisis. En seguida se analizó el estadístico “t” para comprobar estadísticamente las diferencias entre los resultados obtenidos por ambos métodos para cada uno de los terpenos estudiados en las 21 muestras de tequila. ⁽⁵³⁾

Los resultados del análisis estadístico “t” se presentan en la Tabla 17 donde se planteó las siguientes Hipótesis:

Hipótesis nula $H_0 : \mu_1 = \mu_2$

Hipótesis alternativa $H_1 : \mu_1 \neq \mu_2$

Si $t_{calc} < t_{4,0.01}$ Se acepta la Hipótesis nula

Si evaluamos los resultados del análisis estadístico (Tabla 17) se observa que para la mayoría de los terpenos, principalmente, β -citronelol, eugenol, *trans*-nerolidol y *trans*-farnesol en casi todos los tequilas (excepto *trans*-nerolidol en tequila 16) y 4-terpineol para 14 muestras de tequila, no se encontró diferencia significativa en los resultados obtenidos por ambos métodos de análisis ELL-CG-EM y MEFS-HS-CG-EM. Esto indica que ambas metodologías no son significativamente diferentes y en la cuantificación de esos compuestos se puede concluir que las metodologías son equivalentes y por lo tanto confiables.

Los compuestos linalol y α -terpineol presentaron diferencia significativa en los resultados estadísticos obtenidos al comparar su cuantificación por ambas metodologías. Estos compuestos presentaron la mayor concentración en la mayoría de los tequilas por ambos métodos, lo cual podría suponer un error por exceso en la concentración, debido a que la curva patrón por MEFS-HS-CG-EM utilizó un rango de 50-1000 ng/mL. Como puede observarse en la Tabla 16 la cuantificación de estos compuestos estuvo dentro del intervalo de 400-1600 ng/mL para linalol y de 1000-4500 ng/mL para α -terpineol, cuyos valores máximos estuvieron por arriba del intervalo de la curva patrón obtenida por MEFS-HS-CG-EM.

Tabla 17. Resultados del análisis estadístico Prueba “t” para $\alpha = 0.01$ (n = 3)

Terpenos	Linalol	4-terpineol	α -terpineol	β -citronelol	eugenol	<i>trans</i> -nerolidol	<i>trans</i> -farnesol
Tequilas							
1	x		x #				
2	x		x # *				
3	x #	x	x # *				
4	x		x #				
5	x #		x #				
6	x	x	x # *				
7			x #				
8	x #	x	x # *				
9	x #	x	# *				
A10	x #	x	x # *				
11	x		x #				
12	x		x # *				
13	x		x #				
B14	x #	x	x # *				
15	x #		x #				
16	x #	x	x # *			x	
17	x #		x #				
18	x		x #				
19	x		x #				
20	x		x # *				
B21			x #				

	No difiere significativamente	x	Difiere significativamente
#	Datos fuera del intervalo de calibración por MEFS-HS-CG-EM		
*	Datos fuera del intervalo de calibración por ELL-CG-EM		

En la Tabla 17 se observa que el linalol no presentó diferencia significativa en los tequilas 7 y B21 donde la concentración calculada por MEFS-HS-CG-EM fue de 162 y 209 ng/mL respectivamente (Tabla 16) valores dentro de la curva y de acuerdo al análisis estadístico, comparables significativamente con los obtenidos por ELL-CG-EM.

Esto permite suponer que existió un sesgo o error sistemático en la cuantificación de linalol y α -terpineol por MEFS-HS-CG-EM, donde las concentraciones fueron mayores a las previstas en la curva patrón y por lo tanto los resultados de esos compuestos presentaron diferencia significativa al compararlos con la metodología por ELL-CG-EM cuyos valores obtenidos en la cuantificación (Tabla 12) estuvieron, la mayoría, dentro del intervalo de la curva patrón (50 a 1000 ng/mL). La diferencia estadística es demostrable en los casos en que la concentración calculada no está dentro del intervalo de calibración (Tabla 17).

Lo anterior permite concluir del análisis estadístico que las metodologías propuestas para la cuantificación de terpenos son comparables en el análisis de β -citronelol, eugenol, *trans*-nerolidol y *trans-trans*-farnesol y que ambas son adecuadas para extraer y cuantificar estos compuestos.

En el caso del linalol y α -terpineol los resultados difieren significativamente encontrándose la mayoría fuera del intervalo de calibración al comparar ambos procedimientos, es importante ampliar este intervalo de calibración para cuantificar estos compuestos.

7. Conclusiones

Se evaluaron dos procedimientos para la determinación y cuantificación de terpenos en tequila 100% *Agave*: ELL-CG-EM y MEFS-HS-CG-EM. Ambas metodologías resultaron adecuadas para analizar terpenos en tequila, aunque la extracción de los compuestos fue diferente. ELL-CG-EM reportó mayor extracción de eugenol, *trans*-nerolidol y *trans*, *trans*-farnesol, mientras que MEFS-HS-CG-EM presentó mayor extracción de linalol, 4-terpineol y α -terpineol, esto debido a la estructura química de los compuestos y a su afinidad por la fibra de MEFS y por el disolvente empleado en ELL.

Ambos procedimientos reportaron buena linealidad en el intervalo de concentraciones estudiado de 50 a 1000 ng/mL y buena precisión con coeficientes de variación aceptables, considerando la determinación de analitos a nivel de traza como son los terpenos en tequila.

El perfil de terpenos obtenido por ELL-CG-EM y MEFS-HS-CG-EM fue semejante en la mayoría de las muestras analizadas, siendo el α -terpineol el de mayor concentración y el 4-terpineol, eugenol y *trans*-nerolidol los de menor concentración. Sin embargo, la concentración total de terpenos en las muestras fue diferente probablemente contribuyendo de manera distinta al aroma y sabor de cada tequila.

Empleando la ELL-CG-EM el α -terpineol fue el terpeno mayoritario en 19 tequilas analizadas (excepto tequilas 1 y 7), seguido de linalol en la mayoría de las muestras y de *trans*, *trans*-farnesol para algunos tequilas. Por MEFS-HS-CG-EM el α -terpineol fue el terpeno en mayor concentración en todos los tequilas, seguido del linalol, β -citronelol, 4-terpineol, eugenol, *trans*-nerolidol y *trans-trans*-farnesol.

En los dos procedimientos de análisis, las muestras de tequila blanco (B14 y B21) y añejo (A10) no presentaron diferencia en el perfil de terpenos obtenido comparado con el de tequila reposado.

La concentración de terpenos en las muestras de tequila fue mayor por MEFS-HS-CG-EM que por ELL-CG-EM.

La comparación de las metodologías por el análisis de contraste de significación, reportó que los métodos eran equivalentes ($H_0 = H_1$) en el análisis de β -citronelol, eugenol, *trans*-nerolidol y *trans*-farnesol en 20 muestras de tequila (excepto *trans*-nerolidol en tequila 16), siendo estos resultados confiables.

La cuantificación de linalol y α -terpineol en el tequila presentó diferencia significativa, siendo la concentración calculada por MEFS-HS-CG-EM (en la mayoría de los tequilas) mayor que la considerada en la curva patrón, lo que supone un sesgo en la cuantificación por este método, dando como resultado diferencia en la cuantificación por ambas metodologías.

La metodología desarrollada por ELL-CG-EM fue adecuada para extraer, identificar y cuantificar terpenos en tequila. Permitió concentrar los analitos evitando la interferencia del etanol en la matriz de la muestra de tequila y eliminó la interferencia del ácido octadecanoico y dodecanoico con 4-terpineol y *trans*-nerolidol respectivamente. La ELL presentó la desventaja de utilizar mayor volumen de muestra, así como el manejo de disolventes tóxicos y costosos.

La metodología desarrollada por MEFS-HS-CG-EM presentó buena reproducibilidad en el análisis de compuestos a nivel de trazas como son los terpenos en tequila, fue una técnica simple, rápida y eficiente, requirió menor volumen de muestra sin el uso de disolventes orgánicos, disminuyó el tiempo de análisis y la manipulación de la muestra, fue de fácil manejo con un montaje experimental sencillo y de bajo costo.

Perspectivas de la caracterización del tequila

Por la complejidad de los componentes responsables del aroma y sabor de las bebidas alcohólicas que contienen una gran cantidad de compuestos de diferente naturaleza, el planteamiento para definir el perfil que caracterice a una bebida y en particular al tequila, resulta una labor de investigación a largo plazo, que involucre el estudio desde las plantas de *Agave*, su desarrollo, la influencia del clima, los procesos de transformación de la materia prima, la fermentación, la destilación, el tiempo de añejamiento, etc., con la finalidad de encontrar señales o marcadores que permitan definir la autenticidad de la bebida y por consiguiente su origen.

Con las metodologías aplicadas para un grupo de compuestos importantes del sabor y aroma de esta bebida como son los terpenos y que se han planteado en el presente trabajo, se recomendaría lo siguiente:

Correlacionar los resultados obtenidos en la cuantificación de terpenos de las muestras de tequila estudiadas con un análisis sensorial por jueces calificados que permita evaluar su contribución al aroma y sabor del tequila reposado 100% *Agave*.

Aplicar estas metodologías para el análisis de terpenos y otros compuestos en distintas bebidas derivadas de *Agave* y de caña de azúcar con la finalidad de buscar señales en la composición en las plantas, evaluar sus diferencias y calidad.

Analizar la composición de terpenos en los diferentes tipos de tequila: blanco, reposado y añejo así como en sus diferentes presentaciones 100 % y 51 % *Agave* para evaluar su transformación durante los diferentes procesos de elaboración y definir el perfil de terpenos de acuerdo al tipo de tequila. Correlacionar la cuantificación de terpenos en los diferentes tipos de tequila con análisis sensorial para evaluar su influencia en sabor y aroma de acuerdo al tipo de tequila y al porcentaje de *Agave* utilizado durante la elaboración.

8. Bibliografía

1. A. G. Valenzuela. **“El Agave tequilero. Cultivo e Industria en México.”** Editorial Mundi-Prensa. México, D.F. 2003.
2. M. García-Garibay, A. López-Munguía, R. Ramírez-Quintero, **Biología Alimentaria. Bebidas Alcohólicas no destiladas.** Limusa, 1ª edición, México, 1993, p. 263-266.
3. Diario Oficial de la Federación, (1997). **Norma Oficial Mexicana. NOM-006-SCFI-1994, Bebidas Alcohólicas-Tequila Especificaciones.** México, D.F. Diario Oficial 3 de septiembre de 1997.
4. Goodwint, W., Mercer, I., **“Introduction to plant biochemistry”**, Pergamon Press, Germany, (1974), pp. 279-282.
5. A.R. Pinder, **The Chemistry of the Terpenes.** Chapman & Hall Ltd, 1ª Edición, U.S.A., 1960.
6. A. Medina, **“Determinación de terpenos en *Agave tequilana* Weber var. azul, *Agave angustifolia*, *Agave salmiana* y en sus respectivas bebidas alcohólicas”**. Tesis, UNAM. México, DF. 2004.
7. A. L. Demain, N. A. Solomon. **“Industrial Microbiology “.** Scientific American, 245 (3) pp. 66-75, 1981.
8. A. H. Rose. **“History and Scientific Basis of Alcoholic Beverages Production”**, Alcoholic Beverages, A. H. Rose (comp.), Academic Press, Londres, pp. 1-41, 1977.
9. A. C. Simpson, **“Gin and Vodka”**, Alcoholic Beverages, A. H. Rose (comp.), Academic Press Londres, pp. 537-593, 1977.
10. Mc Murry, J. **Organic Chemistry.** Brooks / Cole Publishing Company, 3ª Edición, U.S.A., 1992. p.1066-1070.
11. F.A. Carey. **Química Orgánica.** Mc Graw Hill / Interamericana de España, S.A.U 3ª Edición, 1999. p. 945-953.
12. E. Sánchez-Palomo, M. C. Díaz-Maroto, M. S. Pérez-Coello. **Rapid determination of volatile compounds in grapes by HS-SPME coupled with GC-MS.** Talanta 66 (2005) 1152-1157. Science Direct.
13. J.J. Mateo, M. Jiménez. **Monoterpenes in grape juice and wines Review.** Journal of Chromatography A, 881 (2000) 557-567.
14. A. Peña, L. Díaz, A. Medina, C. Labastida, S. Capella, L.E. Vera. **Characterization of three *Agave* species by gas chromatography and solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry.** Journal of Chromatography A, 1027 (2004) 131-136.
15. A. Bobadilla, **“Caracterización de terpenos en el *Agave tequilana* Weber variedad azul y su evolución en la producción de tequila”**. Tesis Facultad de Química, UNAM, México, 2004.
16. D.S. Granados, **Los Agaves en México.** Universidad Autónoma de Chapingo, 1ª Edición. México, 1993.

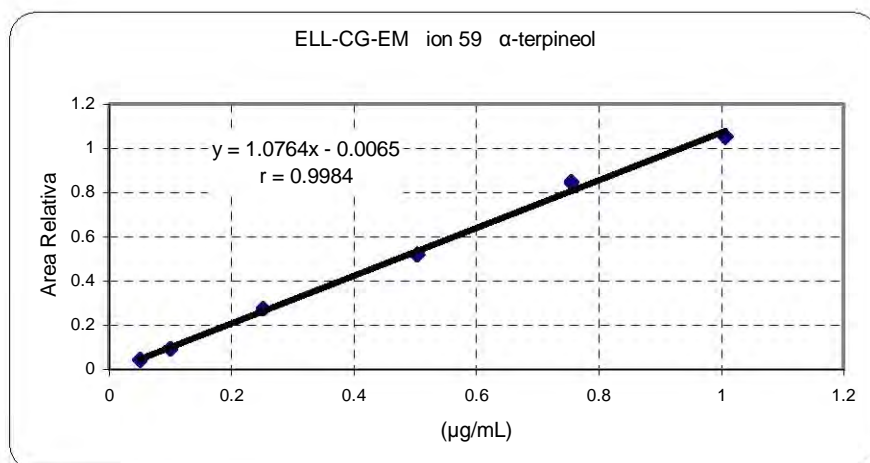
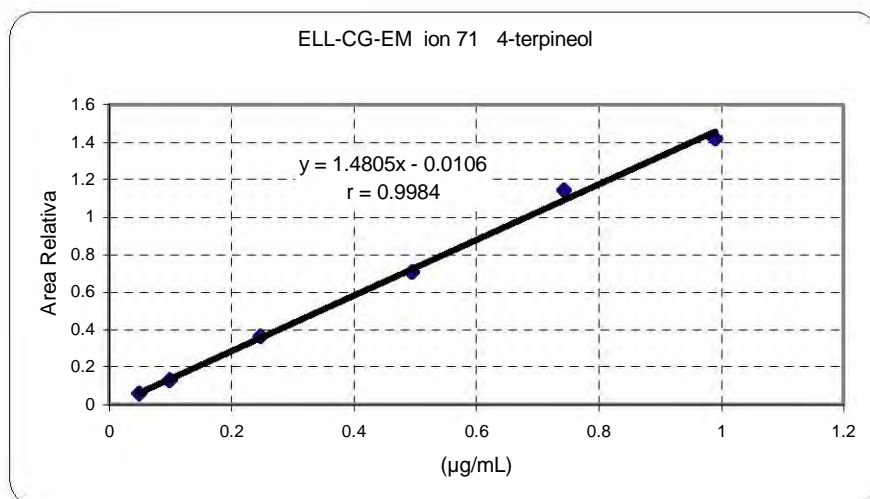
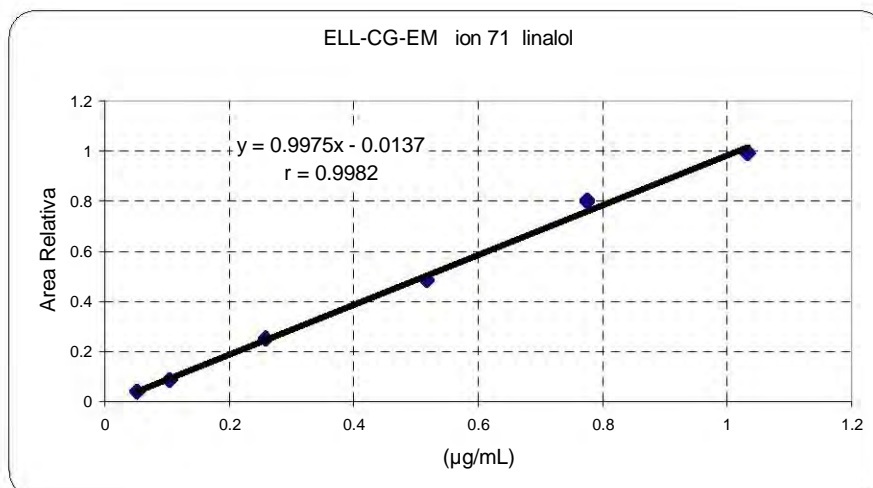
17. L. O. Goncalves de, **El maguey y el pulque en los códigos mexicanos**. Fondo de Cultura Económica. México.
18. N. E. Walton. **“The cultivation and the localitation of mezcal and tequila in México”**. In: Rev. Geogr. Inst. Panamer. Geogr. Hist. 1977.
19. M. A. García, **Con sabor a maguey**. Instituto de Biología. UNAM. México, 1998. pp. 8-22.
20. Academia Mexicana del Tequila, A.C. **Marcas de Tequila**. Cámara de la Industria Nacional del Tequila. <http://www.acamextequila.com/amt3/marcas.html>.
21. M.G. López, **Tequila Aroma**. Flavor Chemistry or Ethnic Foods; Shaidi, F., Ho, C.-T., Eds.; Plenum: Nueva York, 1999; p.211-217.
22. A. Manjares, M. Llana. **Quantification of the volatil components of tequilas and mezcals by gas chromatography**. Rev. Soc. Quim. Mex. 1969, 13 (1), pp. 1-5.
23. S. Incitti, A. Tommasini, E. Pascucci. **Determiration of minor constituents of spirits**. I. Tequila. Riv. Soc. Ital. Sci. Aliment. 1980, 9 (1), pp. 43-50.
24. L. Bluhm. Distilled Beverages. In Biotechnology, Vol. 5 **Food and Feed Production with Microorganisms**; G. Reed, Ed.; Verlag Chemie: Weinheim, Germany, 1983, Chapter 10.
25. S. M. Benn, & T.L. Peppard, **Characterization of Tequila Flavor by Instrumental and Sensory Analysis**. J. Agric. Food Chem. 44, 557-566, 1996.
26. M.G. López, & Dufour, J.P. **Tequilas: Charm analysis of Blanco, Reposado and Añejo Tequilas**. Unidad de Biotecnología e Ingeniería Genética de Plantas. ACS Symposium Series 782. Pub. 2001 by the American Chemical Society, pp 62-72.
27. M.G. López,; Mancilla-Margalli, N.A. **Maillard Compounds from the thermal processing of *Agave tequilana* Weber var. azul**. In Frontiers of Flavor Science; Shieberle, P., Engel, K.H.,Eds. Deutche Forschungsanstalt fur Lebensmittelchemie: Germany, 2000; pp 523-526.
28. N.A. Mancilla-Margalli, & López, M.G. **Generation of Maillard Compounds from Inulin during the Thermal Processing of *Agave tequilana* Weber var. azul**. J. Agric. Food Chem. 50, 806-812, 2002.
29. A. Jayatilaka, Salwa K. Poole, Colin F. Poole and Tina M.P. Chichila. **Simultaneous micro steam distillation/solvent extraction for the isolation of semivolatile flavor compounds from cinnamon and their separation by series coupled-column gas chromatography**. Analytica Chimica Acta, Vol. 302, Issues 2-3, p. 147-162, 1995.
30. G. L. Hook, G. L. Kimm. **Solid-phase microextraction (SPME) for rapid field sampling and analysis by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)**. Trends in Analytical Chemistry, Vol.21, No. 8, 2002. pp 534-543.
31. Z. Zhang, Yang, M.J., Pawliszyn, J. **Headspace Solid-Phase Microextration**. Analitical Chemistry, Vol 65, 1843-1852, 1993.

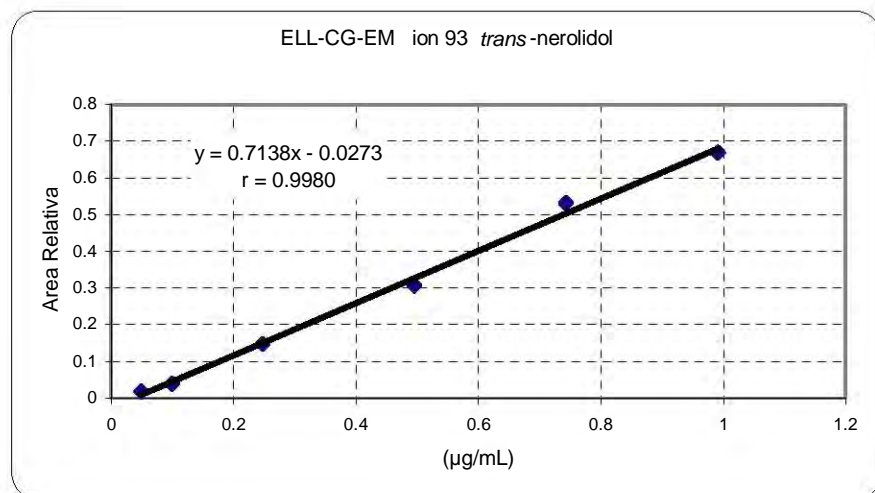
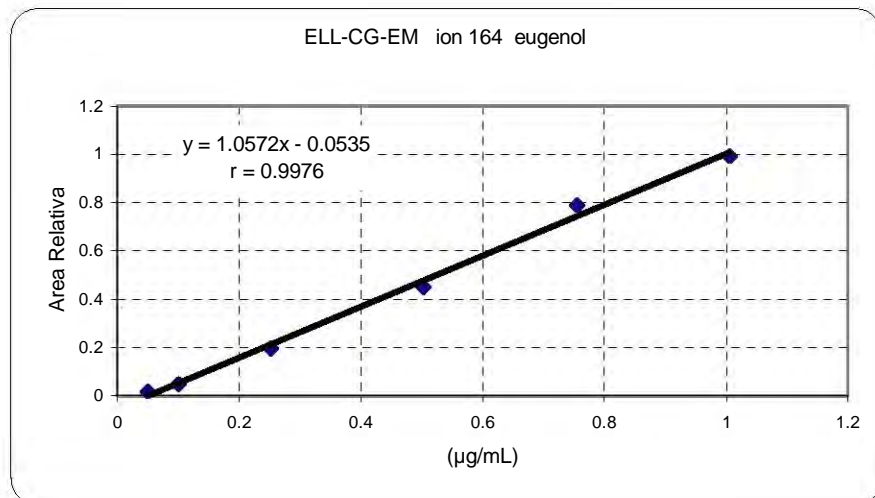
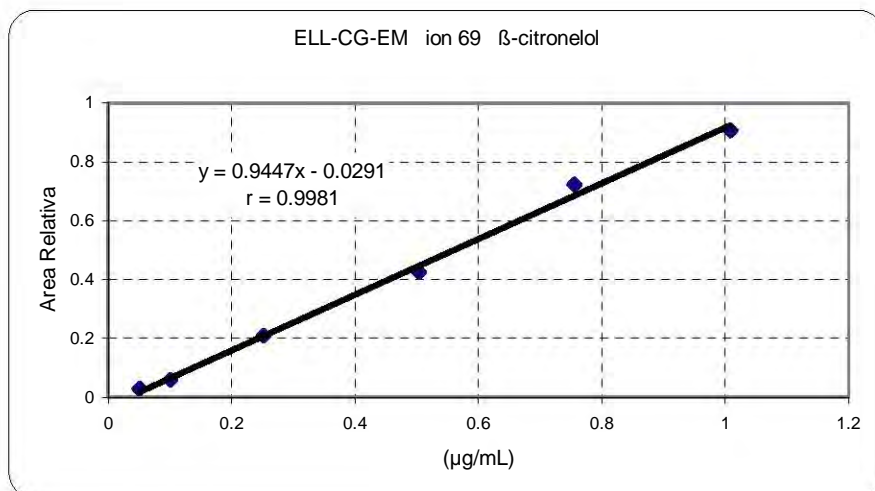
32. Z. Zhang, Yang, M.J., Pawliszyn, J. **Solid-Phase Microextraction**. Analytical Chemistry, Vol 66 No. 17, 1994.
33. J. Pawliszyn. **Solid Phase Microextraction. Theory and Practice**. Wiley-Vch Inc. 1997 U.S.A.
34. M. Díaz, M. Pérez, M. Cabezudo. **Supercritical carbon dioxide extraction of volatiles from spices. Comparision with simultaneous destillation-extration**. J. Chrom. A. Vol 947, Issue 1, 23-29, 2002.
35. H. Kataoka, H. L. Lord, J. Pawliszyn. **Applications of solid-phase microextraction in food analysis**. Journal of Chromatography A. 880 (2000), pp. 35-62.
36. L. Lepine, Gilbert, R. **“Analysis of Trihalomethanes in water”**. in Encyclopaedia of Analytical Chemistry. Applications, Theory and Instrumentation. pp.3479-3482 Vol 4 Environment:Water and Waste. Universitat de Valencia, España.
37. M. Hakkarainen, S. Karlsson. **“Gas Chromatography in analysis of polymers and rubbers”** in Encyclopaedia of Analytical Chemistry. Applications, Theory and Instrumentation. pp. 7612 Vol 12 Gas Chromatography. Universitat de Valencia, España.
38. M del C. Santillán. **Caracterización del Tequila por Cromatografía de Gases** Tesis Facultad de Química, UNAM, México, 1998.
39. T. Heide. **“Recent advances in the knowledge of alcoholic beverages”**. Food flavour Symposium. France, Centre de Perfeccionnement des Cadres des Industries Agricoles et Alimentaires. Naarden Int. NV, Netherlands, 27-45, 1983.
40. J. Mangas, R. Rodríguez, J. Moreno y D. Blanco. **“Volatiles in distillates of cider aged in american oak Word”**. J. Agric. Food Chem., 44, pp. 268-273, 1996.
41. HH. Baek, KR Cadwallader, E. Marroquin y JI Silva. **“Identification of predominant aroma compounds in Muscadine grape juice”**. J. Food Scien., 62 (2), pp. 249-252, 1997.
42. D. de la Calle, M. Reinchenbacher. **Analysis of Wine Bouquet Components Using Headspace Solid-Phase Microextraction-Capillary Gas Chromatography**. J. High Resol. Chromatogr. Vol. 21, 373-377 (1998) No. 7.
43. B. Vallejo-Córdoba, A. González-Córdoba, MC. Estrada-Montoya. **Tequila Volatile Characterization and Ethyl Ester Determination by Solid Phase Microextraction Gas Chromatography/Mass Spectrometry Analysis**. J. Agric. Food Chem. (2004), 52, 5567-5571.
44. Mc Nair, H. M. & Miller, J. M. **Basic Gas Chromatography**. Ed. John Wiley & Sons, Inc. 1ª Edición. U. S. A., 1998.
45. J. Jáuregui, F. **Mass Spectrometry Techniques and Applications**. Ed. John Wiley & Sons, Inc. U. S. A., 1971, p. 35-45.
46. Yong Chen, Chi-Tang Ho. **Flavor analysis in food**. in Encyclopaedia of Analytical Chemistry. Applications, Theory and Instrumentation. pp.3983.Vol. 5 Food. Universitat de Valencia, España.

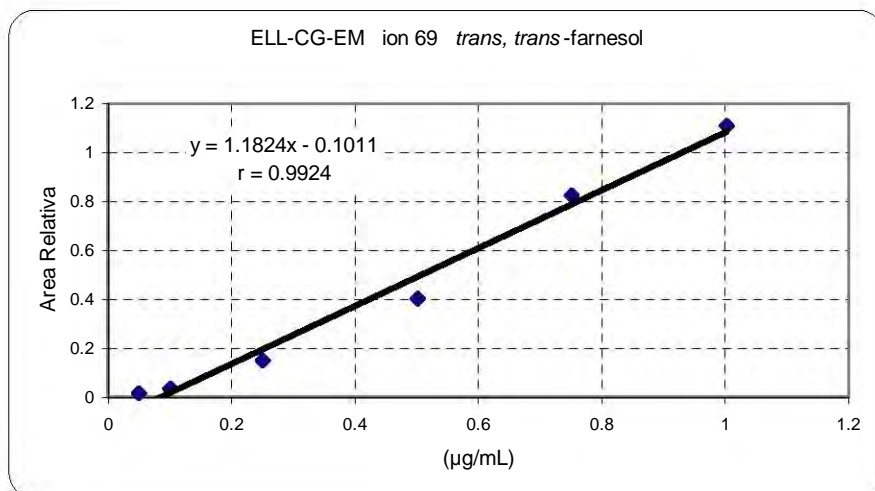
47. P.T., Palmer. **Gas Chromatography/Mass Spectrometry**. San Francisco State University USA. in Encyclopaedia of Analytical Chemistry. Applications, Theory and Instrumentation. pp.11728.Vol. 13 Food. Universitat de Valencia, España.
48. D.A. Skoog, Holler, F. J., Mieman, T.A. **Principios de Análisis Instrumental**, Mc Graw Hill, 5a. edición, España, 2001.
49. G.B. Lockwood. **Techniques for gas chromatography of volatile terpenoids from a range of matrices. Review**. Journal of Chromatography A, 936 (2001), pp. 23-31.
50. J.J. Rodríguez-Bencomo, J.E. Conde, F. García Montelongo, J.P. Pérez Trujillo. **Determination of mayor compounds in sweet wines by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography**. Journal of Chromatography A, 991 (2003) 13-22.
51. R. López, M. Aznar, J. Cacho, V. Ferreira. **Determination of minor and trace volatile compounds in wine by solid-phase extraction and gas chromatography with mass spectrometric detection**. Journal of Chromatography A, 966 (2002) 167-177.
52. G. Fitzgerald, K. J. James, K. MacNamara, M.A. Stack. **Characterization of whiskeys using solid-phase microextraction with gas chromatography-mass spectrometry**. Journal of Chromatography A, 896 (2000) 351-359.
53. J. N. Miller, J. C. Miller. **Estadística y Quimiometría para Química Analítica**. Prentice Hall 4ª. Edición 2002.
54. Bebidas Mexicanas. **Edición especial dedicada al Tequila**. Vol 5 No. 1 Febrero-Marzo 1996. ed. Alfa Editores Técnicos, S.A. de C. V. México, D.F.
55. Guía México Desconocido. **Bebidas Nacionales**, Edición especial No. 18, 1994, pp. 10-19, 33-41. Editorial Jilguero, S.A. de C. V., México, D.F.
56. El Financiero: **“Tequila, Pasado, Presente y Futuro de una bebida emblemática”**, Suplemento Comercial, Junio 2005, El Financiero, S. A. de C. V. México, D.F.

9. Anexo

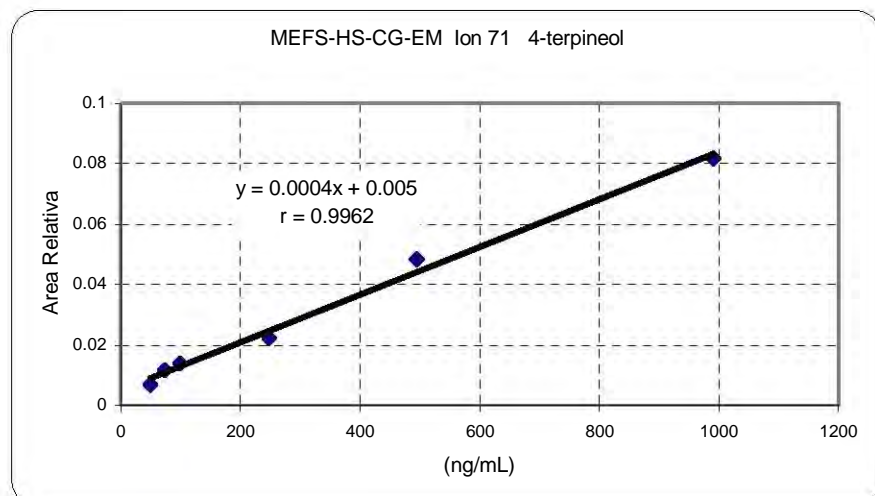
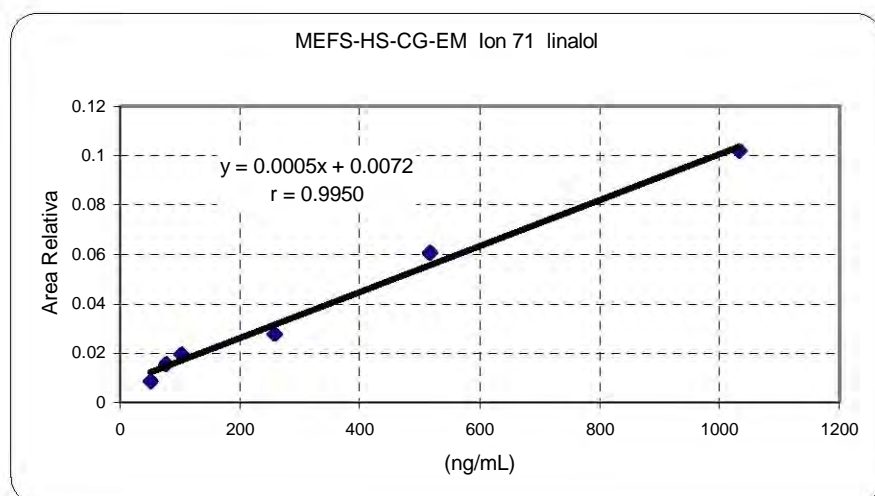
9.1 Curvas de calibración relativas por ELL-CG-EM

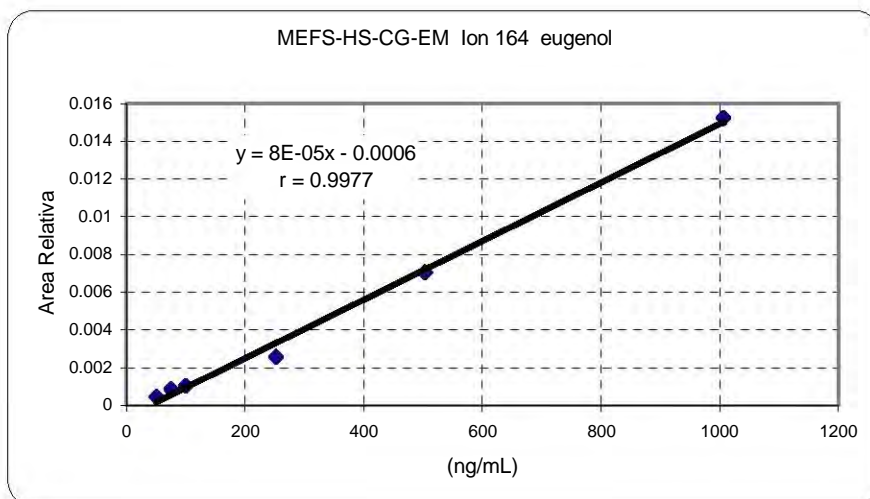
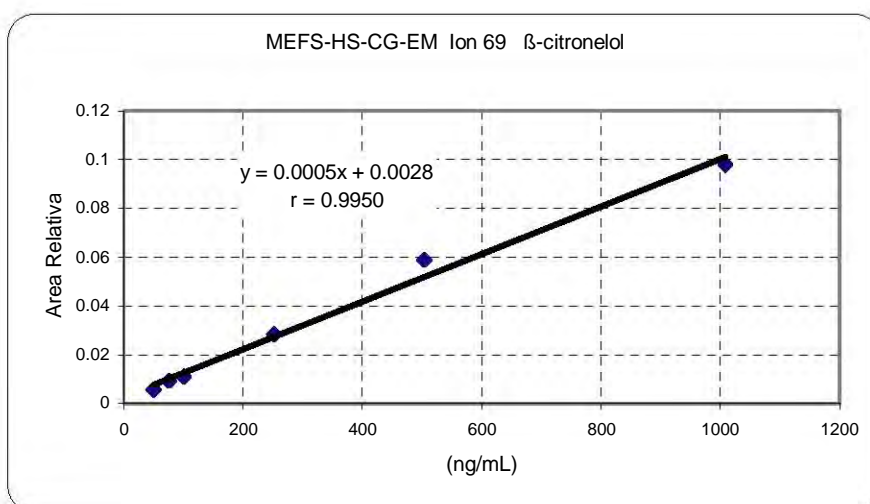
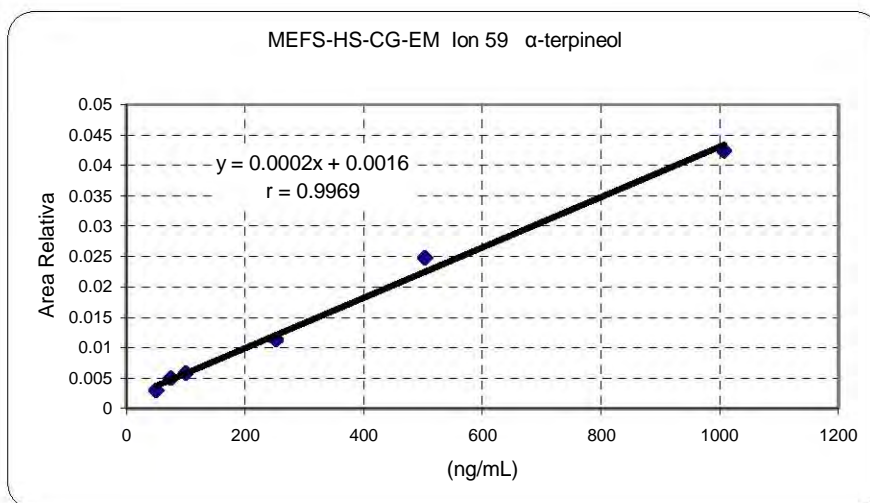


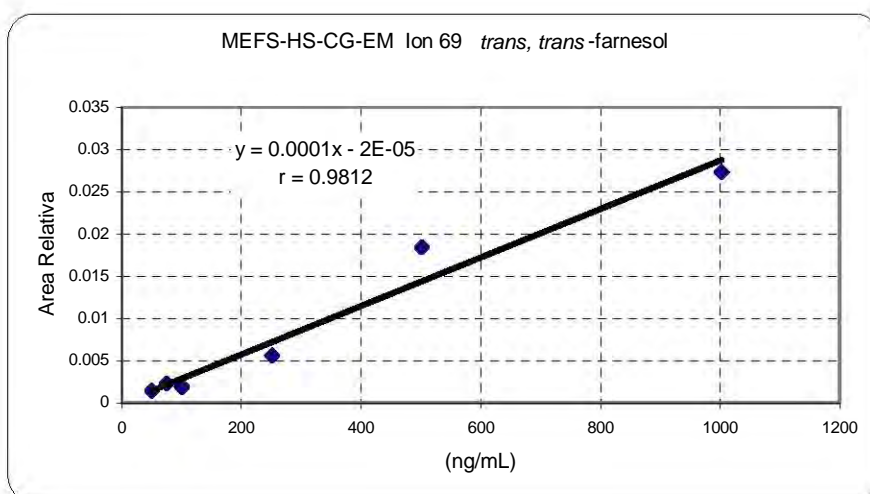
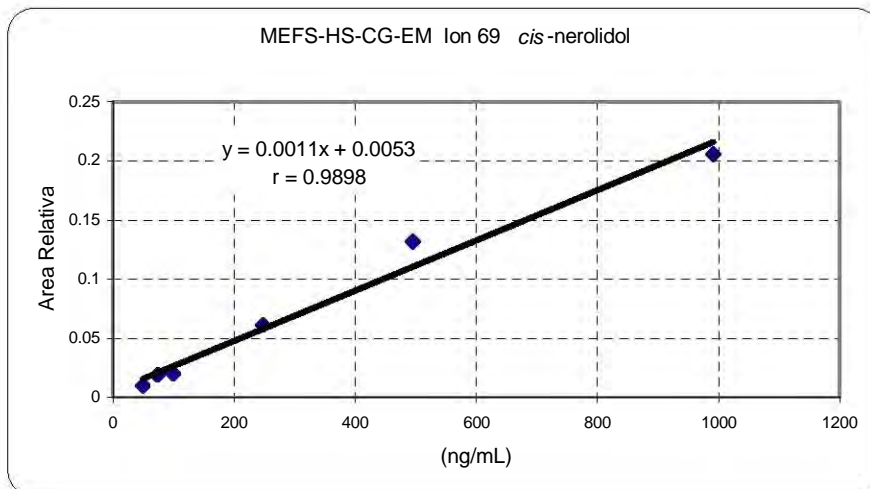




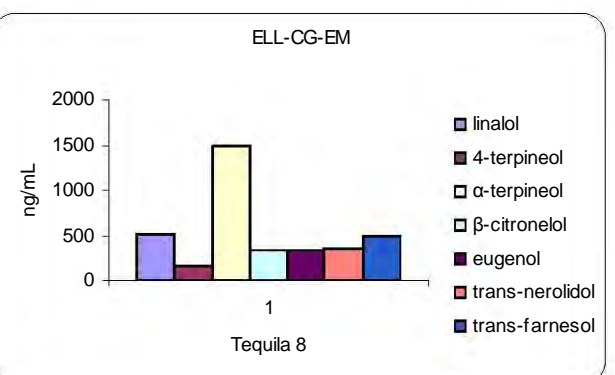
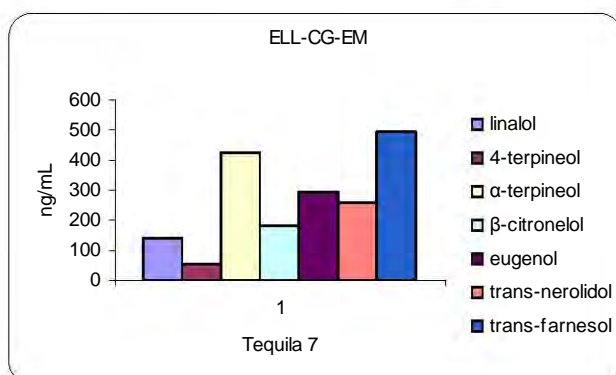
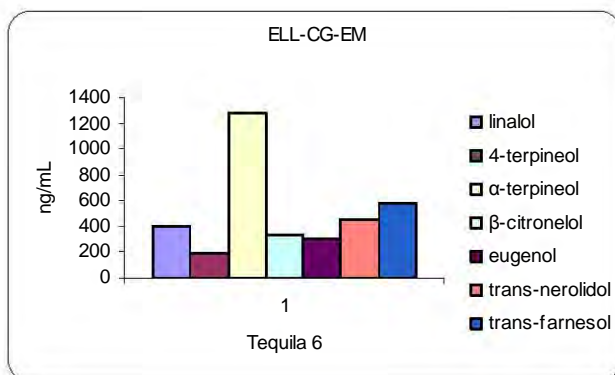
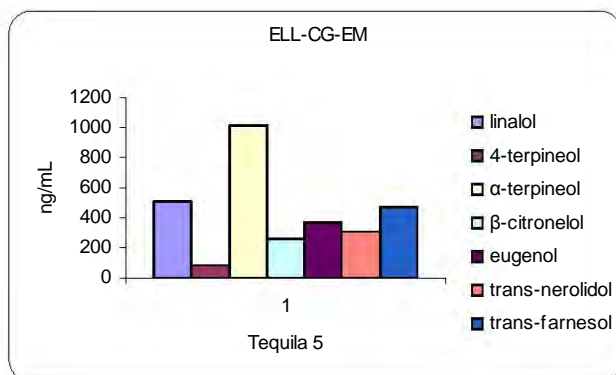
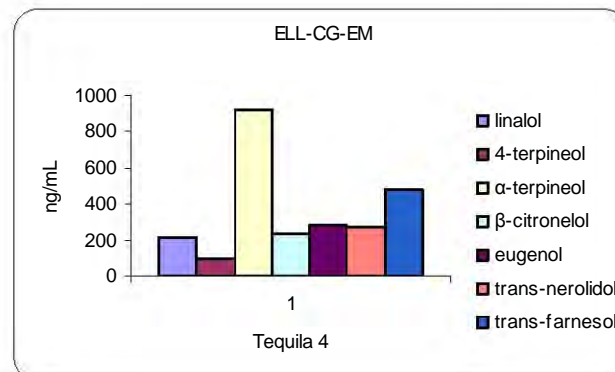
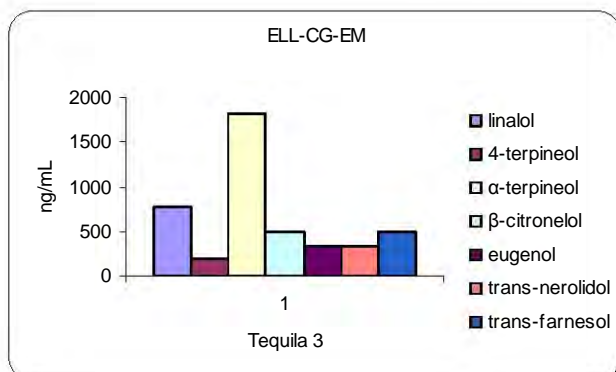
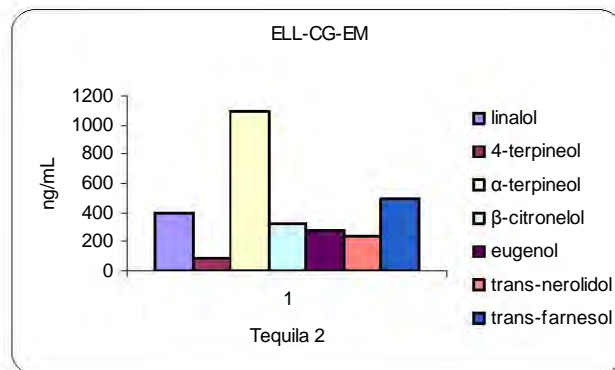
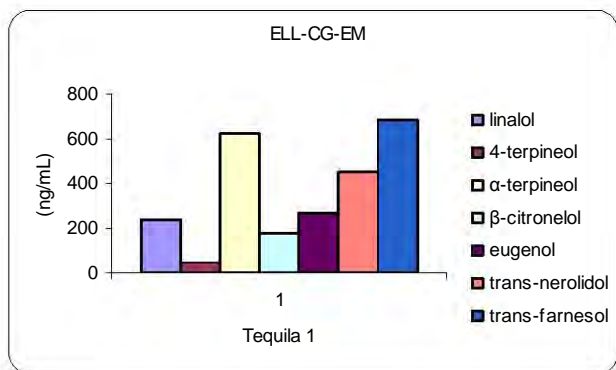
9.2 Curvas de calibración relativas por MEFS-HS-CG-EM



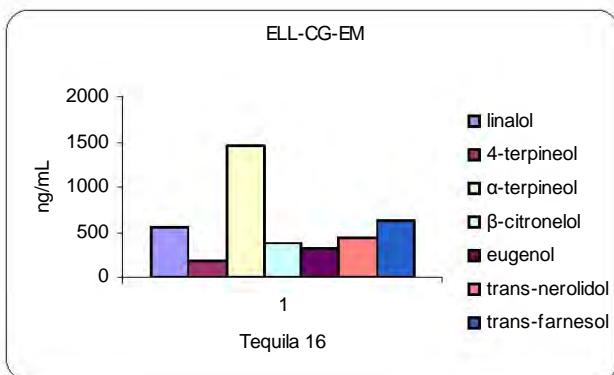
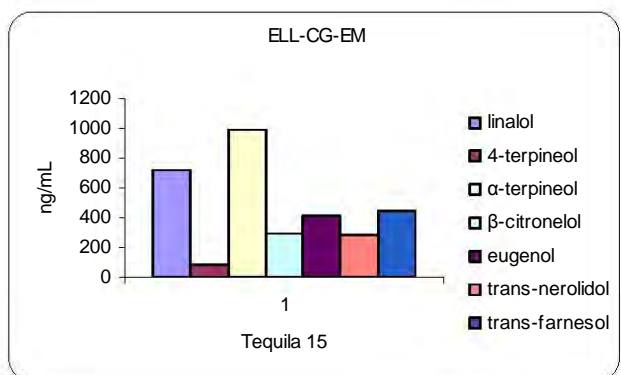
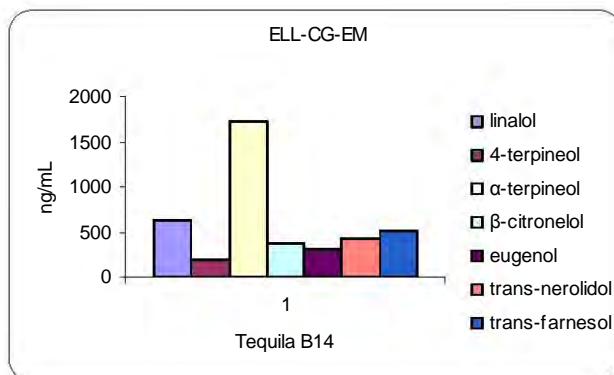
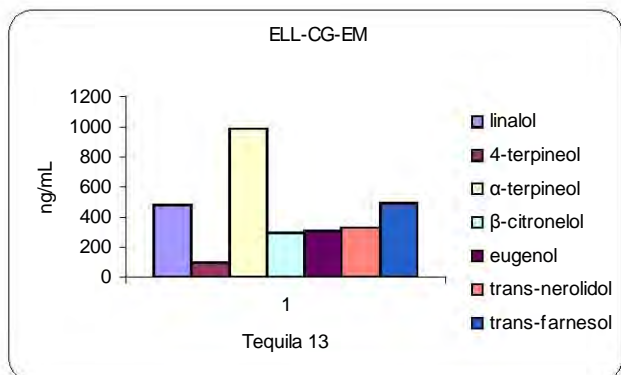
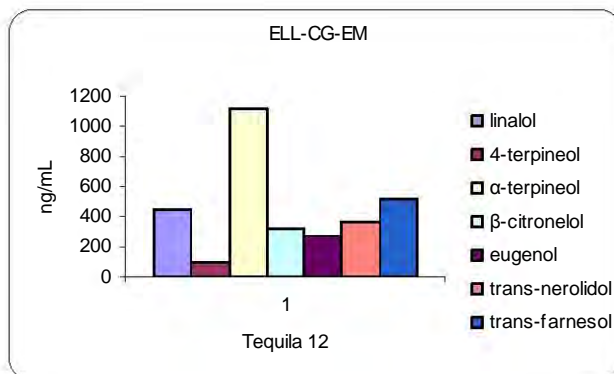
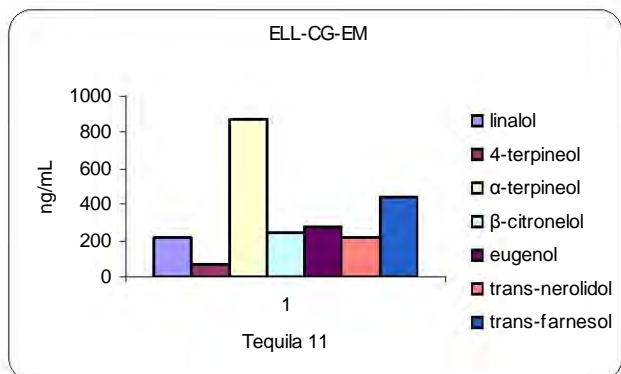
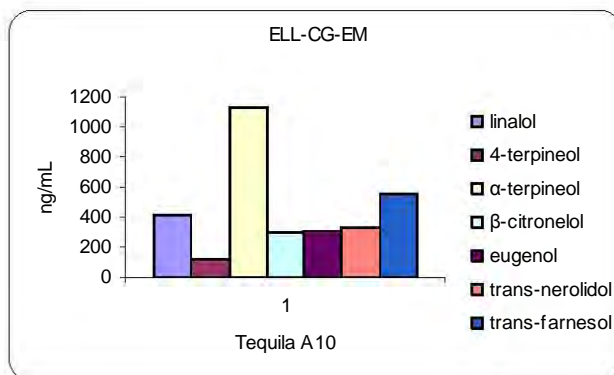
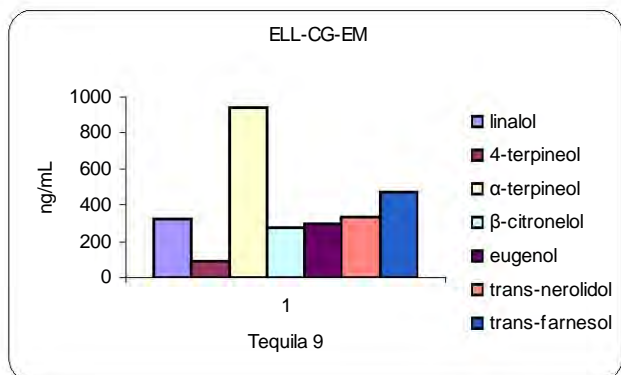




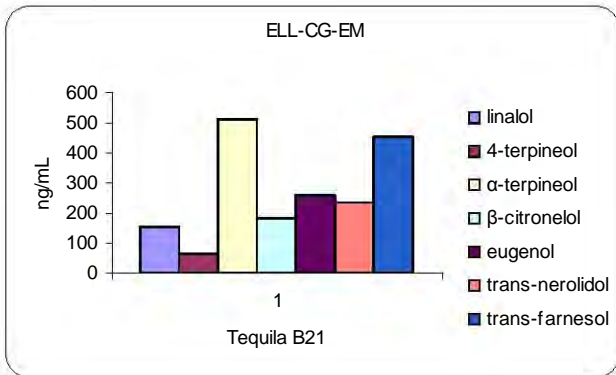
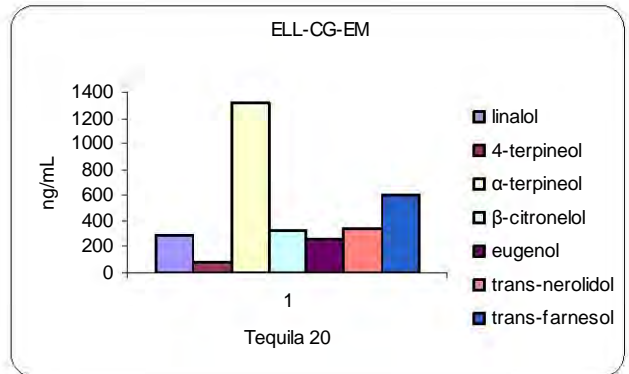
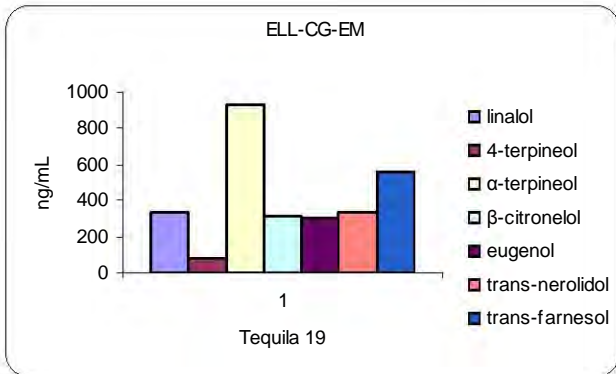
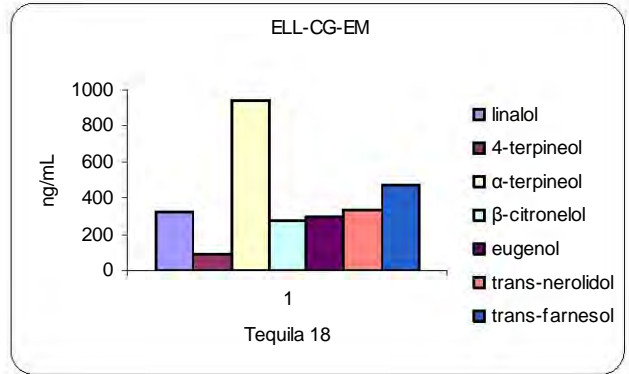
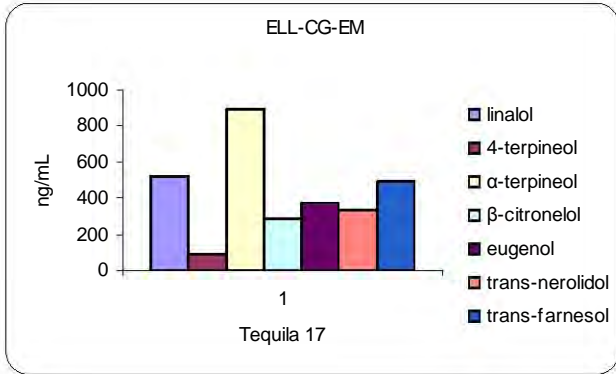
9.3 Concentración de terpenos por ELL-CG-EM en tequila



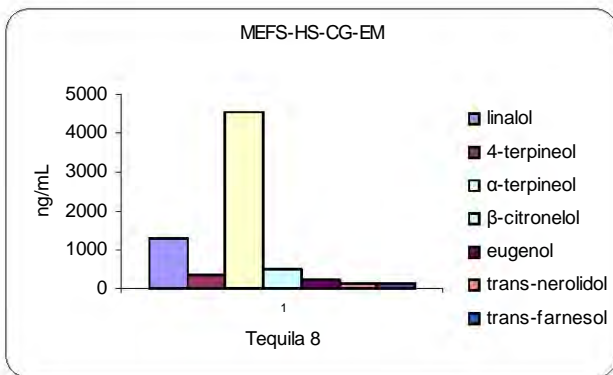
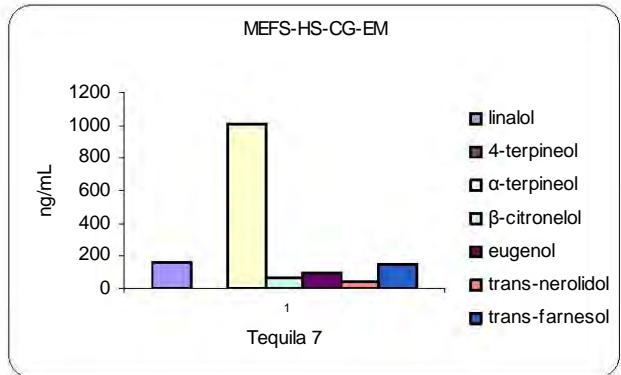
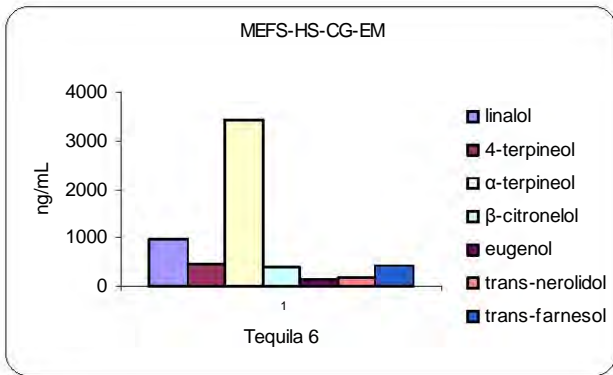
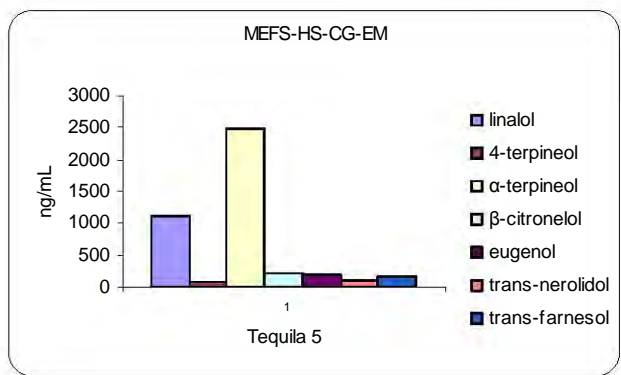
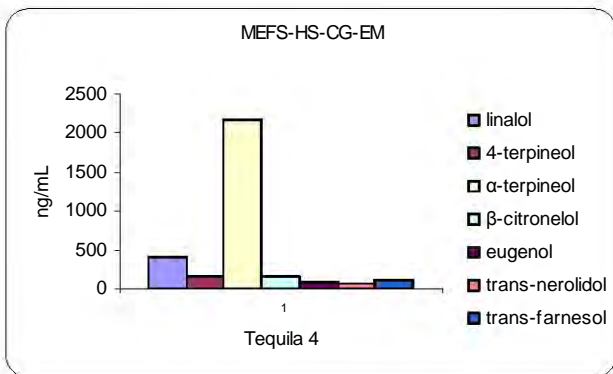
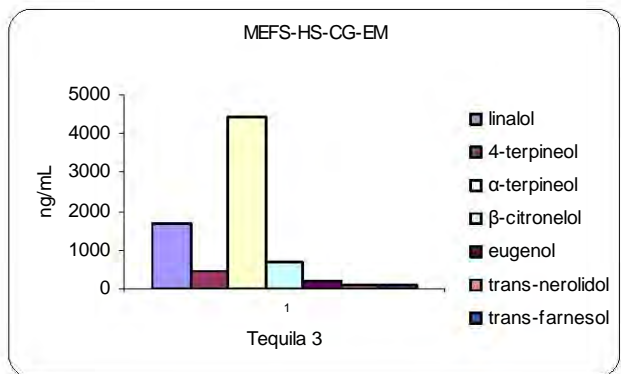
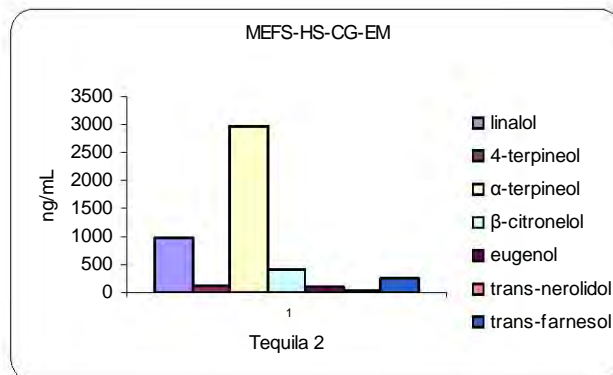
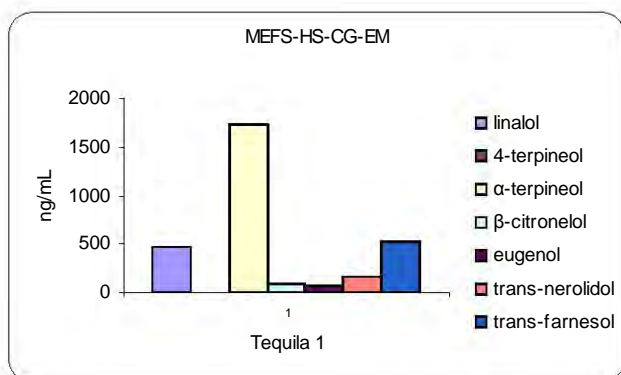
Determinación de Terpenos en Tequila 100% Agave



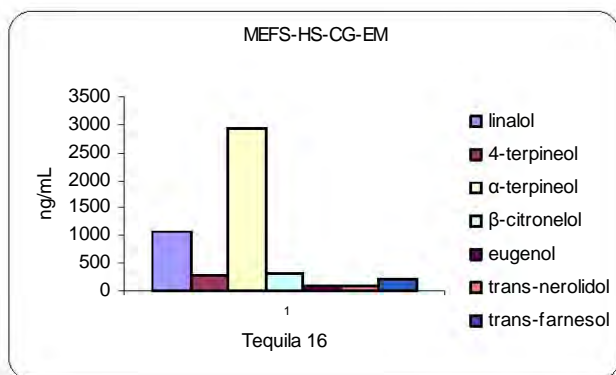
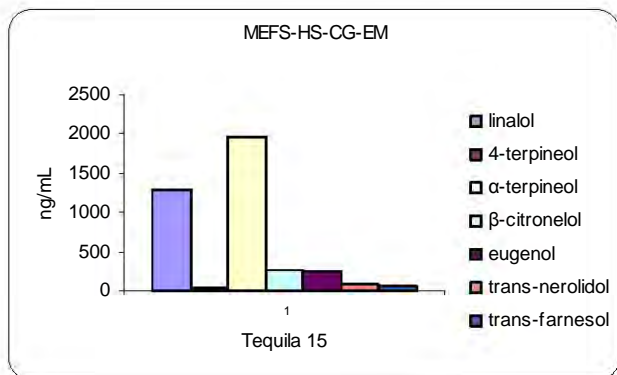
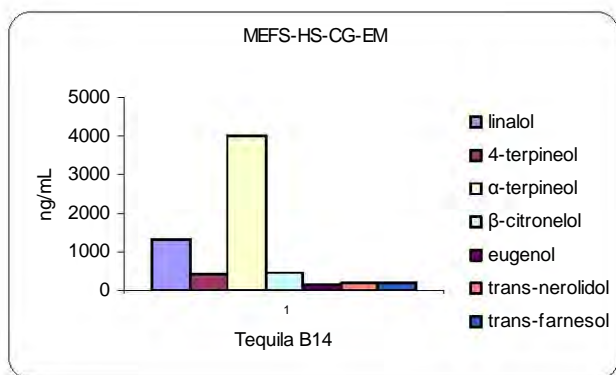
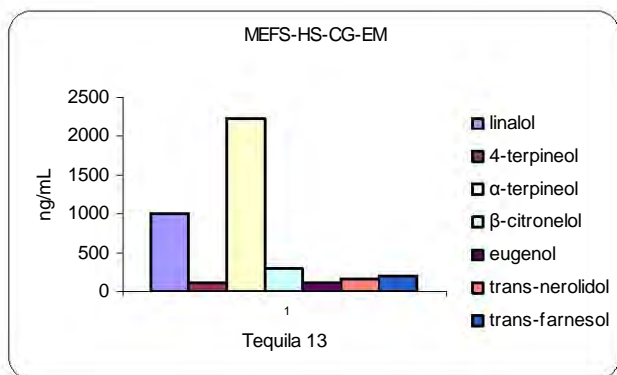
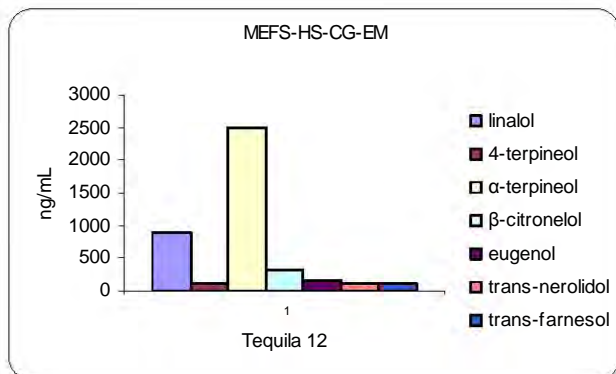
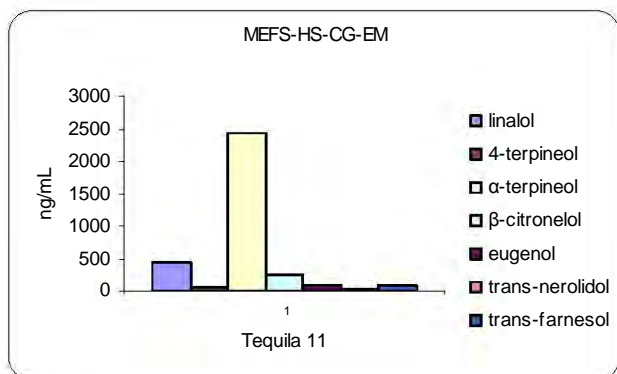
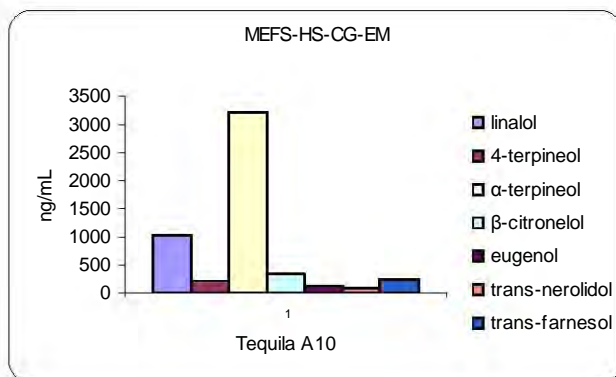
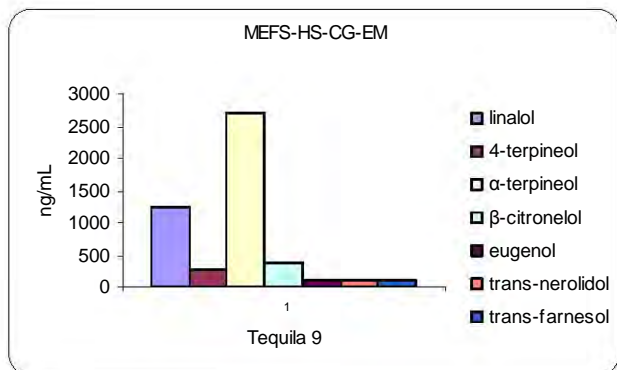
Determinación de Terpenos en Tequila 100% Agave



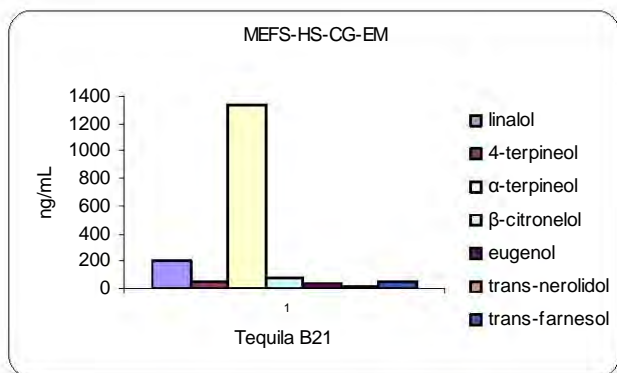
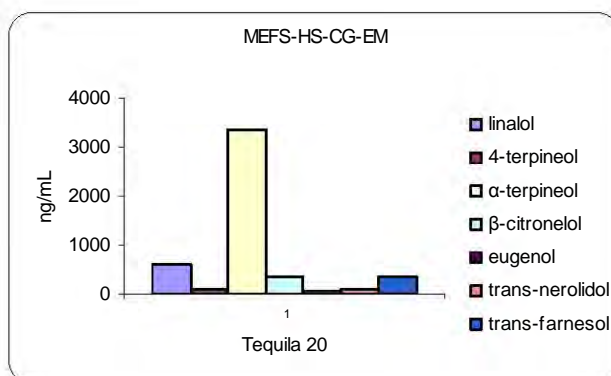
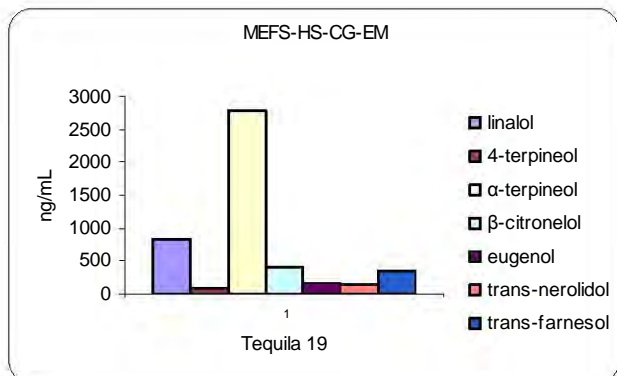
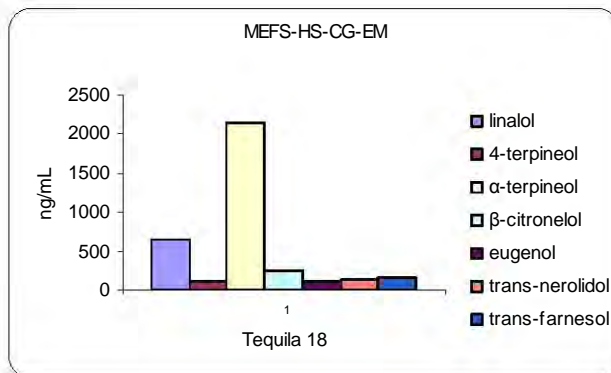
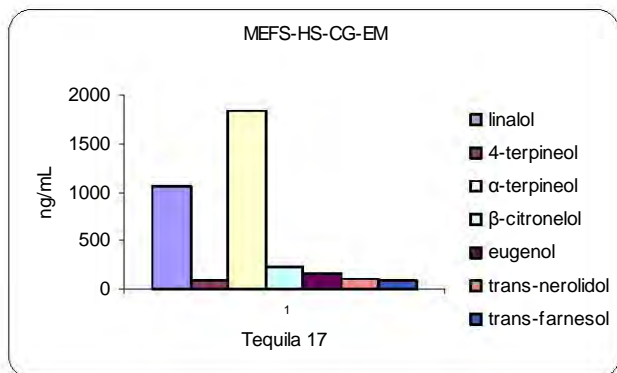
9.4 Concentración de terpenos por MEFS-HS-CG-EM en tequila



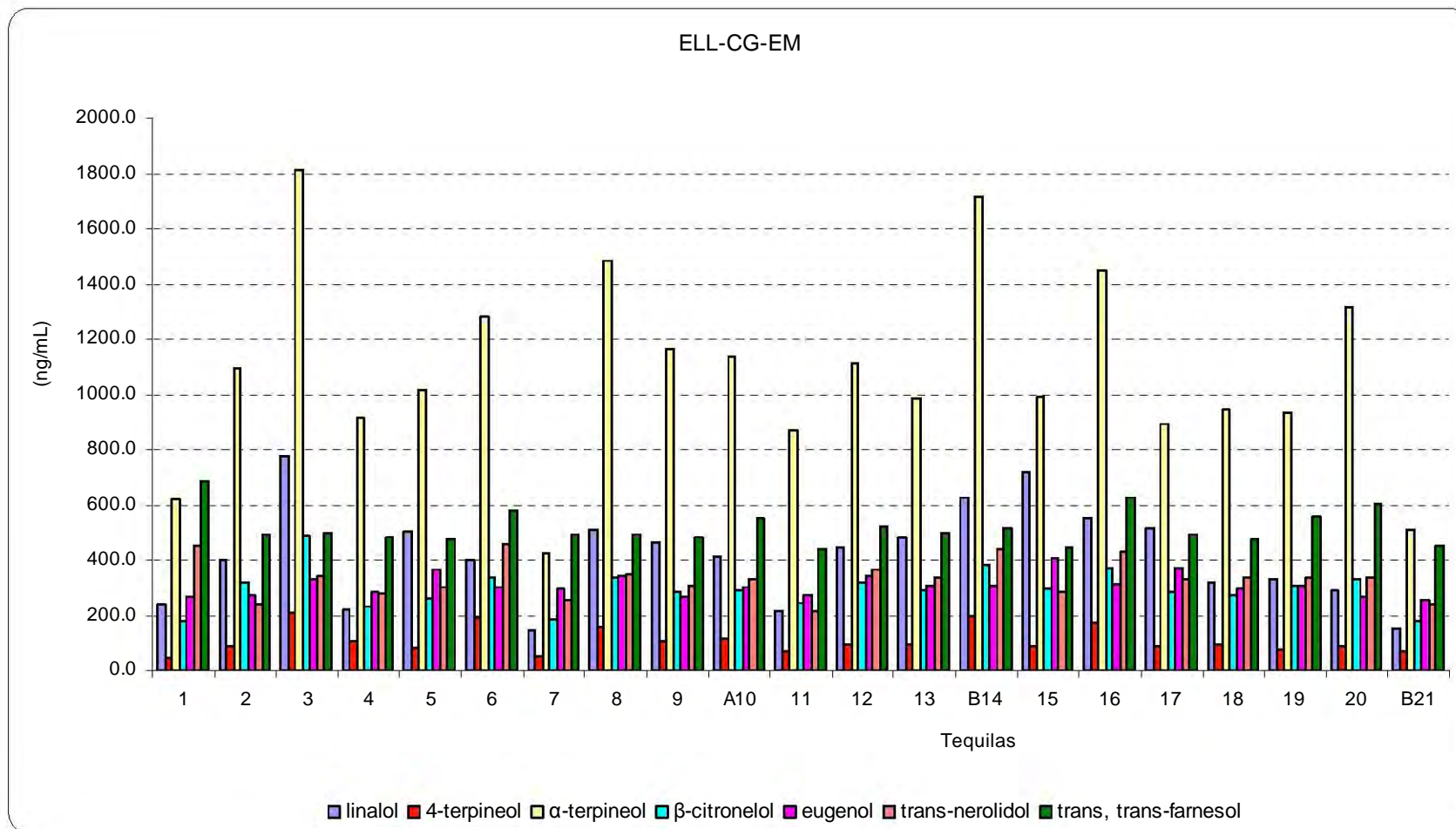
Determinación de Terpenos en Tequila 100% Agave



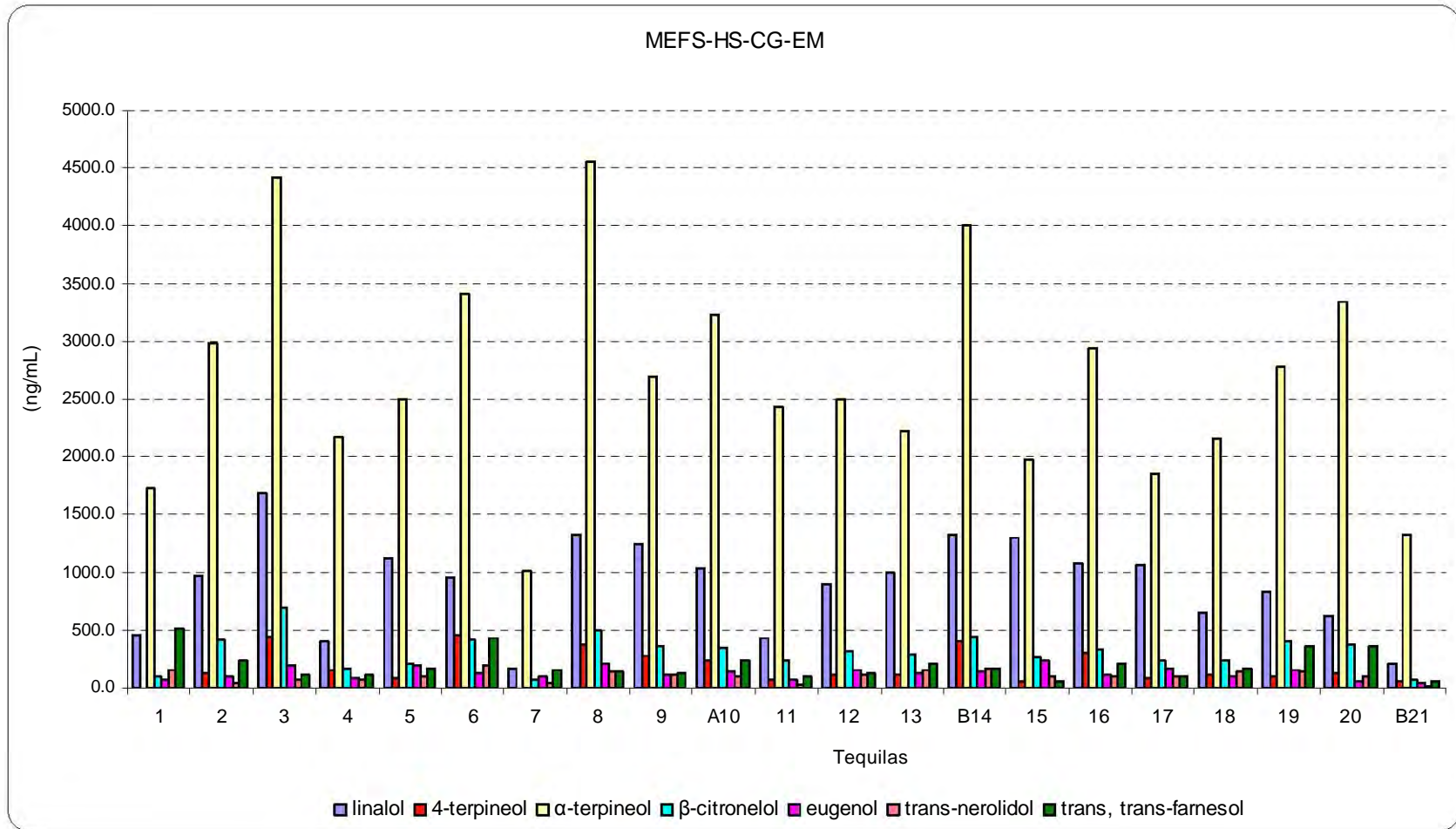
Determinación de Terpenos en Tequila 100% Agave



9.5 Perfil de Terpenos por ELL-CG-EM en tequilas



9.6 Perfil de Terpenos por MEFS-HS-CG-EM en tequilas



9.7 Análisis de terpenos por ELL-CG-EM y MEFS-HS-CG-EM en tequila

