

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA**

**DETERMINACIÓN DE LOS PRINCIPALES COMPUESTOS ORGÁNICOS
DEL MEZCAL POR CROMATOGRFÍA DE GASES CAPILAR –
ESPECTOMETRÍA DE MASAS**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO EN ALIMENTOS

PRESENTA

REYES DELGADO DAVID ALEJANDRO

MÉXICO, DF.

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.

Jurado asignado:

Presidente Prof. Santiago Capella Vizcaíno

Vocal Prof. Raúl Aguilar Caballero

Secretario Prof. Araceli Peña Álvarez

1er Suplente Prof. Agustín Reyo Herrera

2do Suplente Prof. Francisco Ruiz Terán

Sitio donde se desarrollo el tema:

Laboratorio 101 Departamento de Química Analítica, DEPg, Facultad de Química, UNAM.

Asesor del Tema

Dra. Araceli Peña Alvarez

Sustentante

David A. Reyes Delgado

Dedico este trabajo a:

DIOS

Por haberme dado fuerza para salir adelante y unos padres maravillosos

Mis Padres
Alejandro Reyes Escobar
Juana María Delgado Salazar

Gracias por todo lo que me han dado, su amor y sacrificio nunca será en vano, estaré agradecido con ustedes toda mi vida.

Mis Hermanos
Diego y Alejandra

Nunca se dejen vencer por ningún obstáculo, esfuércense, dediquen su vida a lo que más quieren y salgan siempre adelante.

El amor de mi vida

Gaby

Gracias por estar siempre conmigo, por ayudarme, por quererme, juntos lo logramos.

Que Dios te Bendiga

MI MÁS SINCERO AGRADECIMIENTO A:

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO Y
EN ESPECIAL A LA FACULTAD DE QUÍMICA**

Por haberme brindado los medios necesarios para lograr uno de los
objetivos más importantes en mi vida

COLEGIO DE PROFESORES

Por la beca otorgada en la Cátedra Fernando Orozco Díaz al proyecto: Determinación
de los principales compuestos orgánicos del mezcal por CG-EM

COORDINACIÓN DE SUPERACIÓN ACADÉMICA

Por el apoyo recibido mediante el subprograma 127: Jóvenes a la investigación
otorgado al proyecto: Determinación de los principales compuestos orgánicos del
mezcal por CG-EM

Se agradece el apoyo otorgado por el **PAPIIT-DGAPA-UNAM**
al proyecto: IN207006

“Caracterización de los principales compuestos volátiles y semivolátiles
del Agave y Mezcal”.

MIL GRACIAS A:

Dra. Araceli Peña Álvarez

Gracias por todo el apoyo brindado, sin usted no podría haber llevado acabo este trabajo

M en C Carmen Labastida Rubio

Gracias por sus enseñanzas y su enorme paciencia



INDICE

	Página
Resumen	1
1. Introducción	2
2. Antecedentes	3
2.1 Origen del mezcal.....	3
2.2 Elaboración.....	3
2.3 Definición y Legislación.....	4
2.4 Comercialización.....	5
2.5 Especificaciones.....	5
2.6 Química.....	6
3. Fundamentos analíticos	14
3.1 Cromatografía de gases.....	14
3.2 Espectrometría de masas.....	15
3.3 Acoplamiento CG-EM.....	16
3.4 Técnicas de concentración y análisis de aroma.....	17
2.4.1 Extracción líquido-líquido.....	17
2.4.2 Microextracción en fase sólida.....	18
4. Objetivos	22
4.1 General.....	22
4.2 Particulares.....	22
5. Desarrollo experimental	23
5.1 Materiales y reactivos.....	23
5.2 Muestras.....	24
5.3 Metodología.....	24
5.3.1 Determinación de terpenos por ExLL.....	24
5.3.2 Determinación de terpenos y ésteres por MEFS.....	26
5.3.3 Determinación de alcoholes por CG.....	27
6. Resultados y discusión	29
6.1 Principales compuestos volátiles y semivolátiles en el mezcal.....	29
6.2 Determinación de terpenos por ExLL.....	32
6.3 Determinación de terpenos por MEFS.....	39
6.4 Comparación de resultados entre ExLL y MEFS.....	44
6.5 Determinación de ésteres etílicos de ácidos grasos.....	49
6.6 Determinación de alcoholes.....	55
7. Conclusiones	63
8. Anexos	65
8.1 Tabla de resultados completos.....	65
8.2 Cromatogramas.....	73
8.3 Espectros de masas de los compuestos identificados.....	83
8.4 Prueba t de Student.....	88
9. Bibliografía	90

Resumen

Se aplicaron dos metodologías^{1,2} para la extracción y concentración de compuestos orgánicos volátiles y semivolátiles en mezcal, así como para la cuantificación de terpenos y ésteres etílicos de ácidos grasos: Extracción Líquido-Líquido (ELL) y Microextracción en Fase Sólida (MEFS) seguidas de Cromatografía de Gases (CG) y Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM). También se desarrolló y optimizó un procedimiento para el análisis de alcoholes y acetato de etilo.

Se analizaron 9 muestras de mezcal elaboradas con diferente variedad de agave (*A. cupreata*, *A. salmiana* y *A. angustifolia*) y se identificaron entre 128 y 284 compuestos orgánicos volátiles; muchos de ellos en los límites de detección o con resolución insuficiente sin embargo, se obtuvo un perfil de congenéricos para el mezcal. Los grupos de compuestos más numerosos son los ésteres, terpenos y compuestos relacionados así como alcoholes.

Se detectaron con confiabilidad 19 terpenos, 10 alcoholes y 8 ésteres etílicos de ácidos grasos de los cuales se cuantificaron: linalol, 4-terpineol, α -terpineol, β -citronelol, geraniol, eugenol, *cis*-nerolidol, *trans*-farnesol; metanol, propanol, isobutanol, alcohol isoamílico, hexanol, feniletanol; hexanoato, heptanoato, octanoato, nonanoato decanoato, dodecanoato y tetradecanoato de etilo.

1. Introducción

El mezcal es una bebida alcohólica representativa de nuestra cultura, con una importancia económica y social marcada, principalmente en zonas rurales en desarrollo, no obstante se conoce muy poco de su composición lo que dificulta el poder controlar su calidad así como proteger su denominación de origen.

A pesar de la existencia de tecnología avanzada aplicada a la elaboración de bebidas alcohólicas, en la actualidad el mezcal sigue produciéndose de manera artesanal, con herramientas y recursos escasos. Por esta y otras razones el mezcal se ha mantenido como una bebida muy tradicional y ha sido poco estudiada, encontrándose pocos trabajos publicados acerca de él ^{3,4}.

No obstante, en México existe regulación para este producto mediante las normas NOM-070-SCFI-1994 y NMX-V-005-NORMEX-2005 las cuáles establecen especificaciones para el contenido de alcoholes superiores, metanol y etanol, así como los métodos de prueba. Estos métodos involucran procedimientos complejos que requieren gran cantidad de muestra, largo tiempo de análisis y generan una cantidad importante de residuos.

De todo lo anterior surge la importancia de caracterizar los principales compuestos orgánicos, para ello se requiere aplicar y desarrollar metodologías que permitan la identificación y cuantificación de estos compuestos.

El objetivo de este trabajo es determinar los principales compuestos orgánicos volátiles en mezcal aplicando y desarrollando metodologías que sean rápidas, sensibles y confiables que nos permitan conocer la química del mezcal para contribuir en la mejora de la calidad del producto así como en la protección de su denominación de origen.

2. Antecedentes

2.1 Origen del mezcal

La palabra mezcal proviene del náhuatl *mexcalmetl*, que significa agave. A la llegada de los españoles, en 1519, el pulque era la única bebida alcohólica que se conocía. Una vez que se introdujo en México el proceso de destilación surgieron bebidas de alto grado alcohólico obtenidas del agave a las que originalmente llamaron "vino de agave" o "vino de mezcal", de donde surgió el tequila a finales de 1800.

2.2 Elaboración

La elaboración del mezcal empieza cuando, después de 8 o 9 años, la siembra del maguey llega a su madurez. Para preparar el maguey, se cortan las pencas hasta dejar limpia la "piña", llamado así el tallo por el aspecto que adquiere después del corte. Se selecciona según su tamaño, para facilitar su manejo y cocción dentro de un horno cónico hecho en la tierra. Éste es calentado previamente a base de leña, además de agregar piedras de río para concentrar el calor. Las piñas se acomodan en el horno y se cubren con bagazo y mantas durante un período de 3 días. Durante este período se da la transformación de la inulina presente en el agave a azúcares de menor peso molecular y que son fundamentales para el siguiente paso en la elaboración.

Cuando la cocción de las piñas llega al punto ideal, éstas son removidas y colocadas dentro de una tahona que es arrastrada por un burro o caballo para machacar el maguey. El maguey machacado se coloca dentro de barricas de madera, con capacidad de 300 galones, y se añade un porcentaje de agua (5 a 10%).

El tepache, resultado de la mezcla, se deja descubierto para fermentación natural, sólo con su propia levadura. Este proceso dura generalmente de 4 a 10 días llegando a 20 días. El tepache, con los sólidos y líquidos, es transferido a un alambique de cerámica o de cobre. Un sombrero de cobre se coloca arriba del alambique y la mezcla se calienta, evapora y condensa lentamente a través de un serpentín que gota a gota deposita el mezcal en un recipiente de recolección. La fibra es retirada del alambique y el alcohol puro de la primera destilación se coloca nuevamente en el alambique y el proceso de destilación se repite. El líquido resultante es el mezcal⁵.

2.3 Definición y legislación

La definición que otorga la Norma Oficial Mexicana al mezcal es: “bebida alcohólica que se obtiene por la destilación y rectificación de los mostos (o jugos) preparados directamente con los azúcares extraídos de las cabezas maduras de los agaves, mismas que son previamente cocidas y sometidas a fermentación alcohólica⁶. Cuando uno degusta el mezcal encuentra diferentes variedades, presentaciones, consistencias, distintos colores y sabores, aunque la Norma Oficial Mexicana (*NOM-070-SCFI-1994. Bebidas alcohólicas-Mezcal-Especificaciones*) hace únicamente una diferencia, basada en el porcentaje de agave, estas son:

1. Mezcal 100% de agave
2. Mezcal que se encuentra adicionado con otros azúcares (a los que se le adiciona hasta 40%).

Ambas son susceptibles de clasificarse según las siguientes categorías:

- Añejo o añejado: es cuando se somete a un proceso de maduración por lo menos de doce meses, en barricas de roble blanco o encino.
- Reposado: es aquel que se deja por lo menos dos meses en recipientes, para su estabilización, puede ser abocado.
- Mezcal joven: es aquel obtenido directamente del proceso.
- Abocado: Procedimiento para suavizar el sabor del mezcal, mediante la adición de uno o más productos naturales, saborizantes o colorantes.

El mezcal, al igual que el Cognac, Champagne y Oporto, entre otras, sólo es posible obtenerlo en una región, la cual fue registrada el 9 de marzo de 1995 por la Organización Mundial de la Propiedad Intelectual (OMPI) con sede en Ginebra Suiza. En la declaración de protección (Denominación de Origen, Mezcal), se establece como región geográfica las comprendidas por los estados de Oaxaca, Guerrero, San Luís Potosí, Zacatecas y Durango (Figura 1).

Posteriormente el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (IMPI) otorga la denominación a Guanajuato y Tamaulipas⁷.



Figura 1. Zonas geográficas para la denominación de origen del mezcal: 1) Durango, 2) Tamaulipas, 3) Zacatecas, 4) San Luis Potosí, 5) Guanajuato, 6) Guerrero y 7) Oaxaca

2.4 Comercialización

La comercialización del mezcal será a granel y en envases con las especificaciones de la Norma Mexicana en los tipos 100% agave o mezcal y sólo se llevará a cabo en la República Mexicana; para el Mercado Internacional no se llevará a cabo la venta a granel y únicamente se exportará en envases hasta de 5 L, envasado y etiquetados de origen cumpliendo también con las observaciones establecidas en la Norma Mexicana.

2.5 Especificaciones

El mezcal al ser un producto regulado por una norma oficial, debe de cumplir ciertos requisitos (Tabla 1) para ser considerado como tal.

Tabla 1. Especificaciones del mezcal (NOM-070-SCFI-1994)

ESPECIFICACIONES	MINIMO	MAXIMO
% de alcohol en volumen a 20°C	36,0	55,0
Extracto seco g/l	0,2	10,0
Miligramos por 100 centímetros cúbicos referidos a alcohol anhidrido		
Acidez total (como ácido acético)		170,0
Alcoholes superiores mg/100 ml	100,0	400,0
Metanol mg/100 ml	100,0	300,0

2.6 Química del mezcal

Durante el proceso de producción del mezcal se llevan a cabo una gran cantidad de reacciones químicas y bioquímicas las cuáles dan a este producto destilado una gran riqueza en cuanto a diversidad de compuestos presentes. Muchas de estas reacciones son llevadas a cabo por enzimas presentes en el agave y en las levaduras que realizan la fermentación, mientras que otras reacciones simplemente son el resultado de las condiciones del medio.

2.6.1 Terpenos

En las bebidas alcohólicas, el sabor característico está dado principalmente por el etanol, producto de la fermentación, sin embargo otras moléculas orgánicas presentes en concentraciones muy bajas contribuyen al perfil de sabor de las bebidas. Entre estos compuestos se reconocen algunos como terpenos, alcoholes, aldehídos, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, etc. Los terpenos se consideran metabolitos secundarios de las plantas⁸.

Desde hace mucho tiempo se sabe de la existencia de estos compuestos que en conjunto forman parte de los aceites esenciales. Químicamente los terpenos son moléculas orgánicas relativamente pequeñas y volátiles, con una amplia diversidad de estructuras. Se han encontrado distintos terpenos, algunos contienen oxígeno, otros son hidrocarburos, algunos son moléculas de cadena abierta, otros más son cíclicos, etc⁹.

Los terpenos se clasifican de acuerdo al número de átomos de carbono presentes, lo cual corresponde a unidades de isopreno (unidad correspondiente a segmentos repetidos de 5

carbonos) enlazadas de diversas formas y con la presencia de grupos funcionales como carbonilos, éteres y alcoholes. Se les llama monoterpenos a los que tienen 10 átomos de carbono; sesquiterpenos a los que contienen 15 átomos de carbono y diterpenos a los que contienen 20 átomos de carbono (Figura 2). Los terpenos constituyen algunos de los compuestos alílicos ramificados de los volátiles del sabor y aroma natural, pero pueden ser convertidos en compuestos anulares que después se aromatizan.

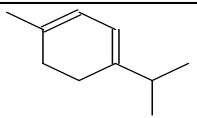
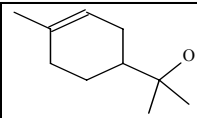
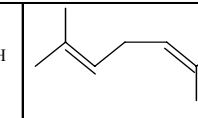
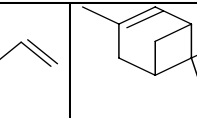
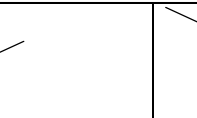
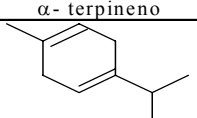
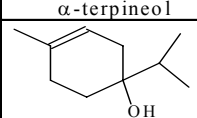
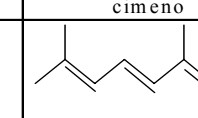
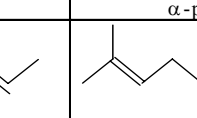
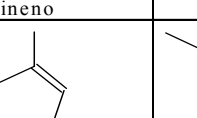
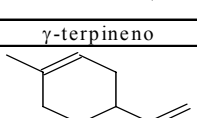
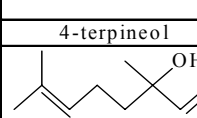
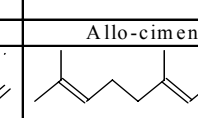
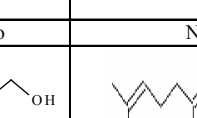
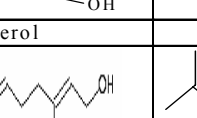
				
α -terpineno	α -terpineol	cimeno	α -pineno	3-careno
				
γ -terpineno	4-terpineol	Allo-cimeno	Nerol	Mentol
				
Limoneno	Linalol	Geraniol	Farnesol	Nerolidol

Figura 2. Estructura química de monoterpenos y sesquiterpenos⁴

Frecuentemente los terpenos oxigenados exhiben un aroma y sabor más deseable que los terpenos no oxigenados y, por tanto, los primeros se prefieren para identificaciones de estas características en particular¹⁰.

2.6.1.1 Terpenos en el mezcal

La presencia de terpenos en el mezcal, así como en otras bebidas alcohólicas, es un tema el cuál ha sido poco estudiado y existen pocos trabajos donde se trata de explicar el origen y/o procedencia de este tipo de compuestos en bebidas alcohólicas¹¹.

Una parte de estos terpenos proviene de la materia prima que en este caso es el agave. *Peña-Alvarez et al*¹¹ identificaron 32 terpenos presentes en agaves de la variedad *A. salmiana* y *A. angustifolia* que son comúnmente utilizados para la elaboración de mezcal, entre los terpenos que identificaron se encuentran el 4-terpineol, α -terpineol, nerol, geraniol, linalol, entre otros.

Esto nos indica que algunos de los terpenos provienen del agave y perduran en todo el proceso de fabricación por lo que están presentes en el producto final.

Otros estudios revelan que la materia prima no es la única fuente de estos compuestos, *Carrau et al*¹² reveló que la levadura *Saccharomyces cerevisiae* responsable de la fermentación alcohólica en la producción de mezcal es capaz de sintetizar en grandes cantidades algunos de los terpenos que son identificados comúnmente en las bebidas alcohólicas; esta síntesis involucra el metabolismo del aminoácido leucina y la ruta de síntesis del ergosterol (Figura 3). *Carrau* también describe la influencia de las condiciones del medio para la síntesis de estos terpenos así como propone vías metabólicas que explican esta síntesis.

En la Figura 3 se muestra un diagrama que ejemplifica la síntesis de algunos terpenos en el interior de la célula de *Saccharomyces cerevisiae*.

2.6.2 Alcoholes

En las bebidas alcohólicas como su nombre lo indica, un grupo muy importante de compuestos que lo caracterizan son los alcoholes. Los alcoholes se caracterizan por la gran variedad de reacciones en las que intervienen; una de las más importantes es la reacción con los ácidos, en la que se forman sustancias llamadas ésteres, semejantes a las sales inorgánicas. En las bebidas destiladas como el mezcal, tequila y vodka los alcoholes se pueden encontrar en concentraciones de hasta 50%, siendo predominante la presencia de etanol el cual proviene de la fermentación de los azúcares del jugo de agave por medio de la acción de levaduras.

Los alcoholes presentes en las bebidas no incluyen únicamente el etanol, sino que se encuentran presentes también otros alcoholes aunque en una menor proporción, como por ejemplo el metanol, el cual es tóxico y proviene de la hidrólisis de pectinas metoxiladas presentes en muchos vegetales y alcoholes superiores de mayor tamaño como lo son los “fusel oils”¹³.

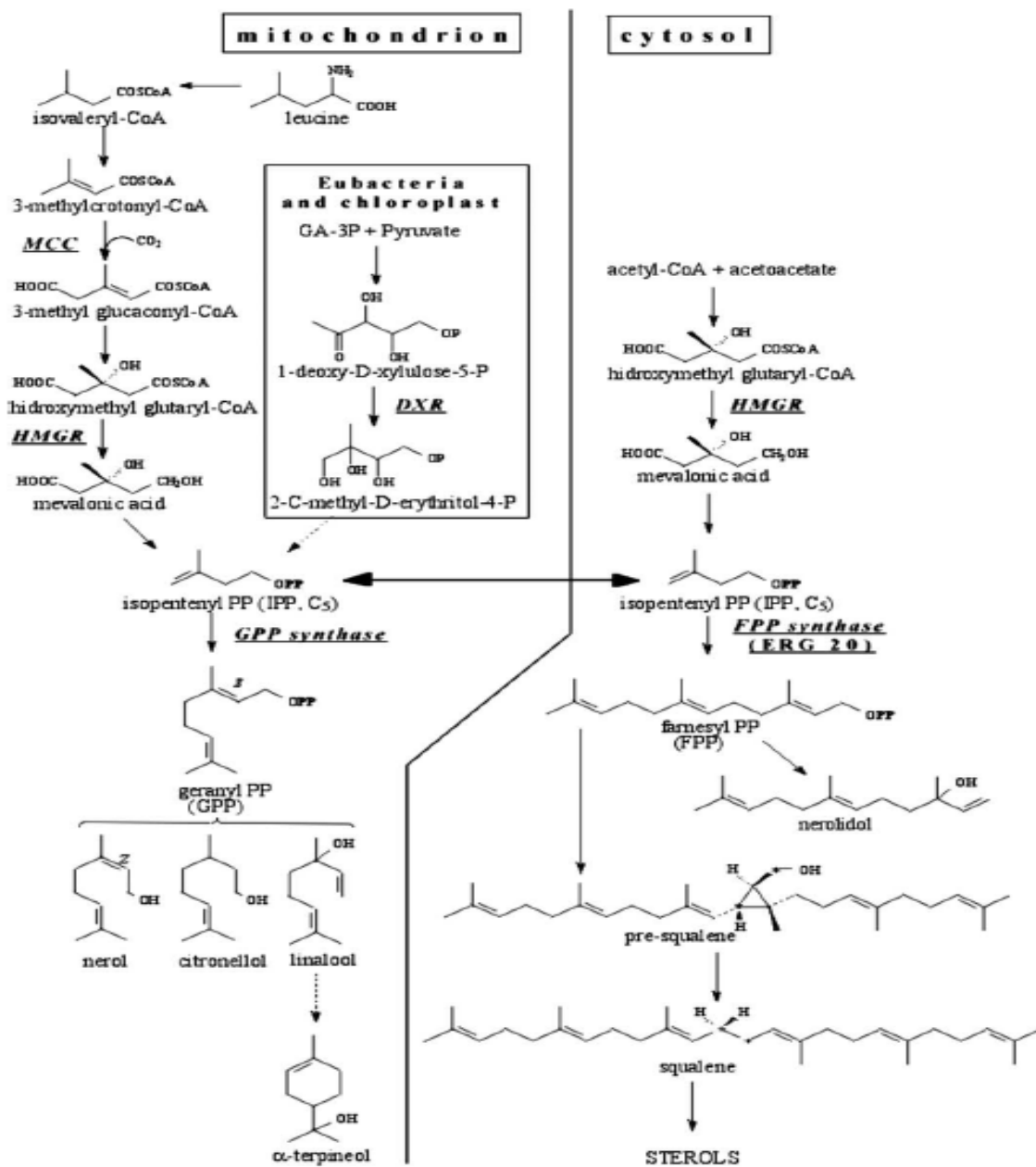


Figura 3. Biosíntesis de ergosterol y su posible relación con la formación de monoterpenos en *S. cerevisiae*¹⁴

2.6.2.1 Alcoholes en el mezcal

La fermentación alcohólica genera principalmente alcoholes a partir de los azúcares presentes en los mostos, de estos alcoholes el etanol es el mayoritario y representa más del 95% del contenido alcohólico total. Se forma a partir del metabolismo anaerobio de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* favorecido por las condiciones del medio. La reacción se muestra en la Figura 4.

Otro de los alcoholes importantes presente en las bebidas alcohólicas es el metanol. Sin embargo, este compuesto no es un producto de la fermentación alcohólica, sino resulta de la hidrólisis de las pectinas metiladas presentes en la materia prima como el agave. Estas son hidrolizadas por enzimas llamadas metil esterases las cuáles liberan el metanol. La cantidad de metanol presente depende directamente de los niveles de pectina presente en la materia prima.

Por otro lado, no se ha esclarecido el papel que juega el metanol en las propiedades sensoriales de las bebidas alcohólicas, sin embargo este compuesto se encuentra frecuentemente regulado en las normas debido a las propiedades toxicológicas que presenta en los humanos, relacionadas comúnmente con problemas de la vista.

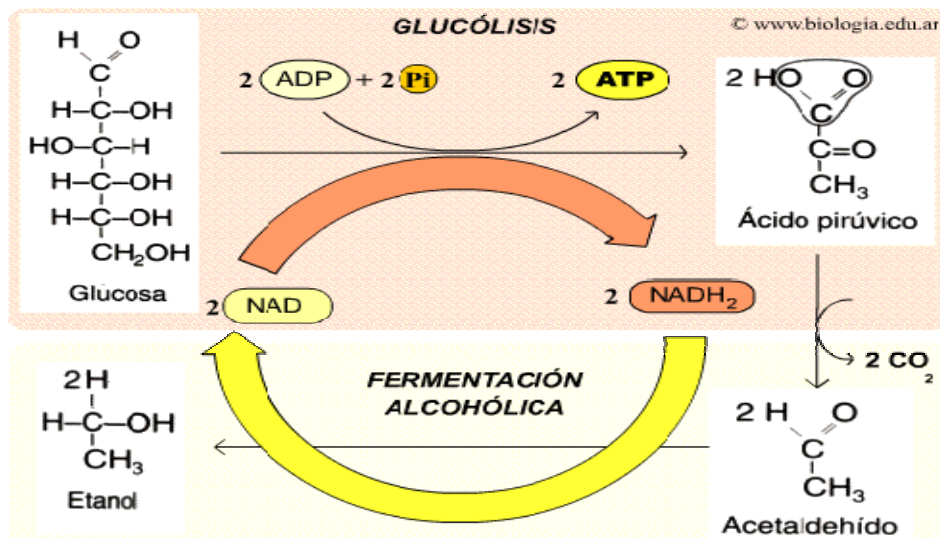


Figura 4. Vía metabólica de formación de etanol en *S. cerevisiae*¹⁵

Los alcoholes de más de 2 carbonos conocidos como aceites fusel (fusel oils) resultan ser un problema durante la destilación debido a que se concentran en la fracción de las colas de destilación, si no se tiene un proceso eficiente o se realiza una destilación muy ambigua pueden estar presentes en cantidades muy altas que afectan de manera importante las propiedades sensoriales como el sabor y olor¹⁵.

La formación de estos compuestos se da durante la fermentación y se concentran durante la destilación debido a la destilación “rústica” y poco eficiente realizada durante la fabricación del mezcal. La formación de estos alcoholes superiores fue descrita originalmente por *Ehrlich* en 1907 como consecuencia de la transaminación de diversos aminoácidos. El mecanismo que *Ehrlich* propone (Figura 5) involucra la transaminación entre un aminoácido y su respectivo α -cetoácido, seguido de una descarboxilación y reducción¹⁴.

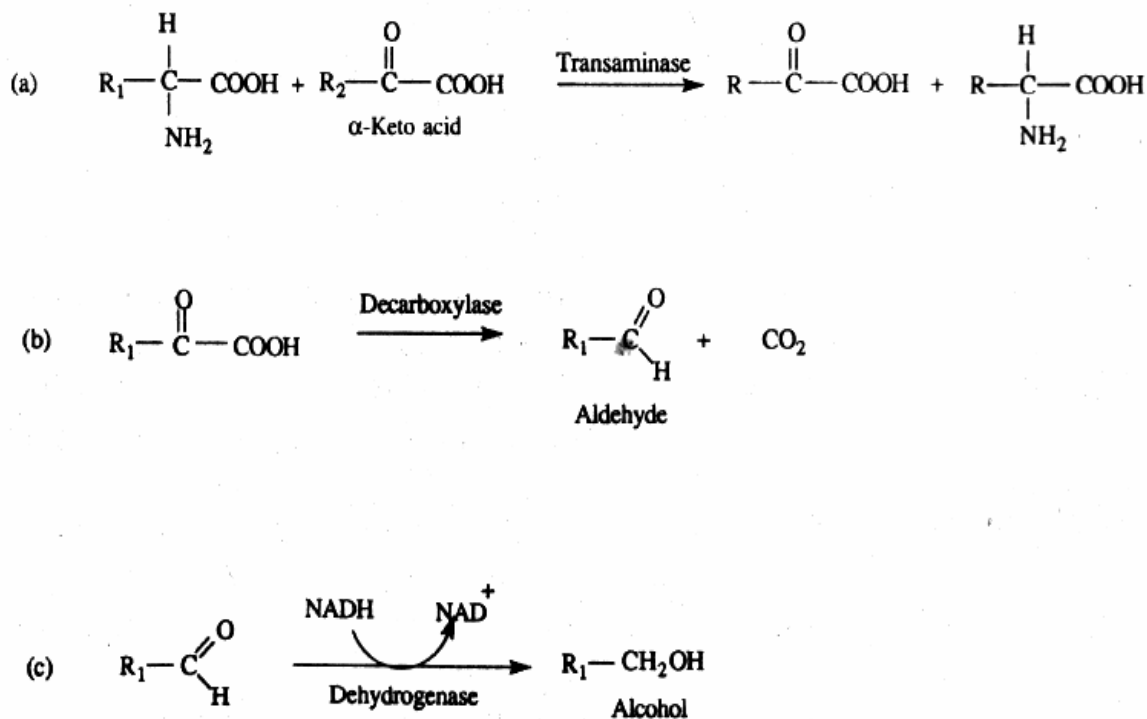


Figura 5. Vía para la formación de alcoholes superiores a partir de aminoácidos¹⁴

Los aminoácidos precursores de los alcoholes superiores se describen a continuación:

Tabla 2. Origen de los alcoholes superiores a partir de aminoácidos¹⁴

Aminoácido	Alcohol obtenido
Leucina	3-metil-1-butanol
Isoleucina	2-metil-1-butanol
Valina	2-metil-1-propanol
Treonina	Propanol
2-Fenilalanina	2-Feniletanol
Tirosina	Tyrosol

Castor and Guymon (1952) descubrieron que la cantidad de aminoácidos presentes en los mostos de fermentación no es lo suficientemente grande como para explicar la presencia de la totalidad de los alcoholes fusel reportados en algunas bebidas. Usando trazadores radioactivos, *Reazin et al.* (1970) encontraron que el 35% de los alcoholes superiores provienen de carbohidratos. A partir de ese momento se reconoce que los alcoholes superiores o fusel provienen de ambas fuentes: aminoácidos y carbohidratos.

Existen muchos factores que afectan la formación de los alcoholes superiores durante la fermentación, entre ellos están: la levadura, temperatura, nivel de oxígeno, pH y composición del mosto¹⁵.

2.6.3 Ésteres etílicos de ácidos grasos.

Los ésteres son derivados de ácidos carboxílicos en los cuáles el grupo alcoxi (-OR) sustituye al grupo hidroxilo (-OH). Un éster es el producto de la reacción de un ácido carboxílico y un alcohol con la pérdida de una molécula de agua¹⁶.

Los ésteres en general, presentan características sensoriales semejantes a las frutas y flores. Una gran variedad de ésteres son formados durante la fermentación de los mostos para la preparación de bebidas alcohólicas, *Rapp* (1988) identificó una considerable cantidad de estos compuestos en el vino y otras bebidas¹⁷.

Los ésteres etílicos de ácidos grasos producidos en las bebidas alcohólicas pueden ser clasificados en 2 grupos: 1) aquellos que provienen de la reacción entre el acetato y alcoholes fusel y 2) aquellos que resultan de la reacción entre el etanol y ácidos grasos.

Algunos ejemplos del primer grupo son al etil-, isobutil-, isoamil-, 2-feniletil-acetatos, siendo el acetato de etilo el más abundante de ellos ya que proviene de la fermentación maloláctica. Ejemplos del segundo grupo son ésteres etílicos de los ácidos hexanoico, octanoico y decanoico, entre otros, estos tienen un impacto importante en algunas propiedades sensoriales de los productos fermentados como son el sabor y olor.

Las reacciones de formación (Figura 6) de los ésteres pueden ser catalizadas por enzimas como acetiltransferasas o llevarse a cabo por las condiciones del medio como es el caso de la formación del acetato de etilo¹⁵.

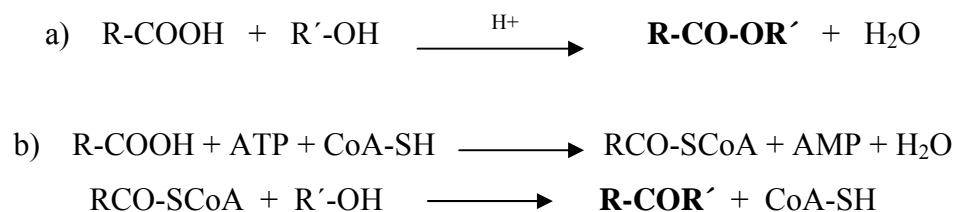


Figura 6. Formación de ésteres etílicos; a) reacción química, b) reacción enzimática¹⁸

3. Fundamentos Analíticos

3.1 Cromatografía de gases (CG)

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

La muestra que puede ser líquida, sólida o gas se introduce en el equipo a través del inyector (Figura 7) donde es vaporizada y es llevada hacia la columna mediante el gas acarreador (N_2 , H_2 ó He_2). En la columna es donde se presenta el fenómeno de separación de los componentes de la mezcla debido a equilibrios de distribución y afinidad; los compuestos que sean menos afines a la fase estacionaria serán empujados por el gas acarreador más rápidamente y salen de la columna (eluyen) primero para dirigirse al detector.

Los compuestos que eluyen de la columna llegan al detector donde se genera una respuesta proporcional a la concentración del analito presente y se genera una señal que es procesada para crear un cromatograma¹⁹.

La desventaja de la CG es que no permite por sí sola identificar los compuestos que presentan una señal en el cromatograma si no se tiene un estándar sobre todo en muestras complejas, esto debido a que los tiempos de retención de los analitos están en función de los equilibrios de distribución por afinidad que se presentan en la columna y que son característicos de cada compuesto, mas no exclusivos ya que varían de acuerdo a las condiciones cromatográficas y a la columna usada. Para solucionar esto, se desarrollo una técnica que acoplada a la CG permite la identificación de los analitos separados, se trata de la espectrometría de masas que acoplada a la CG toma el nombre de CG-EM².

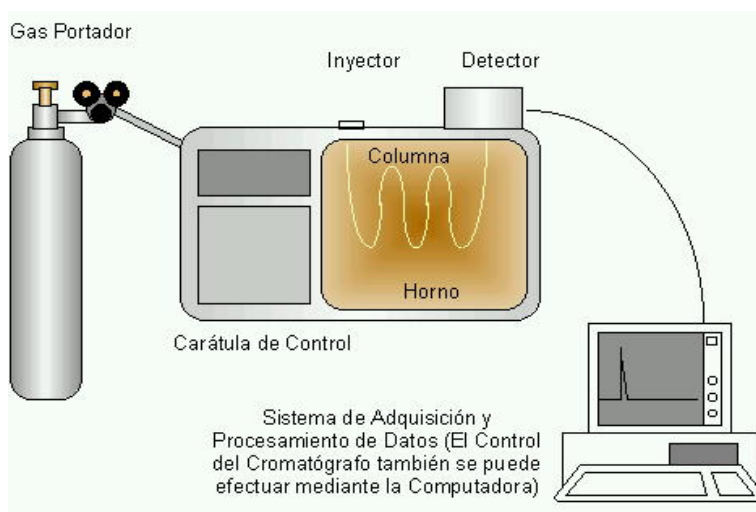


Figura 7. Esquema básico de un sistema cromatográfico²⁰.

3.2 Espectrometría de masas (EM)

La espectrometría de masas abarca diversas técnicas que se emplean para medir las masas de los iones y su abundancia en fase gaseosa. Este proceso consta de 3 pasos:

- Ionización de las moléculas
- Generación de fragmentos y átomos en fase gaseosa.
- Separación según sus masas

El conjunto de técnicas denominadas espectrometrías de masas constituye una de las herramientas más versátiles y poderosas del análisis químico. Desde su comienzo, la EM se ha empleado de manera eficaz para analizar pequeñas moléculas y átomos. Recientemente se han expandido sus aplicaciones para incluir el análisis de casi todo tipo de muestras, gracias a la variedad de fuentes diseñadas para vaporizar e ionizar las moléculas ó átomos que inicialmente no son gases.

La muestra se introduce en forma de gas, líquido o sólido para ser inmediatamente vaporizadas. Las moléculas gaseosas obtenidas se ionizan por diversas técnicas, una de ellas es el impacto de electrones donde las moléculas son ionizadas por el choque de las mismas con electrones liberados por un filamento, estos iones son acelerados por un campo eléctrico y se enfocan mediante campos eléctricos. Los iones acelerados pasan a alguno de los diversos tipos de analizadores de masas. En la mayoría de los analizadores de masas, los iones se separan debido a su relación masa/carga y chocan con un detector en distintos momentos.

Esta pequeña corriente de electrones producidos por el choque de los iones contra el detector es amplificada por el transductor y el equipo electrónico asociado para producir la señal de salida. Al graficar la corriente electrónica de salida contra el tiempo como masa/carga, se obtiene un espectro de masas.

El espectro de masas nos da indicios de la masa del compuesto y su patrón de fragmentación, así como su abundancia. Estas evidencias permiten elucidar la estructura de los analitos presentes²⁰.

3.3 Acoplamiento CG-EM

La ventaja de los métodos cromatográficos consiste en permitir separar los materiales en sus componentes moleculares. Sin embargo, una de las principales limitaciones es que con frecuencia no se identifican los componentes que se eluyen. Una de las principales ventajas de la espectrometría de masas es que permite identificar especies moleculares y atómicas a partir de los datos del espectro de masas. Sin embargo, una de las principales dificultades consiste en establecer cuáles son las distintas especies que puedan estar presentes en una mezcla de compuestos que se introducen en la fuente. Por las ventajas y limitaciones complementarias de la espectrometría de masas y la cromatografía, probablemente en la actualidad una de las herramientas de análisis más poderosas es la aplicación del espectrómetro de masas como detector para identificar los componentes de mezclas desconocidas separados por cromatografía²¹.

3.4 Técnicas de concentración y análisis de compuestos responsables de aroma

La mayoría de los compuestos que están presentes en los alimentos y bebidas, se encuentran en concentraciones muy bajas, sin embargo estos compuestos son responsables de muchas propiedades sensoriales como el sabor y olor. Para su determinación, se han utilizado técnicas que involucran la extracción y concentración del analito para su posterior análisis:

- Técnicas de Cromatografía de Gases – Headspace
- Técnicas de Desorción Térmica Directa
- Técnicas de Extracción Líquido-Líquido (ELL)
- Técnicas de Microextracción en Fase Sólida (MEFS)

En este trabajo se utilizaron las técnicas de ELL y MEFS para el análisis de las muestras por lo que se describirán brevemente.

3.4.1 Extracción Líquido-Líquido (ELL)

Generalmente cuando los analitos se encuentran en concentraciones traza, como es el caso de los compuestos del mezcal, y se requieren separar de otros compuestos presentes en mayor concentración, se utiliza la ELL.

En la ELL participan diversos factores en la recuperación de especies en disolución:

1. La fase orgánica que permite la separación de los solutos sometidos en el proceso de extracción. Normalmente se trata de un líquido orgánico que presenta baja miscibilidad y reactividad con el agua. Dentro de los más utilizados están hidrocarburos alifáticos o aromáticos así como los clorados.
2. La fase acuosa, además de los analitos a separar, puede contener otras sustancias que se añaden para favorecer la recuperación de los compuestos orgánicos, como ácidos inorgánicos para ajustar el pH o agentes salinos.

La agitación manual o mecánica permite acelerar el paso del soluto de la fase acuosa a la fase orgánica hasta alcanzar el equilibrio de distribución entre ambas fases²².

3.4.2 Microextracción en Fase Sólida (MEFS)

La Microextracción en Fase Sólida es una técnica relativamente nueva con escasos 15 años de vida que permite la extracción rápida libre de disolventes y la preconcentración de compuestos orgánicos volátiles o semi-volátiles.

Utiliza el equilibrio de reparto de los compuestos orgánicos entre una disolución acuosa o su fase vapor y la delgada película polimérica que recubre la sílice fundida en el dispositivo de MEFS.

La técnica fue descrita por Pawliszyn para el análisis químico del agua²³. Desde entonces, ha sido aplicada al análisis de contaminantes del ambiente y ha tenido gran éxito en el área de alimentos donde se aplica al análisis de alimentos sólidos y bebidas.

Las técnicas de MEFS son dependientes de la forma de la matriz; líquida, sólida y todos los gases pueden ser muestreados fácilmente. La MEFS es una técnica basada en el equilibrio de fases y la exactitud de la cuantificación requiere que las condiciones de extracción sean controladas rigurosamente.

Las condiciones que se toman en cuenta son: tipo de compuesto a analizar, polaridad, volatilidad, coeficiente de reparto, volumen de la muestra o volumen del espacio de cabeza, velocidad de agitación, pH de la matriz, temperatura, tiempo de extracción y características de la matriz.

Algunas de las ventajas son:

- Es una técnica de extracción libre de disolventes
- Con solo unos pocos tipos de materiales absorbentes se cubre la mayoría de los analitos a determinar tanto para muestras líquidas, sólidas o gaseosas.
- La volatilidad de los compuestos a determinar no es un factor limitante como para el caso del "head-space" o de "purga y trampa"; pueden determinarse muy rápidamente compuestos no volátiles.
- El límite de detección es del orden de ng/mL.
- La técnica de MEFS en su variante "head-space" permite extraer compuestos que presentan presiones de vapor muy bajas a las temperaturas de trabajo, un ejemplo claro es la extracción de parafinas e hidrocarburos poliaromáticos²⁴.

3.4.2.1 El Dispositivo de MEFS

La Figura 8 describe el dispositivo introducido por Supelco (Bellefonte, PA) para la MEFS de forma manual. El dispositivo es esencialmente una jeringa modificada que tiene un émbolo de resorte y un contenedor para albergar el émbolo. Unido al cuerpo del contenedor sobresale una aguja de acero inoxidable del # 24 el cual encierra otro tubo de acero inoxidable que tiene montada una pieza de sílica fundida muy estrecha, una pequeña parte de la sílica fundida se encuentra recubierta con una película muy fina de fase estacionaria. Esta película funciona como el “disolvente orgánico” durante la absorción de los compuestos volátiles de la matriz. La aguja sirve para perforar el septum del contenedor de la muestra y del inyector del CG, así como para proteger la frágil sílice fundida que contiene la fase estacionaria.

Actualmente existen diferentes tipos de fases estacionarias que se utilizan, algunas de las más comunes son la de polidimetilsiloxano (PDMS) que es no polar, la de polidimetilsiloxano-divinilbenceno (PDMS/DVB) que es medianamente polar o la de poliacrilato (PA) que es polar.

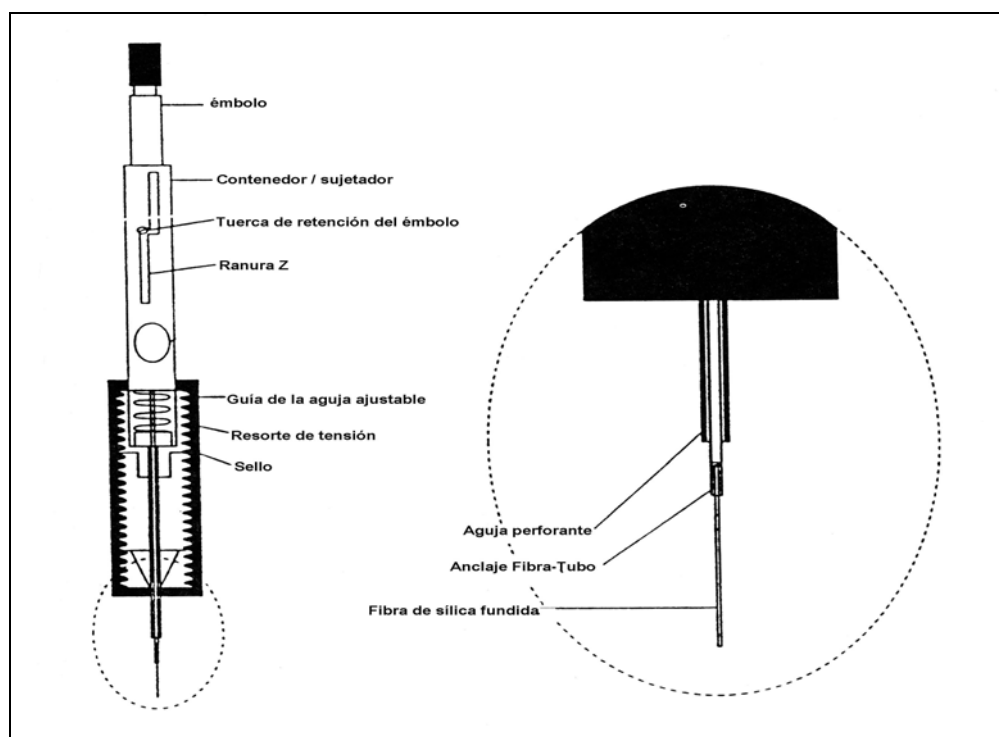


Figura 8. Representación gráfica del dispositivo de MEFS²⁴

Para usos generales, las fibras no polares proveen una alta sensibilidad para una gran cantidad de compuestos. Las fibras de poliacrilato no están estrictamente limitadas a la absorción de compuestos polares, pero presentan una gran sensibilidad para el análisis de alcoholes, fenoles y ciertos aldehídos, comparados con ésteres e hidrocarburos.

3.4.2.2 Procedimiento de la MEFS

El proceso se ilustra en la Figura 9. Una muestra es colocada dentro de un contenedor o vial, el cual es sellado con un sello de silicón con una cara cubierta de teflón (septum). Se coloca el vial en una parilla de agitación / calentamiento y se coloca una pequeña barra magnética que agite la muestra generalmente en disolución. Para la extracción, se perfora el sello con la aguja del dispositivo y se expone la fase estacionaria a la muestra durante un tiempo determinado en el cual se presenta el equilibrio de reparto entre fases y se extraen los analitos desde la matriz; al finalizar se retrae la fibra guardándola en el contenedor y se inserta directamente en el inyector de un CG permaneciendo allí el tiempo necesario para que los analitos sean desorbidos por acción del calor y transferidos a la columna para el análisis²⁴.

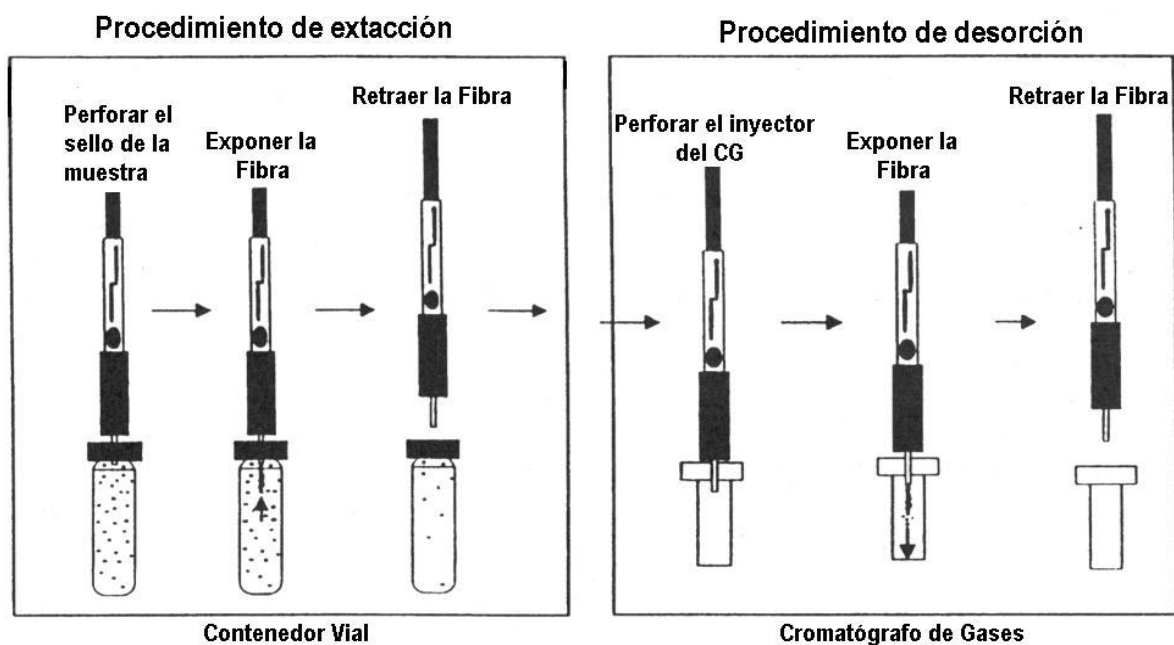


Figura 9. Secuencia de pasos para la MEFS²⁴

Existen dos modalidades principales de uso: la MEFS de inmersión y la MEFS de “headspace”; como su nombre lo indica, en la primera se sumerge la fibra en la disolución que contiene los analitos a extraer estableciéndose el equilibrio directo con la disolución, mientras que en la segunda la fibra se coloca en el espacio de cabeza del vial estableciéndose el equilibrio con la fase vapor del espacio de cabeza que a su vez se encuentra en equilibrio con la fase de la disolución o muestra sólida.

4. Objetivos

General

- Determinar los principales compuestos orgánicos volátiles presentes en mezcal.

Particulares

- Aplicar para la extracción, cuantificación e identificación de los principales compuestos presentes en mezcal las metodologías de ELL y MEFS previamente desarrolladas en el laboratorio para el análisis de tequila^{1,2}
- Optimizar una metodología para el análisis de alcoholes en mezcal.
- Aplicar estos procedimientos para el análisis de diferentes muestras de mezcal.
- Con los resultados obtenidos tratar de relacionar la composición de los mezcales con diversas variables como tipo de agave y lugar de origen.

5. Desarrollo experimental

5.1 Materiales y Reactivos

- Estándares de terpenos (pureza >99%): linalol, 4-terpineol, α -terpineol, β -citronelol, geraniol, eugenol, *cis*-nerodiol, *trans*-farnesol y *p*-cimeno (SUPELCO, USA).
- Estándares de alcoholes (pureza >99%): metanol, propanol, alcohol isoamílico, hexanol, nonanol y feniletanol (SUPELCO, USA).
- Estándares de ésteres etílicos de ácidos grasos (pureza >98%): etil hexanoato, etil heptanoato, etil octanoato, etil decanoato, etil dodecanoato, etil tridecanoato y etil tetradecanoato (SUPELCO, USA).
- Cloroformo grado HPLC (Baker, México)
- Bicarbonato de sodio (pureza >95%) (Farmacia Upjohn, USA)
- Ácido silícico (pureza >96%) (Bio-Rad Laboratorios, USA)
- Acetona R.A. (Baker, México)
- Viales de 8 mL con tapón horadado de polipropileno y septa de PTFE (SUPELCO, USA)
- Embudo de Separación de 500 mL (Kimax, México)
- Fibras para MEFS de PDMS/DVB (Polidimetilsiloxano/Divinilbenceno) (SUPELCO, USA)
- Soporte para fibras de MEFS (SUPELCO, USA)
- Agitador magnético (10 mm x 3 mm)
- Parrilla de agitación y calentamiento (Cole-Parmer 04644-Series, USA)

5.2 Muestras

Las muestras de mezcal analizadas (Tabla 3) se obtuvieron de Oaxaca (*A. angustifolia*), Guerrero (*A. cupreata*) y San Luís Potosí (*A. salmiana*).

Tabla 3. Muestras de mezcal analizadas

<i>Mezcal</i>	<i>Denominación</i>	<i>Origen</i>	<i>Especie</i>	<i>%v/v Etanol</i>
Casa del Agave Divino	Joven 100% Agave	Oaxaca	<i>A. angustifolia</i>	47.3
El Señorío	Joven 100% Agave	Oaxaca	<i>A. angustifolia</i>	44.9
El Rey Zapoteco	Joven 100% Agave	Oaxaca	<i>A. angustifolia</i>	46.6
Espina Dorada	Joven 100% Agave	Oaxaca	<i>A. angustifolia</i>	56.8
Oro de Oaxaca	Joven 100% Agave	Oaxaca	<i>A. angustifolia</i>	46.2
El famoso de Oaxaca	Joven 100% Agave	Oaxaca	<i>A. angustifolia</i>	56.9
Laguna Seca	Joven 100% Agave	San Luis Potosí	<i>A. salmiana</i>	47.1
Casarrobias	Joven 100% Agave	Guerrero	<i>A. cupreata</i>	46.4
Calzada	Joven 100% Agave	Guerrero	<i>A. cupreata</i>	48.9

5.3 Metodología

Las 9 muestras de mezcal fueron analizadas con los procedimientos desarrollados y optimizados previamente en el laboratorio para análisis de Tequila^{1,2} y con el procedimiento desarrollado en este trabajo. Se determinaron compuestos volátiles como terpenos, ésteres etílicos de ácidos grasos, acetato de etilo y alcoholes. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado para evaluar la precisión de los resultados obtenidos y con ellos se realizó la identificación general de congenéricos para mezcal.

5.3.1 Determinación de compuestos volátiles y terpenos por ELL – CG – EM

Mediante el procedimiento ELL–CG–EM se identificaron los principales compuesto orgánicos volátiles en el mezcal además de cuantificar los terpenos presentes.

Disolución estándar de terpenos. Se pesaron 10 mg de cada uno de los estándares de terpenos, se disolvieron y se aforaron a 10 mL con cloroformo. De esta mezcla se preparo una disolución de 10 µg/mL (mezcla estándar).

Disolución extractante. Se pesaron 10 mg de *p*-cimeno para ser utilizado como estándar interno, se disolvieron y aforaron a 10 mL con cloroformo. A partir de esta se preparó una disolución de 2 µg/mL.

Estas disoluciones se almacenaron en refrigeración (4 °C).

Procedimiento

En un embudo de separación de 500 mL se colocaron 30 mL de muestra (previamente mantenida en refrigeración durante 30 minutos), 300 mL de agua destilada fría y 6.0 mL de disolución extractante. Se agitó vigorosamente durante 60 segundos y se dejaron separar las fases. La fase orgánica de cloroformo se transfirió a un vial de fondo cónico de 10 mL y se lavó 5 veces con 2 mL de una disolución saturada de bicarbonato de sodio. Enseguida se lavó 3 veces con 2 mL de agua destilada fría. Finalmente se filtró a través de sulfato de sodio anhidro y se inyectó 1 μ L al CG-EM. Las extracciones se realizan por triplicado.

Para la cuantificación se realizó una curva patrón (por triplicado) fortificando disoluciones de EtOH/H₂O al 38% con cantidades conocidas de disolución de los estándares de terpenos: linalol, 4-terpineol, α -terpineol, β -citronelol, geraniol, eugenol, *cis*-nerodiol, *trans*-farnesol.

Preparación de curva patrón de terpenos. Se prepararon 30 mL de disoluciones estándar de los terpenos en EtOH/H₂O al 38% v/v a concentraciones de 0.05, 0.075, 0.125, 0.25, 0.5 y 1.0 mg/L y se siguió el mismo procedimiento que para las muestras (estas disoluciones sustituyen los 30 mL de muestra).

5.3.1.1 Condiciones cromatográficas

Estas condiciones fueron utilizadas para el análisis por ELL y MEFS.

Cromatógrafo de Gases (Agilent Technologies modelo 6890N acoplado a un Detector Selectivo de Masas (Agilent Technologies modelo 5973) con inyector split/splitless (división de flujo/sin división de flujo) y columna capilar de sílice fundida (ZB-5M Zebron Phenomenex, USA; 30 m x 0.32 mm x 0.25 μ m).

Temperatura del inyector 280 °C en modo splitless (1 min).

Programa de temperatura: Temperatura inicial 40 °C durante 1 min, incrementándose 5 °C/min hasta 210 °C incrementándose nuevamente 10 °C min hasta 280 °C manteniéndose 5 min.

Gas acarreador: Helio (1.0 mL/min);

Temperatura de la línea de transferencia: 280 °C;

Fuente de ionización: 230 °C;

Analizador cuadrupolar: 150 °C.

Los análisis se realizaron por impacto electrónico (70 eV). Se utiliza el modo barrido total del espectro (SCAN por sus siglas en inglés). La identificación se realizó comparando los tiempos de retención obtenidos de las muestras con los tiempos de retención de estándares así como los espectros de masas de la base de datos (biblioteca NIST).

5.3.2 Determinación de terpenos y ésteres etílicos de ácidos grasos por MEFS – CG – EM

Esta metodología fue desarrollada y optimizada previamente en el laboratorio para el análisis de Tequila^{1,2} y se aplicó sin modificaciones en el análisis de mezcal.

Disolución estándar de terpenos. Se pesaron 10 mg de cada uno de los estándares de terpenos, se disolvieron y se aforaron a 10 mL con cloroformo. De esta mezcla se preparo una disolución de 10 µg/mL (mezcla estándar terpenos).

Disolución estándar de ésteres de ácidos grasos. Se pesaron por separado 10 mg de estándar de éster etílico (C₆, C₇, C₈, C₁₀, C₁₂ y C₁₄), se disolvieron y aforaron por separado a 10 mL con EtOH. A partir de estas se prepararon disoluciones de cada estándar a 10 µg/mL.

Disoluciones de estándares internos. Se pesaron por separado 10 mg de p-cimeno y tridecanoato de etilo, se disolvieron y aforaron por separado a 10 mL con cloroformo y EtOH respectivamente. A partir de estas se prepararon disoluciones de estándar interno a 10 µg/mL.

Procedimiento

Previo a la utilización de una fibra nueva, esta se acondiciona en el inyector de un CG por 30 min a 260 °C, este procedimiento se repite cada día de trabajo y se realiza un blanco de esta fibra para asegurar que esta libre de impurezas. Previo a cada análisis la fibra de PDMS/DVB se acondiciona en el inyector del CG por 10 min a 260 °C para eliminar impurezas presentes en la fibra. Este procedimiento se repite después de cada análisis.

En un vial de 8 mL se colocó 1 mL de muestra (a temperatura ambiente), 4 mL de una disolución saturada de NaCl y 50 µL de cada una de las disoluciones de estándares internos. Se

coloca un agitador magnético de 10 mm, se cierra el vial con un tapón horadado y una septa de teflón.

El vial se coloca en una parilla de agitación durante 5 minutos (tiempo de estabilización) agitando a 1200 rpm a temperatura ambiente. Una vez transcurridos los 5 minutos se inserta el soporte de la fibra para MEFS para exponer la fibra de PDMS/DVB en el espacio de cabeza durante 30 minutos (tiempo de extracción). Transcurrido el tiempo de extracción, se coloca la fibra de PDMS/DVB en el soporte y se inyecta en el CG-EM donde se deja desorber 10 minutos.

Preparación de curva patrón de terpenos. Se realizó el mismo procedimiento que para las muestras sustituyendo el mezcal por 1 mL de disoluciones de estándares de los terpenos en EtOH/H₂O al 38% v/v a concentraciones de 0.05, 0.075, 0.125, 0.25, 0.5 y 1.0 mg/L.

Preparación de curva patrón de ésteres etílicos de ácidos grasos. Se realizó el mismo procedimiento que para las muestras sustituyendo el mezcal por 1 mL de disoluciones de estándares de ésteres etílicos de ácidos grasos en EtOH/H₂O al 38% v/v a concentraciones de 0.03, 0.06, 0.12, 0.25 y 0.5 mg/L para EE7 y EE14, de 0.06, 0.125, 0.25, 0.5, 0.75 y 1.0 mg/L para EE6 y EE12, de 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mg/L para EE8 y EE10. El nonanoato de etilo se cuantificó utilizando la curva patrón de decanoato de etilo.

5.3.3 Determinación de alcoholes por CG

Disolución estándar de alcoholes. Se pesaron 100 mg de cada uno de los estándares de los alcoholes: metanol, propanol, alcohol isoamílico, hexanol, nonanol y feniletanol, se disolvieron y aforaron a 10 mL con acetona. A partir de esta se preparó una disolución de 1 mg/mL.

Lavado de ácido silícico. En un vaso de precipitados de 500 mL se colocaron 100 g de ácido silícico y 200 mL de HCL al 1.0%; se agitó vigorosamente durante 5 minutos y se dejaron separar las fases. La fase líquida se desechó y el sólido se lavó 4 veces con 200 mL de agua destilada y una con 100 mL de acetona, desechando la fase líquida cada vez. El sólido húmedo se secó a 130 °C. Finalmente el ácido silícico se transfirió a un vial de vidrio.

Procedimiento

En un matraz de 2 mL se transfiere 1 mL de muestra, 50 μ L de nonanol y 25 μ L de alcohol bencílico como estándares internos (EI), se lleva al aforo con la muestra de mezcal y se vierte a un vial de 8 mL. Finalmente se adicionan 0.5 g de ácido silícico previamente lavado; se agita vigorosamente en Vortex durante 2 minutos y se deja separar las fases. La fase líquida es transferida a un matraz aforado de 5 mL mientras que a la fase sólida se le adicionan 1.5 mL de acetona, se agita nuevamente durante 2 minutos y se vuelven a separar las fases. La fase líquida se junta con la anterior en el matraz aforado de 5 mL. Se repite una vez más la operación de lavado con acetona.

La fase líquida se lleva al aforo con acetona y se inyecta 1 μ L en el CG-DIF.

Determinación de factores de respuesta. Se realiza el mismo procedimiento que para las muestras sustituyendo el mezcal por mL de una disolución estándar de alcoholes de 100 μ g/mL. Los factores de respuesta del metanol, propanol, isobutanol, alcohol isoamílico y hexanol se calcularon respecto al estándar interno nonanol, mientras que el factor de respuesta del feniletanol se calculó respecto al estándar interno alcohol bencílico.

La cuantificación de los alcoholes se realizó utilizando los factores de respuesta para cada uno de ellos.

5.3.2.1 Condiciones Cromatográficas

Cromatógrafo de Gases (Hewlet Packard modelo 5890) con detector de ionización de llama (FID), inyector (split/splitless) división de flujo/sin división de flujo y una columna capilar de Carbowax, (SUPELCO, USA; 30 m x 320 μ m x 0.25 μ m).

Temperatura del inyector 240 °C en modo split (relación 1:25); temperatura del detector 240 °C; Programa de temperatura: Temperatura inicial 40 °C durante 10 min, incrementándose 10 °C/min hasta 240 °C manteniéndose durante 1 min.

Gas acarreador: Hidrógeno (1 mL/min).

6. Resultados y discusión

6.1 Principales compuestos volátiles y semivolátiles en el mezcal

El análisis del mezcal por ELL o por MEFS-HS muestra gran cantidad de compuestos observándose que el perfil general de congenéricos es muy complejo. El mayor número de compuestos identificados fue por MEFS-HS. (Figura 10).

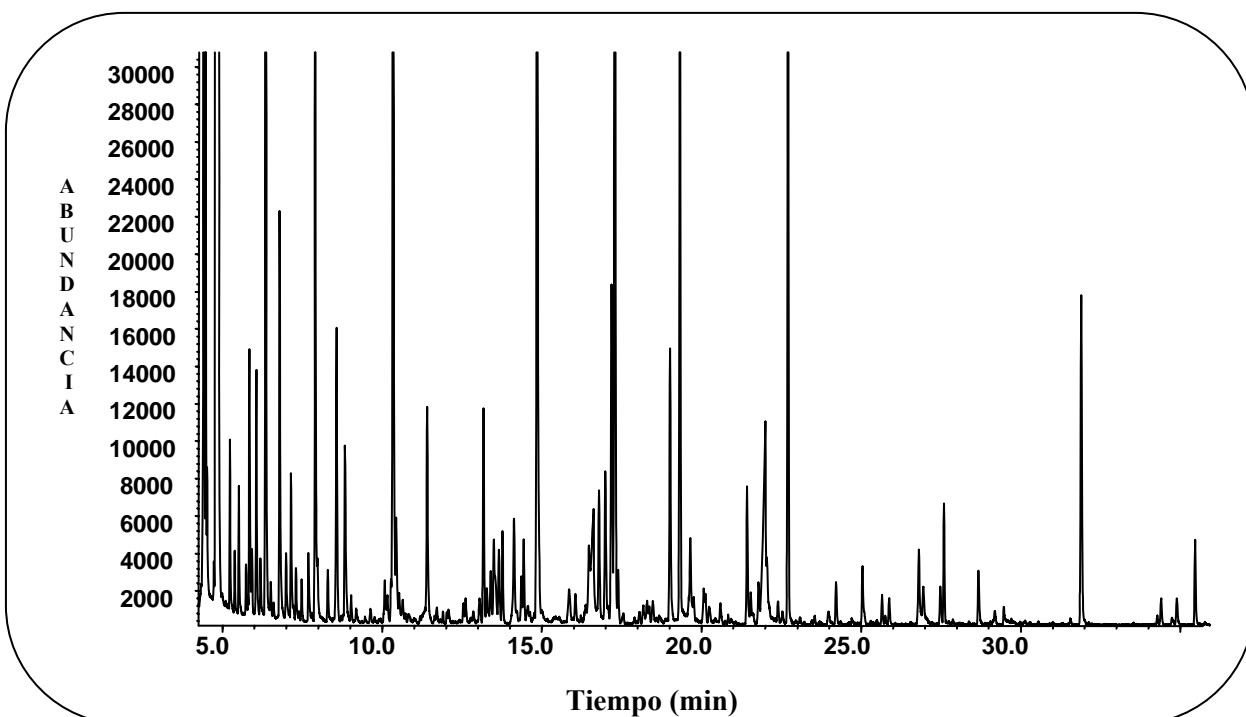


Figura 10. Cromatograma iónico total del análisis del mezcal Agave Divino. Condiciones cromatográficas: Programa de Temperatura: temperatura inicial 40 °C durante 1 min, incrementándose a 5 °C/min hasta 210 °C e incrementándose a 10 °C min hasta 280 °C durante 5 min.

En el análisis de cada mezcal se identificó un número importante de compuestos, algunos de ellos fueron identificados mediante la utilización de estándares mientras que otros solamente mediante comparación con la base de datos de los espectros de masas, sin embargo, en cada una de las muestras el número de compuestos identificados fue diferente como se muestra en la Tabla 4. Esta diferencia podría ser atribuida a varios factores como son: el tipo de Agave, la fermentación (microorganismo, tiempo, condiciones), destilación (sencilla o doble), ya que es un proceso artesanal y no existe un procedimiento general para su producción.

Tabla 4. Número de compuestos identificados por los dos métodos de análisis

<i>Mezcal</i>	# de compuestos identificados	
	<i>ELL</i>	<i>MEFS</i>
Agave Divino	134	162
El Señorío	169	192
Rey Zapoteco	177	200
Espina Dorada	163	181
Oro de Oaxaca	120	160
El Famoso	148	195
Laguna Seca	128	198
Calzada	182	204
Casarrobias	175	201

La Tabla 5 muestra los compuestos identificados los cuales se clasifican como: ésteres de ácidos grasos, aldehídos, cetonas, ácidos carboxílicos, furanos, hidrocarburos simples, terpenos, alcoholes, hidrocarburos aromáticos policíclicos y compuestos heterocíclicos.

Tabla 5. Principales compuestos volátiles y semivolátiles identificados en mezcal “El Señorío”

#pico	Compuesto	tr	#pico	Compuesto	tr
1	Propanoato de metilo	4.48	68	Heptanoato de etilo	13.546
2	Acetato de propilo	4.524	69	2-dodecen-3-ol	13.775
3	Trimetil dioxolano	4.784	70	1-dodecen-3-ol	14.047
4	Dietil acetato	4.851	71	Mequinol	14.13
5	Alcohol Isoamílico	4.891	72	Dietoxihexano	14.227
6	Alcohol amílico	5.25	73	Acetato de 2,3-pentano	14.364
7	Isobutirato de etilo	5.393	74	Linalol	14.44
8	Acetato de alil-metilo	5.413	75	1-hexen-ciclohexano	14.538
9	Acetato de alilo	5.525	76	Tridecanal	14.576
10	Dietil carbonato	5.747	77	Feniletanol	14.857
11	Tetracloroacetona	5.809	78	2-metil-5-propionilfuranol	15.359
12	Ciclopentanona	5.848	79	Xilenol	15.844
13	Dibromometano	5.931	80	Naftalenona	15.853
14	Butirato de etilo	6.069	81	4-Terpineol	16.048
15	metil-dihidrofuranona	6.189	82	Lonona	16.347
16	Lactato de etilo	6.35	83	Borneol	16.476
17	Dimetilsiloxano	6.517	84	Nonanol	16.529
18	3 metil-4 octanoide	6.607	85	Sabinol	16.65
19	Furfural	6.802	86	α-Terpineol	16.738
20	2-metil-ciclopentanona	6.993	87	Succinato de dietilo	16.795
21	5-metilpentanol	7.087	88	Naftalenona	16.991
22	3-metil-ciclopentanona	7.141	89	β-Citronelol	17.178
23	Isovalerato de etilo	7.305	90	Octanoato de etilo	17.287
24	dietoxibutano	7.481	91	Ciclocitral	18.057

25	Hexanol	7.681	92	p-alilarisol	18.175
26	Acetato de Isoamilo	7.904	93	Isogeraniol	18.307
27	Acetato de 2-metilbutanol	7.973	94	Fenilpropanol	18.362
28	Estireno	8.297	95	2,6-dimetoxitolueno	18.469
29	2(1,1-dibutil)coclobutanona	8.395	96	Toluato de etilo	18.673
30	3,Ndihidroxi butanamida	8.457	97	2-metil-2-ciclohexenona	18.84
31	Difurfuril eter	8.568	98	Lavandulol	18.928
32	2-acetilfurano	8.83	99	Acetato de 2-feniletilo	19.016
33	Sorbato de etilo	9.029	100	2-metoxifenol	19.324
34	5-metilfurfural	9.165	101	Ciclododecano	19.399
35	3,4-dimetilpentanol	9.455	102	Etilguayacol	19.657
36	2-etilciclopentanona	9.627	103	Lonona	19.762
37	1,2,6-hexanetriol	9.889	104	nonanoato de etilo	20.073
38	2,3-dimetilciclohexanol	9.949	105	1-etilen-Indeno	20.127
39	dietoxi-3-metil-butano	10.083	106	1-etilen-Indeno	20.597
40	3-etilciclopentanona	10.161	107	trietil-pentenil-silano	21.434
41	Benzaldehido	10.273	108	Hidroxicinamato de etilo	21.549
42	5-metilfurfural	10.375	109	Eugenol	21.799
43	2-hidroxiisovalerato de etilo	10.437	110	Difenil	22.405
44	Heptanol	10.525	111	Damascenona	22.541
45	2-metil-1,3-dioxolano	10.636	112	Decanoato de etilo	22.715
46	2-metil-fuorato	10.723	113	1,5-dimetilnaftaleno	23.548
47	1-Octen-3-ol	10.809	114	Acenaftileno	24.222
48	trimetiltetradecilisolerato	11.035	115	Acido furanacetico	25.053
49	6-metil-5-hepten-2-ol	11.231	116	Base de Fischer	25.307
50	Octanol	11.29	117	2,4-diterbutilfenol	25.699
51	Hexanoato de etilo	11.411	118	Hedicariol	25.762
52	acetato de oxidietileno	11.641	119	Nafto[2,1-b]furano	25.887
53	2-furanil-1-propanona	11.707	120	Longipinano	26.005
54	Tetrahidroxihexanona	11.904	121	Undecano	26.556
55	Isobutiltiglato	12.026	122	Hedicariol	26.7
56	3-etil-4-metilpentanol	12.076	123	cis-Nerolidol	26.941
57	Cimeno	12.206	124	Fluoreno	27.494
58	2-etil-hexanol	12.286	125	Dodecanoato de etilo	27.603
59	2-acetil-5-metil-furano	12.549	126	Azuleno	28.08
60	Dimetilciclopentenona	12.616	127	Ciclopropa[a]Naftaleno	28.679
61	4Heptafluorobutyryloxyhexadecane	12.858	128	Muurolol	28.885
62	1-fenil-2-butanediol	13.041	129	trans-Farnesol	29.132
63	2-hidroxi-4-metil-pentanoato de et	13.177	130	Eudesmol	29.187
64	4-oxo-pentanoato de etilo	13.275	131	4áH,5àH-Eudesman-11-ol	29.322
65	trimetil-2-ciclopentenona	13.336	132	Tridecanol	31.912
66	2-hidroxi-4-metil-pentanoato de et	13.396	133	Fenantreno	31.898
67	2-hidroxiopropanoato de pentilo	13.503	134	Tetradecanoato de etilo	32.140

*Los compuestos en negritas fueron identificados mediante comparación con estándares, mientras que los restantes se identificaron comparando sus espectros de masas con la base de datos.

6.2 Determinación de terpenos en mezcal por ELL

Los terpenos fue uno de los grupos de compuestos estudiados en este trabajo. Se identificaron y cuantificaron por CG-EM, identificándose mediante comparación con estándares y con la base de datos 18 terpenos en total sin embargo, no todos están presentes en todas las muestras. La selección de los terpenos a cuantificar se realizó en base a datos previamente reportados en la literatura para Agave y Tequila^{1,2} 100 %. El criterio para la selección fue; que se encontraban en mayor concentración en el Tequila y algunos en el Agave. El procedimiento utilizando ELL desarrollado para Tequila fue el que se utilizó para Mezcal sin ninguna modificación considerando que eran matrices muy semejantes.

Tabla 6.. Terpenos identificados en las muestras de mezcal analizadas

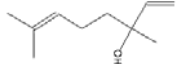
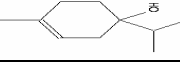
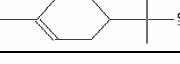
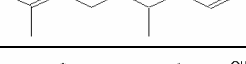
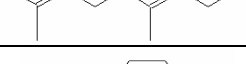
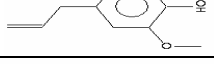

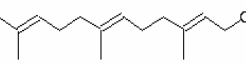
Compuesto/ Mezcal	<i>Agave Divino</i>	<i>El Señorio</i>	<i>Rey Zapoteco</i>	<i>Espina Dorada</i>	<i>Oro Oaxaca</i>	<i>Famoso</i>	<i>Laguna Seca</i>	<i>Calzada</i>	<i>Casarrobias</i>
Linalol	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Mequinol	X	X				X	X		
4-Terpineol	X	X					X		
Sabinol	X	X							
α -terpineol	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Borneol	X	X	X		X	X	X	X	X
β -Citronelol	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Geraniol	X	X	X			X	X	X	X
Levandulol		X					X		
Lonona	X	X			X		X		
Hediciariol		X					X		
Eugenol	X	X		X	X	X	X	X	X
Muurolol		X					X		
Eudesmol		X	X	X				X	X
Guayacol			X	X	X	X	X		
Etilguayacol			X	X	X	X	X		
<i>cis</i> -Nerolidol	X	X	X	X					
<i>trans</i> -Farnesol			X	X	X	X	X	X	X

Como se observa en la Tabla 6, el perfil de terpenos es distinto para cada mezcal analizado sin embargo, linalol y α -terpineol se identificaron en todas las muestras. Con estos resultados se podría pensar en un perfil diferente para cada mezcal lo cual nos indicaría las diferencias que existen entre los mezcales, aún de la misma región y del mismo Agave. Esta diferencia se podría

pensar que contribuye al sabor y olor característico de cada mezcal ya que de acuerdo a la literatura la presencia de terpenos en bebidas y alimentos se asocia con patrones de sabor y olor. Por otro lado, se debe recordar que no solo los terpenos que se cuantificaron contribuyen a las características específicas que imparten estos compuestos sino todos los compuestos identificados bajo estas condiciones.

La Tabla 7 muestra los compuestos que fueron cuantificados, así como algunas de sus características y el ión fragmento (m/z) que se utilizó para su cuantificación.

Tabla 7. Estructuras de los terpenos cuantificados

Terpeno	<i>t</i> retención (min)	Estructura	Formula mínima	Ión m/z
Linalol	13.80		C ₁₀ H ₁₈ O	71
4-terpineol	16.13		C ₁₀ H ₁₈ O	71
α-terpineol	16.54		C ₁₀ H ₁₈ O	59
β-Citronelol	17.56		C ₁₀ H ₁₈ O	69
Geraniol	18.10		C ₁₀ H ₁₈ O	69
Eugenol	26.26		C ₁₀ H ₁₂ O ₂	164
cis-Nerolidol	21.11		C ₁₅ H ₂₆ O	69
trans- Farnesol	29.83		C ₁₅ H ₂₆ O	69

Evaluación del sistema:

Linealidad y Precisión

La linealidad y precisión del sistema cromatográfico se evaluó inyectando diferentes disoluciones estándar en un intervalo entre 50 – 1000 ng/mL. Con estos puntos se construyeron las curvas de calibración y se obtuvo la ecuación correspondiente (se realizó por triplicado).

El límite de detección considerado como la concentración a la cual el analito presenta una señal 2 veces mayor a la del ruido de fondo se obtuvo mediante procedimientos estadísticos. Los resultados se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Curva patrón

<i>Compuesto</i>	<i>Pendiente</i>	<i>Ordenada</i>	r^2	<i>LD</i>
Linalol	0.7605	-0.0159	0.9996	17.3 ng/mL
4-Terpineol	0.7551	-0.0116	0.9996	40.1 ng/mL
α -Terpineol	1.1279	-0.0196	0.9996	12.7 ng/mL
β -Citronelol	0.5628	-0.0241	0.9985	25.8 ng/mL
Eugenol	0.8489	-0.0378	0.9971	42.4 ng/mL
<i>cis</i> -Nerolidol	0.6784	-0.0624	0.9991	27.7 ng/mL
<i>trans</i> -Farnesol	0.5432	-0.0795	0.9907	26.5 ng/mL

LD = límite de detección

Se puede notar que los coeficientes de correlación para las ecuaciones de las curvas de todos los terpenos es superior a 0.99 lo que nos indica que tienen un comportamiento lineal en el intervalo de concentración utilizado. Por otra parte los límites de detección son adecuados para permitirnos detectar concentraciones muy bajas de estos compuestos.

Cuantificación

La cuantificación de los terpenos en los mezcales se realizó por triplicado utilizando las curvas de calibración. Los resultados se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Cuantificación (ng/mL) de terpenos en mezcal por ELL; (n = 3)

<i>Mezcal / Compuesto</i>	<i>Linalol</i>	<i>4-Terpineol</i>	<i>α-Terpienol</i>	<i>β-Citronelol</i>	<i>Eugenol</i>	<i>cis-Nerolidol</i>	<i>trans-Farnesol</i>
Agave Divino	101.3 \pm 5.7	ND	328.9 \pm 13.5	81.0 \pm 5.2	122.0 \pm 8.8	125.3 \pm 8.1	ND
El Señorío	241.3 \pm 12.4	ND	489.8 \pm 14.8	113.9 \pm 4.0	85.8 \pm 3.1	146.4 \pm 4.7	ND
Rey Zapoteco	169.1 \pm 4.3	ND	369.3 \pm 0.8	135.3 \pm 6.9	202.6 \pm 10.6	194.4 \pm 6.5	225.5 \pm 14.4
Espina Dorada	73.4 \pm 2.6	ND	138.4 \pm 2.4	90.0 \pm 4.1	143.2 \pm 2.7	128.0 \pm 3.4	226.1 \pm 3.8
El Famoso	240.5 \pm 10.9	ND	439.9 \pm 27.3	186.6 \pm 10.6	107.8 \pm 2.8	ND	307.5 \pm 18.2
Oro de Oaxaca	83.1 \pm 2.0	ND	149.6 \pm 4.6	79.1 \pm 1.3	86.2 \pm 4.0	132.9 \pm 2.1	197.5 \pm 2.6
Laguna Seca	727.0 \pm 29.3	111.4 \pm 9.6	1434.0 \pm 50.0	277.4 \pm 9.0	200.6 \pm 12.2	122.2 \pm 4.2	224.2 \pm 8.4
Casarrobias	263.4 \pm 4.4	ND	594.7 \pm 11.3	170.0 \pm 6.9	161.7 \pm 4.2	160.0 \pm 6.3	212.8 \pm 6.4
Calzada	895.9 \pm 29.8	ND	1377.8 \pm 29.6	532.5 \pm 23.4	90.1 \pm 2.4	181.3 \pm 9.3	186.6 \pm 5.0

ND = No detectado; NQ = No Cuantificado

Podemos observar que el α -terpineol es el terpeno de mayor concentración en todas las muestras analizadas encontrándose en un intervalo de concentración amplio que va de 150 -1500 ng/mL; el siguiente es el linalol que va de 80 a 900 ng/mL. Los otros 5 terpenos cuantificados se encuentran en menor concentración y varían para cada muestra, incluso no se identificaron en algunos mezcales, bajo estas condiciones de análisis. Es importante notar que el 4-terpineol y el *cis*-nerolidol son los terpenos que se encuentran en menor concentración como se indica en la Tabla 9.

En las Figuras 11 y 12 se presentan estos resultados en forma gráfica mostrando que el perfil de terpenos en los mezcales analizados es muy variable y no es sencillo encontrar similitudes. Los mezcales “Agave Divino” y “El Señorío” ambos obtenidos de *A. angustifolia* tienen un perfil similar aunque la magnitud de la concentración se distinto. Otra similitud se encuentra ente los mezclaes “Laguna Seca” y “Casarrobias”, aunque provienen de distinto tipo de Agave. Todos los demás mezcales presentan un perfil distinto que aunque tiene cierta similitud esta no es suficientemente como para considerarlos similares.

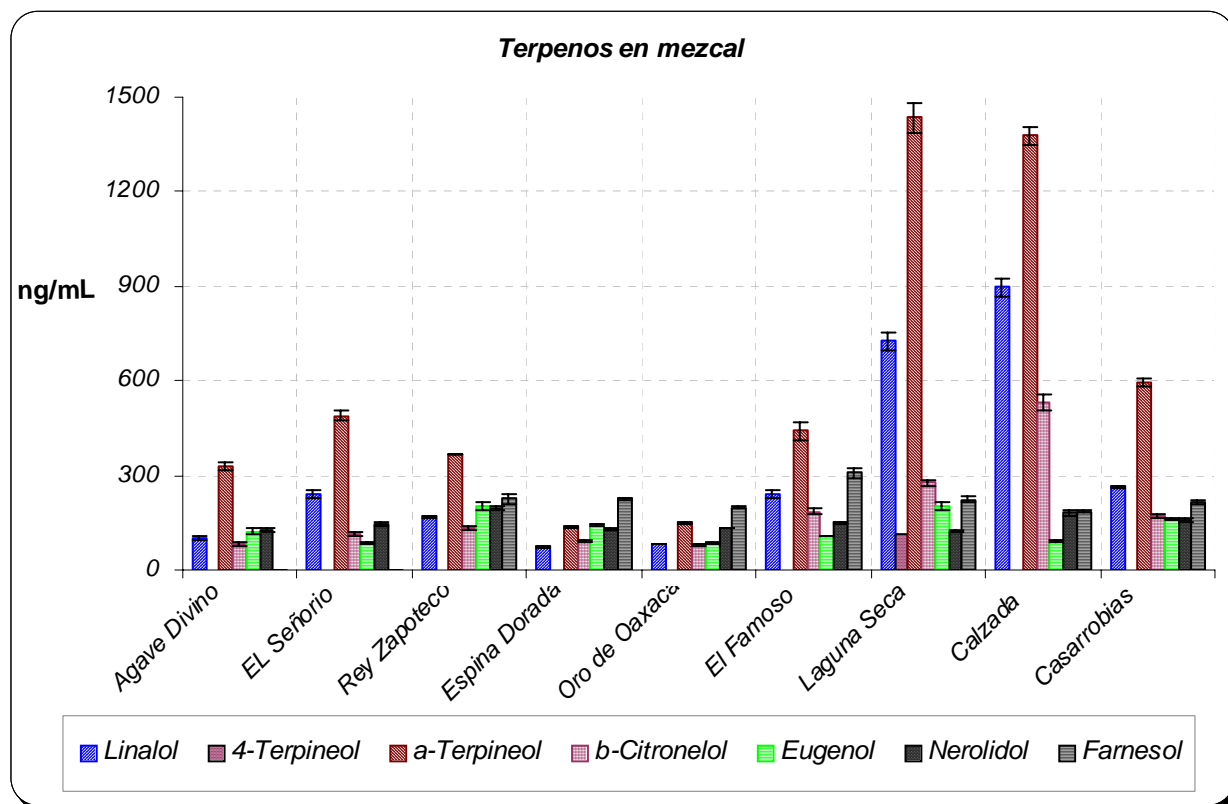
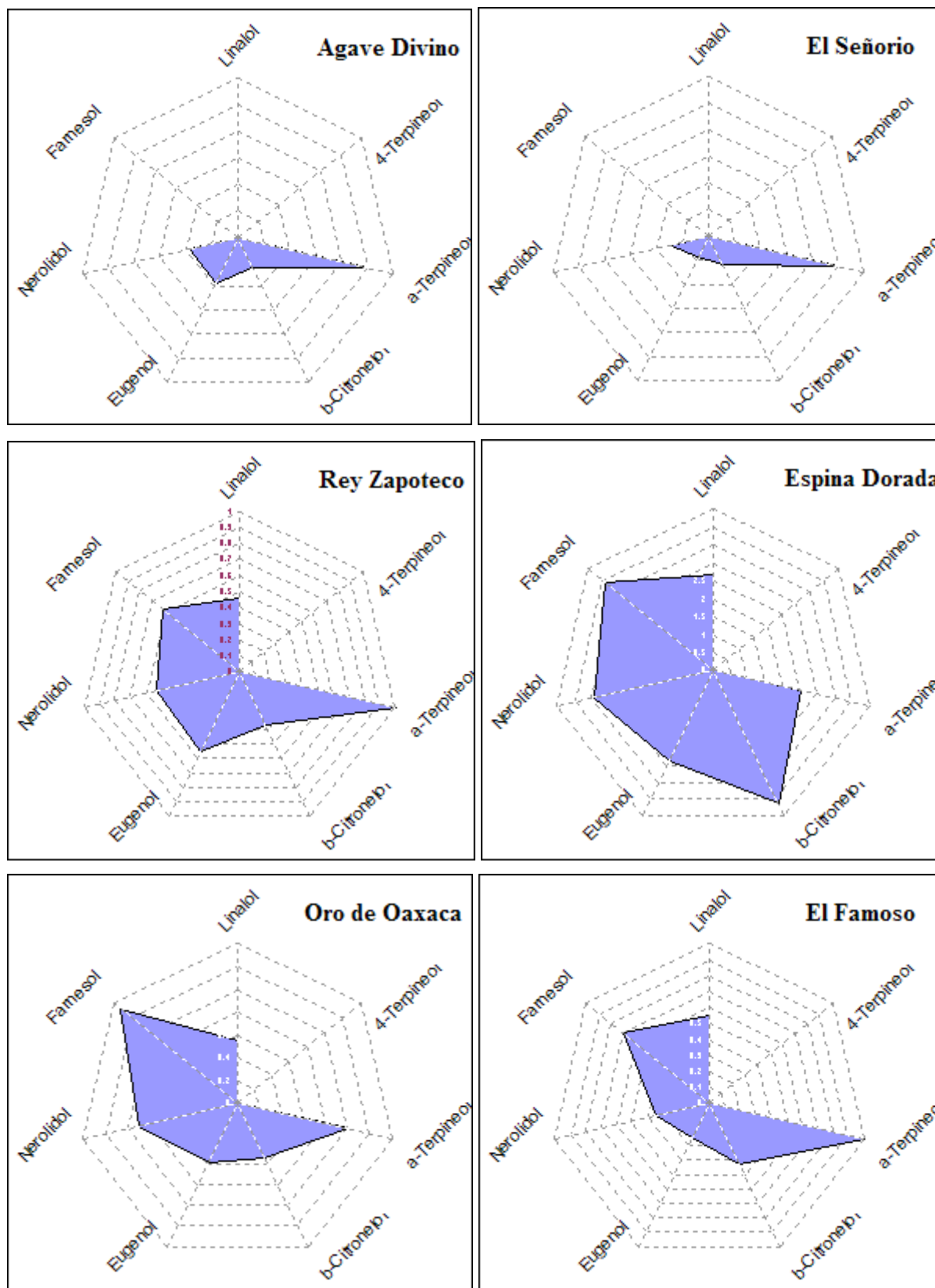


Figura 11. Concentración (ng/mL) de terpenos en mezcal por ELL



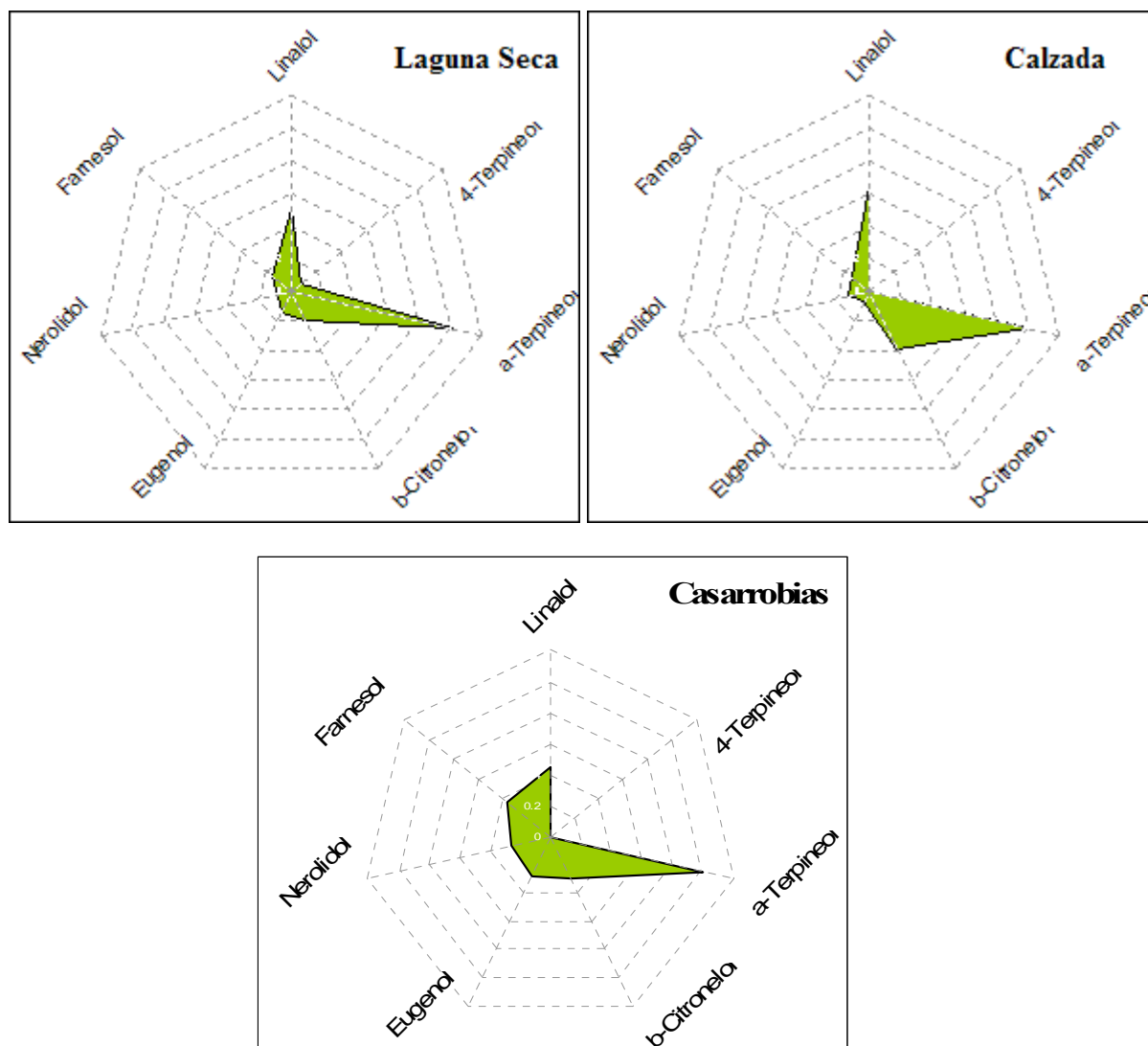


Figura 12. Perfil de terpenos en mezcal por ELL

Es difícil con estos resultados encontrar una relación entre el perfil de terpenos y el tipo de mezcal elaborado en diferentes regiones y con diferente variedad de Agave ya que los perfiles en general son distintos y las similitudes que existen no se relacionan con el tipo de Agave. Esto nos podría indicar que las diferencias que existen en los perfiles de los mezcales probablemente sean debido a las cepas utilizadas durante la fermentación mientras que las diferencias en cuanto a concentración de terpenos son debidas probablemente al tipo de producción así como a las condiciones de destilación.

Tabla 10. Concentración (ng/mL) total de terpenos en mezcal por ELL

<i>Mezcal</i>	<i>Concentración</i>	<i>Mezcal</i>	<i>Concentración</i>
Agave Divino	758.7 ± 41.6	Oro de Oaxaca	728.6 ± 16.7
El Señorío	1077.6 ± 39.3	Laguna Seca	3097.0 ± 122.9
El Rey Zapoteco	1296.5 ± 43.7	Casarrobias	1562.4 ± 39.9
Espina Dorada	799.4 ± 19.3	Calzada	3264.5 ± 99.6
E Famoso	1432.3 ± 75.0		

Esta variabilidad en la concentración de terpenos se puede manifestar en diferencias importantes en aroma y sabor que presenta cada uno de los mezcales estudiados ya que muestran propiedades sensoriales muy marcadas, por ejemplo, el mezcal “Laguna Seca” con la mayor concentración total de terpenos presenta un aroma muy fuerte y diferente entre los mezcales estudiados.

La reproducibilidad de la metodología es aceptable para los propósitos de este trabajo ya que el coeficiente de variación obtenido es menor al 10% para cada terpeno en todas las muestras (Valores mostrados en Anexo).

6.3 Determinación de terpenos en mezcal por Microextracción en Fase Sólida (MEFS)

La Figura 13 muestra el cromatógrama del análisis por MEFS del mezcal “Agave Divino” en el cual observamos que además de extraerse los 7 terpenos antes cuantificados por ELL también se extrae el geraniol.

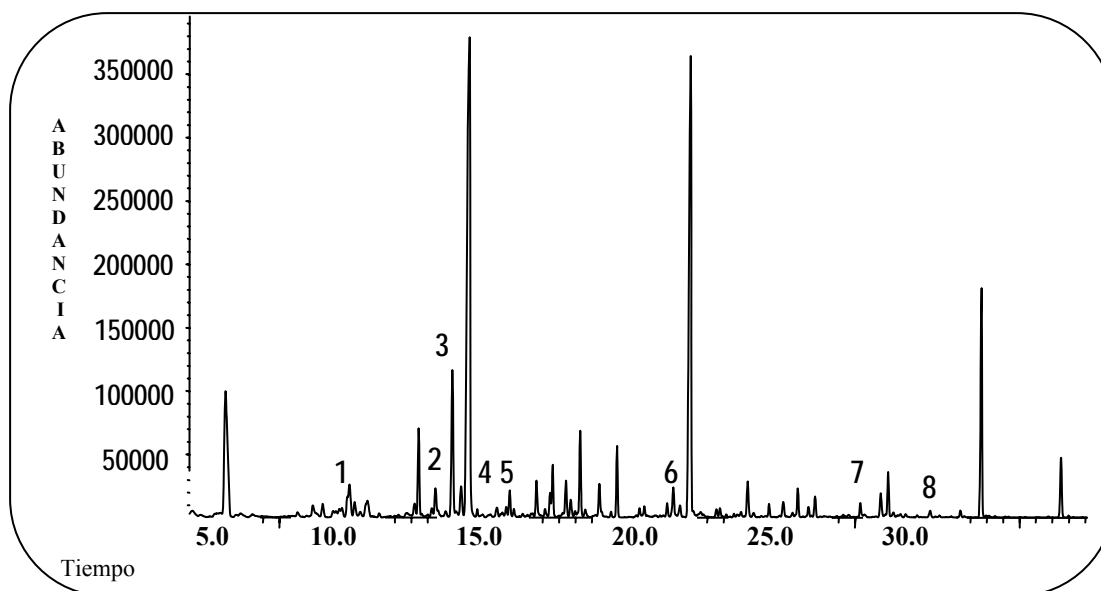


Figura 13. Cromatograma iónico total del análisis por MEFS del mezcal Agave Divino.

1) Linalol 2) 4-Terpineol 3) α -Terpineol 4) β -Citronelol 5) Geraniol 6) Eugenol 7) Nerolidol 8) Farnesol

Como se puede observar en el cromatograma, los terpenos cuantificados están bien resueltos aun cuando se encuentran a baja concentración y están presentes gran número de compuestos.

Evaluación del sistema:

Linealidad y precisión

Los coeficientes de correlación para las ecuaciones de las curvas de todos los terpenos es superior a 0.99 lo que nos indica que tienen un comportamiento lineal en el intervalo de concentración estudiado. Por otra parte los límites de detección van de 24 a 100 ng/mL dependiendo del terpeno. Los resultados se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11. Curva patrón

<i>Compuesto</i>	<i>Pendiente</i>	<i>Ordenada</i>	r^2	<i>LD</i>
Linalol	0.1405	4.2×10^{-3}	0.9976	24.8 ng/mL
4-Terpineol	0.0444	4.0×10^{-4}	0.9908	31.3 ng/mL
α -Terpineol	0.0416	3.4×10^{-3}	0.9951	16.9 ng/mL
β -Citronelol	0.0512	-6.6×10^{-5}	0.9944	45.8 ng/mL
Eugenol	0.0334	-2.8×10^{-4}	0.9919	89.2 ng/mL
<i>cis</i> -Nerolidol	0.0044	-1.0×10^{-3}	0.9488	27.4 ng/mL
<i>trans</i> -Farnesol	0.1212	4.2×10^{-3}	0.9945	100 ng/mL

LD = límite de detección

Cuantificación

La cuantificación de los terpenos en los mezcales se realizó por triplicado utilizando las curvas de calibración. Los resultados se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12. Cuantificación (ng/mL) de terpenos en mezcal por MEFS; (n = 3)

<i>Mezcal / Compuesto</i>	<i>Linalol</i>	<i>4-Terpineol</i>	<i>α-Terpienol</i>	<i>β-Citrpnelol</i>	<i>Geraniol</i>	<i>Eugenol</i>	<i>cis-Nerolidol</i>	<i>trans-Farnesol</i>
Agave Divino	107.2 \pm 6.7	38.4 \pm 2.8	572.8 \pm 18.6	65.6 \pm 1.8	35.6 \pm 2.2	NQ	NQ	ND
El Señorío	243.1 \pm 4.3	69.3 \pm 4.3	828.2 \pm 43.0	106.4 \pm 1.5	67.0 \pm 3.8	ND	NQ	ND
Rey Zapoteco	160.3 \pm 3.3	NQ	554.2 \pm 30.5	102.5 \pm 7.4	50.8 \pm 5.3	NQ	ND	ND
Espina Dorada	66.9 \pm 0.1	ND	137.2 \pm 18.4	73.4 \pm 4.2	NQ	ND	NQ	ND
El Famoso	246.5 \pm 3.4	ND	700.5 \pm 63.2	166.2 \pm 2.8	83.7 \pm 5.0	NQ	NQ	ND
Oro de Oaxaca	78.4 \pm 4.6	ND	232.5 \pm 10.3	63.7 \pm 4.5	NQ	NQ	NQ	ND
Laguna Seca	795.1 \pm 9.5	127.1 \pm 10.4	2269 \pm 90.9	268.7 \pm 17.3	500.5 \pm 45.3	381.6 \pm 9.2	NQ	193.2 \pm 14.6
Casarrobias	232.1 \pm 15.1	NQ	707.6 \pm 42.8	NQ	NQ	NQ	NQ	ND
Calzada	812.2 \pm 15.3	NQ	1486 \pm 45.8	483.7 \pm 4.1	183.9 \pm 8.0	NQ	ND	ND

ND = No detectado

NQ = No cuantificado

Como se observa en los resultados de la Tabla 12, el procedimiento de análisis utilizando MEFS no permitió cuantificar eugenol, *cis*-nerolidol y *trans*-farnesol, en la mayoría de las muestras, debido a que la concentración a la que se encuentran esta por debajo de los límites de detección del método utilizado. Cabe recordar en este punto que este procedimiento fue desarrollado para Tequila y solo se aplicó al análisis de Mezcal sin ninguna modificación.

El α -terpineol sigue siendo el de mayor concentración en todos los mezcales llegando incluso a concentraciones del orden de 2200 ng/mL; el *cis*-nerolidol vuelve a ser el terpeno minoritario en todos los mezcales donde solo fue identificado en 7 de las 9 muestras, pero a una concentración tan baja que no pudo ser cuantificado.

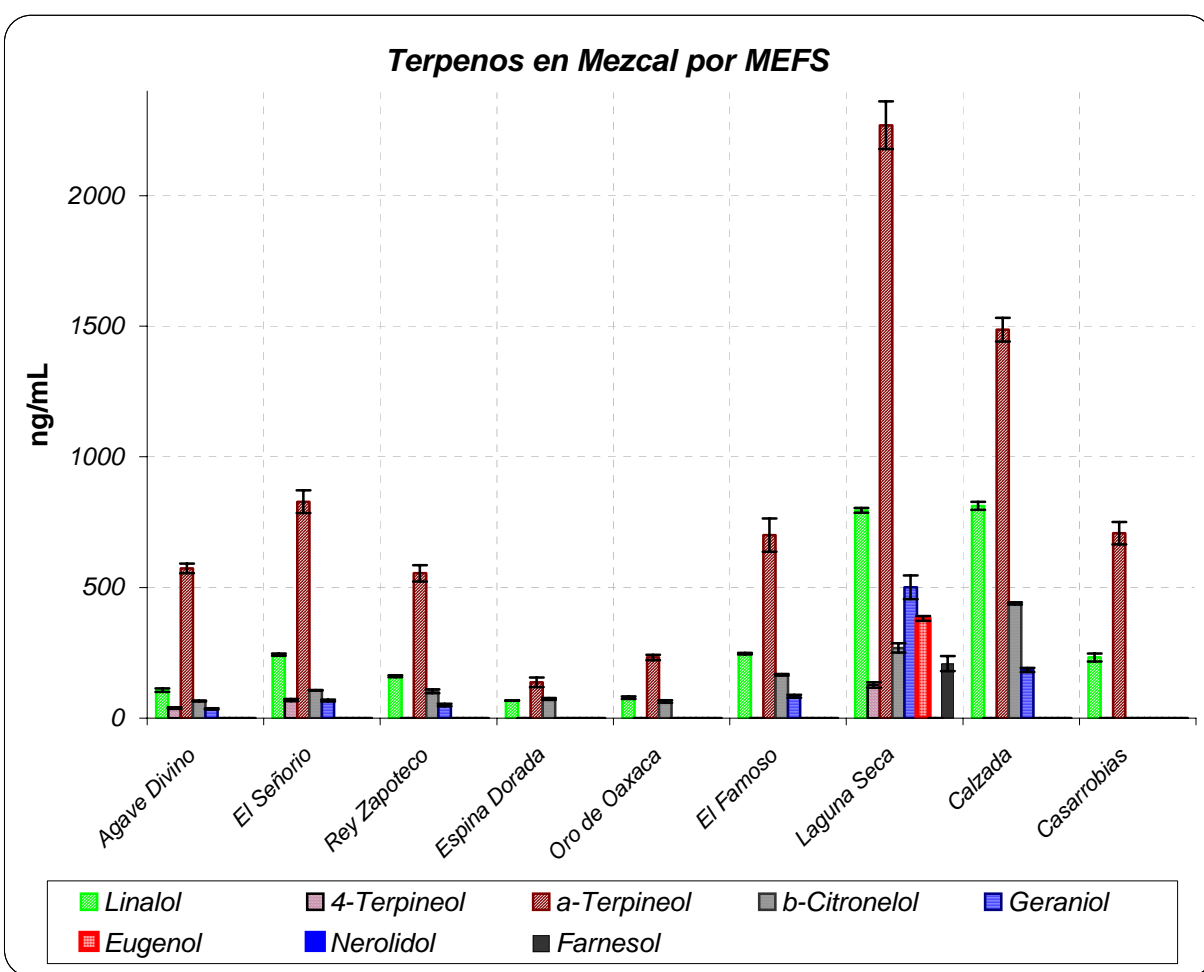
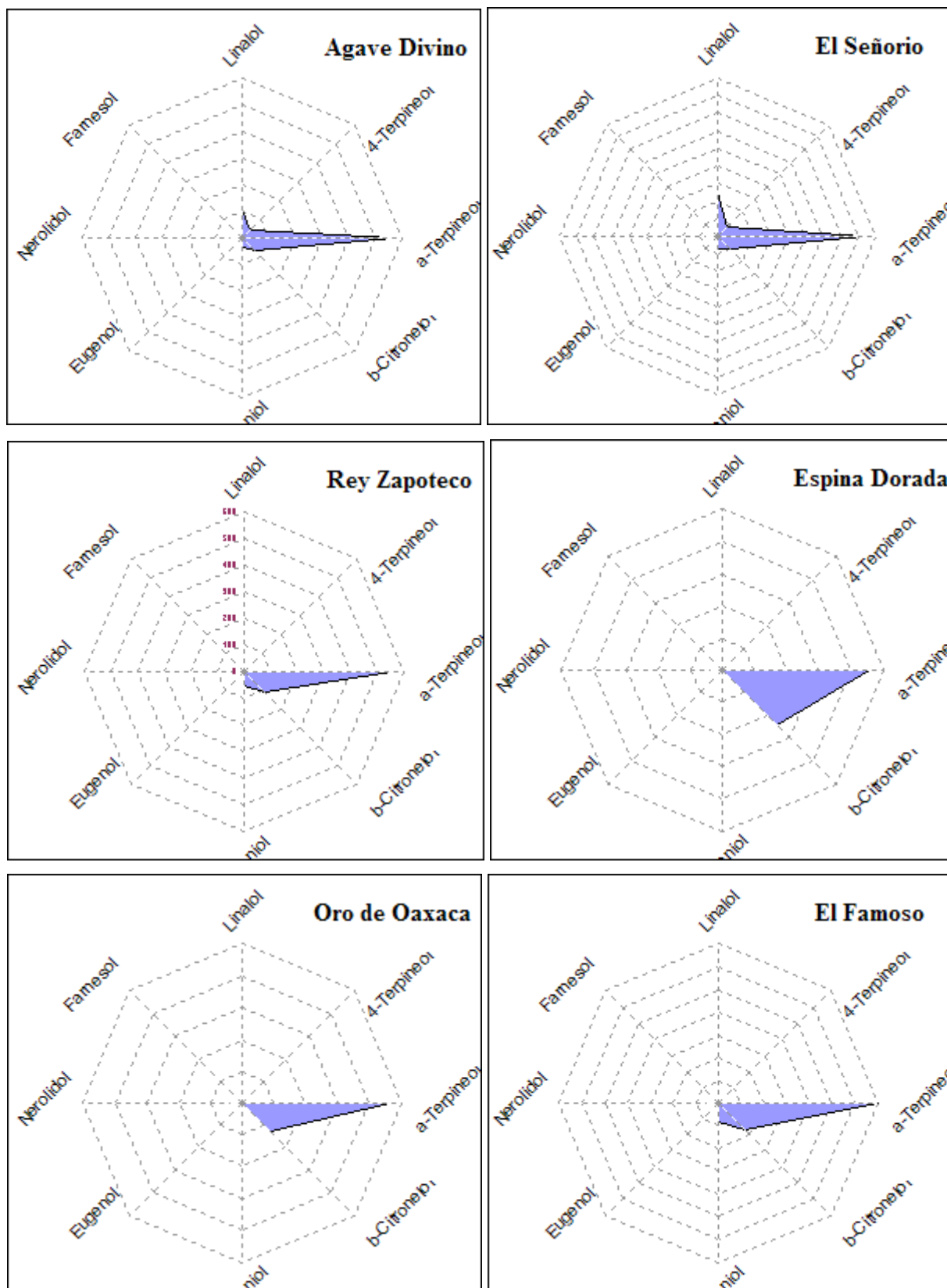


Figura 14. Concentración (ng/mL) de terpenos en mezcal por MEFS



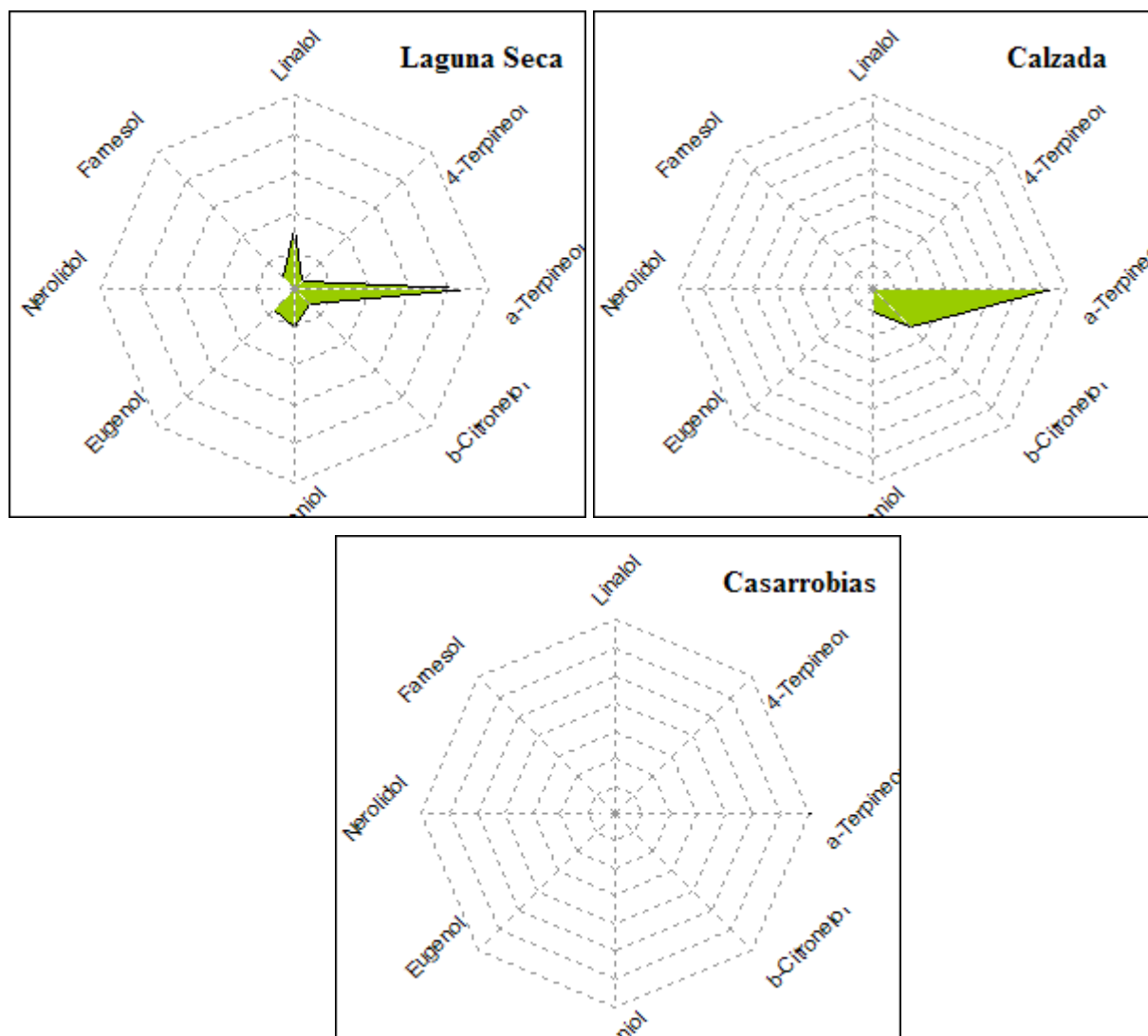


Figura 15. Perfiles de terpenos por MEFS

Como se puede observar en las Figuras 14 y 15 existen similitudes entre algunos perfiles de terpenos en los mezcales, podemos distinguir la similitud entre “Agave Divino” y “El Señorío” misma que también se mostró en ELL. Por otra parte existe una similitud importante entre los mezcales “Rey Zapoteco”, “Oro de Oaxaca”, “El Famoso” y “Calzada”, siendo los primeros tres originarios de Oaxaca y elaborados con *Agave A. angustifolia* mientras que el último tiene su origen en Guerrero y es elaborado con *A. cupreata*. Los tres mezcales restantes presentan un perfil de terpenos muy distinto. Con lo anterior, no podemos relacionar el perfil de terpenos con el *Agave* de procedencia o la región de origen, por lo que las similitudes y diferencias que existen

son probablemente atribuidas a la cepa de *Sacharomyces cerevisiae* que es utilizada durante el proceso de elaboración.

En la Tabla 13 se presenta la concentración total de terpenos para cada mezcal, observándose que en general, se obtuvo el mismo comportamiento que con los resultados obtenidos por ELL; es decir, el mezcal con mayor concentración de terpenos fue “Laguna Seca” elaborado con *A. salmiana* en segundo lugar los dos mezcales de origen Guerrerense que son elaborados con *A. cupreata* y los 6 mezcales producidos en Oaxaca con *A. angustifolia* presentan una concentración total de terpenos menor al de los mezcales de San Luís Potosí y Guerrero.

Tabla 13. Concentración (ng/mL) total de terpenos en mezcal por ELL

<i>Mezcal</i>	<i>Concentración</i>	<i>Mezcal</i>	<i>Concentración</i>
Agave Divino	819.9 ± 32.4	Oro de Oaxaca	374.7 ± 19.5
El Señorío	1314.1 ± 57.2	Laguna Seca	4551.5 ± 211.1
El Rey Zapoteco	867.2 ± 47.1	Casarrobias	2921.5 ± 58.0
Espina Dorada	277.7 ± 22.8	Calzada	939.7 ± 73.43
E Famoso	1197.1 ± 74.7		

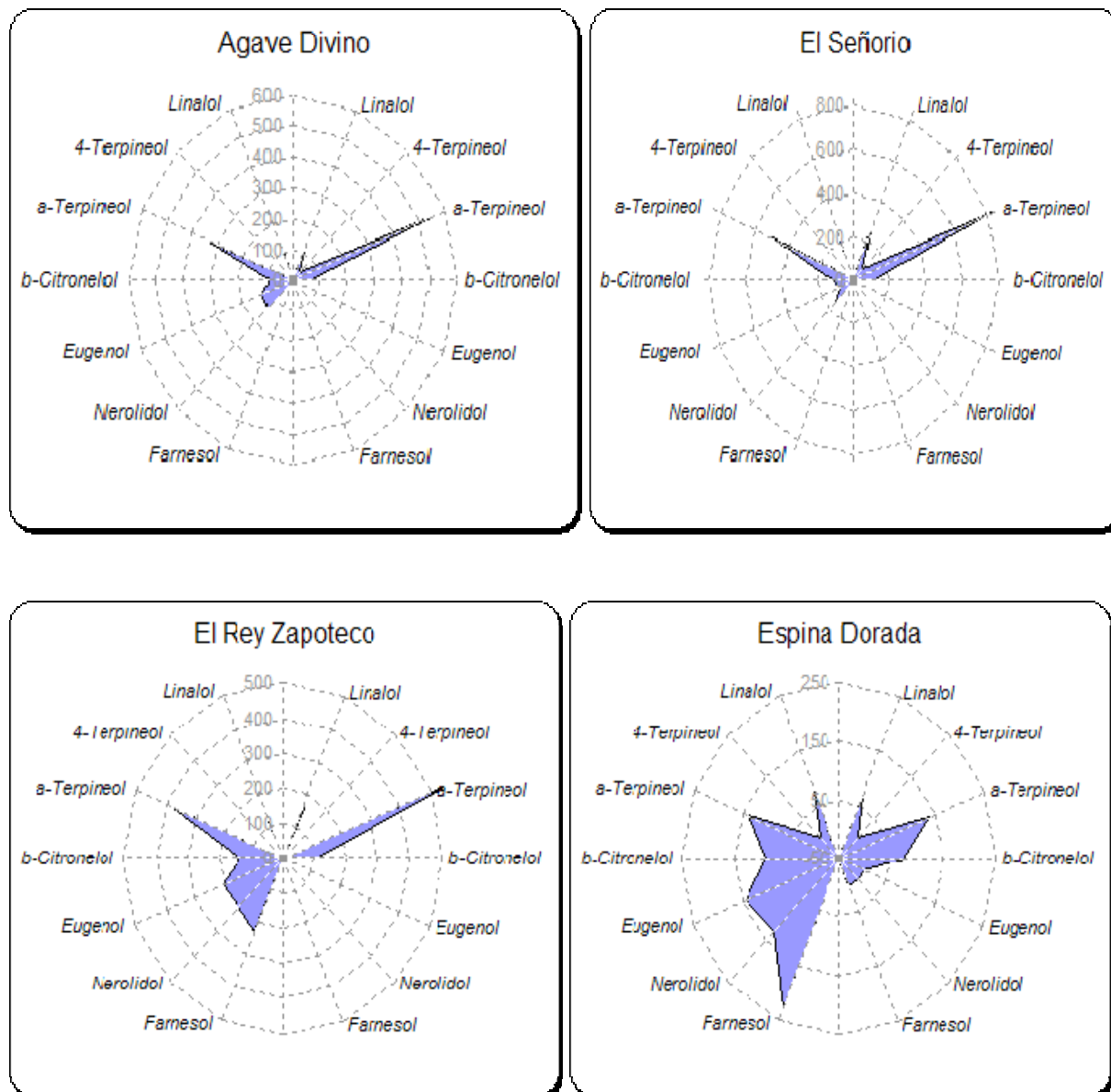
La variabilidad de los resultados es aceptable para distinguir las diferencias entre los mezcales ya que el coeficiente de variación para todos los terpenos en todas las muestras es menor a 15% (Ver anexo) por lo que podemos decir que la reproducibilidad de la metodología es aceptable.

6.4 Comparación de los resultados obtenidos por ELL y MEFS

De acuerdo con los resultados obtenidos, mediante los dos procedimientos utilizados para el análisis de terpenos, solo podremos comparar los resultados de los terpenos que se cuantificaron por ambos procedimientos, es decir solo se compararan linalol, 4-terpineol, α -terpineol y citranelol.

Como se observa en las graficas (Figura 16), existen diferencias importantes entre los resultados obtenidos por ambas metodologías, las figuras nos muestran principalmente una diferencia importante en los 3 últimos terpenos: eugenol, *cis*-nerolidol y *trans*-farnesol, ya que estos compuestos no fueron cuantificados por MEFS. Es importante mencionar que en los resultados

obtenidos por ambos procedimientos, los terpenos que contribuyen con un porcentaje mayor a la concentración total son el α -terpineol ($\approx 50\%$) y el linalol ($\approx 20\%$).



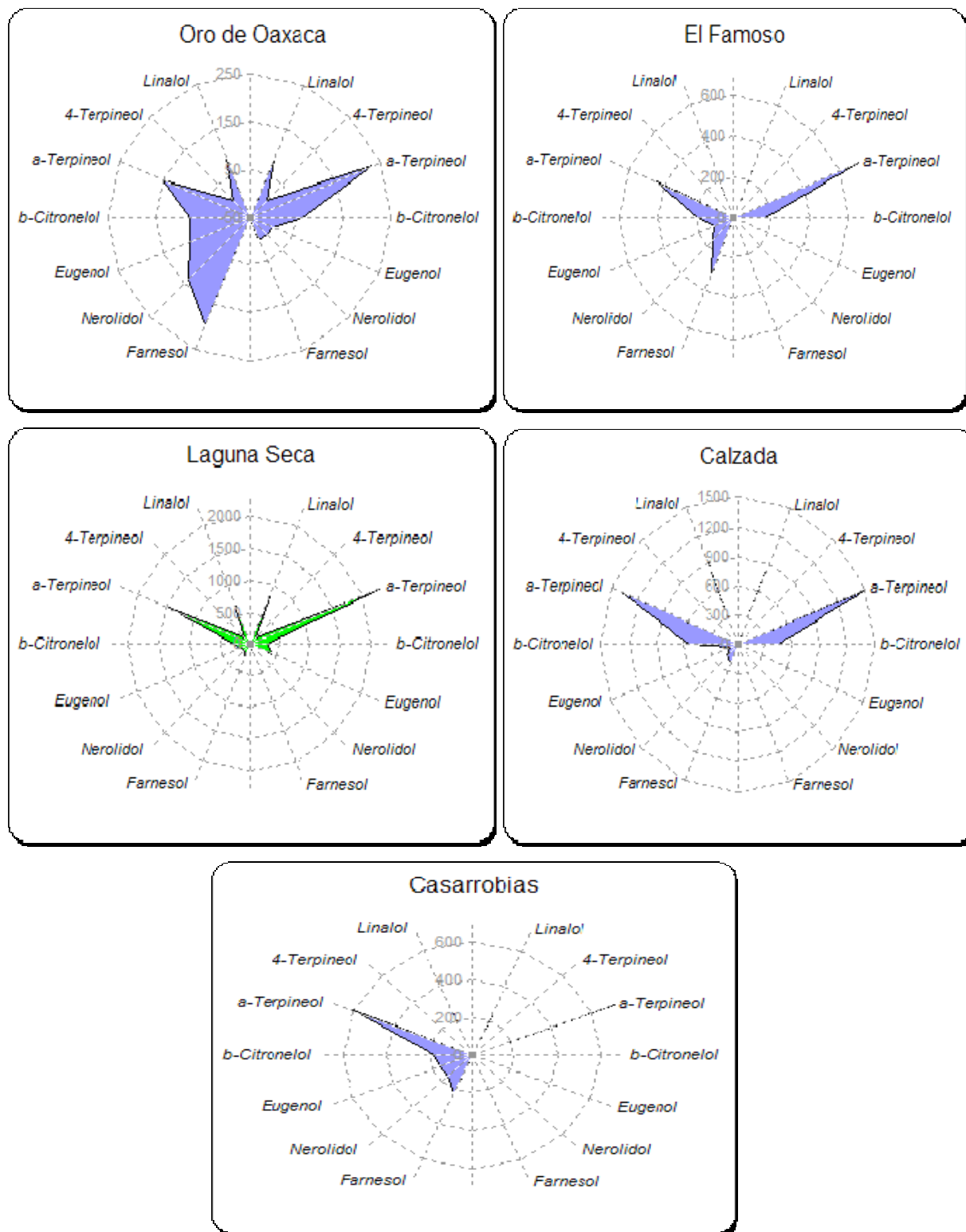


Figura 16. Comparación de terpenos (ng/mL) ELL(izquierda) – MEFS (derecha)

Existen diferencias muy importantes entre las dos metodologías utilizadas en la extracción de terpenos, estas diferencias se manifiestan en la comparación de perfiles mostrada en la Figura 16 donde observamos que con ELL todos los terpenos en estudio se extraen de buena forma y se cuantifican de igual manera, mientras que con MEFS no es posible extraer convenientemente los terpenos Eugenol, Nerolidol y Farnesol por lo cuál no se cuantifican. Esto se puede deber a que las condiciones de microextracción no son las más adecuadas para la extracción de estos compuestos y que requieren de optimización para lograr resultados satisfactorios. En el proceso de optimización de las condiciones de MEFS se intento modificar algunos parámetros para lograr que la extracción fuera efectiva, sin embargo, al modificar estos parámetros, la presencia de interferencias aumentaba haciendo muy difícil la cuantificación. Tal vez sería conveniente optimizar las condiciones cromatográficas modificando los programas o la columna utilizada.

Para analizar estos resultados estadísticamente, se realizaron pruebas t con un nivel de significancia de 0.01 ($\alpha=0.01$) para comprobar estadísticamente si existe o no diferencia significativa entre los resultados encontrados para cada terpeno cuantificado en las muestras obtenidos por los dos procedimientos utilizados. Los resultados se muestran en la Tabla 14.

Hipótesis nula:

$$H_0: \mu_1 = \mu_2$$

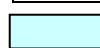
Hipótesis alternativa:

$$H_1: \mu_1 \neq \mu_2$$

Si $t_{cal} < t_{4,0.01}$ la hipótesis nula se acepta

Tabla 14. Prueba t ($\alpha = 0.01$)

Compuesto / Mezcal	Linalol	α -Terpienol	β -Citronelol
Agave Divino			
El Señorío			
Rey Zapoteco			
Espina Dorada			
El Famoso			
Oro de Oaxaca			
Laguna Seca			
Casarrobias			
Calzada			



Significativamente diferente



No diferente

Como se observa, la mayor parte de las comparaciones son significativamente diferentes, principalmente el α -terpineol, donde todas son diferentes.

No es posible establecer con certeza el motivo por el cuál los resultados son distintos para las dos metodologías, probablemente se presentan problemas de interferencias debido a coeluciones que alteran el valor de las áreas de los analitos de interés modificando así el valor de concentración que se calcula. Esta hipótesis se fortalece si tomamos en cuenta que al analizar una solución estándar de concentración conocida por ambas metodologías, la diferencia de los resultados no es significativa.

Para comprobar y corregir este posible problema, tal vez sea conveniente utilizar alguna técnica como cromatografía bidimensional o modificar las condiciones cromatográficas así como la columna utilizada.

6.5 Determinación de ésteres etílicos de ácidos grasos en mezcal por MEFS

Los ésteres etílicos de ácidos grasos se encuentran presentes en bajas concentraciones en relación a los alcoholes, se identificaron y cuantificaron por MEFS-CG-EM. La extracción de estos compuestos se realizó utilizando el mismo procedimiento que para el análisis de terpenos.

La Figura 17 muestra los 7 ésteres etílicos de ácidos grasos principales que se identificaron.

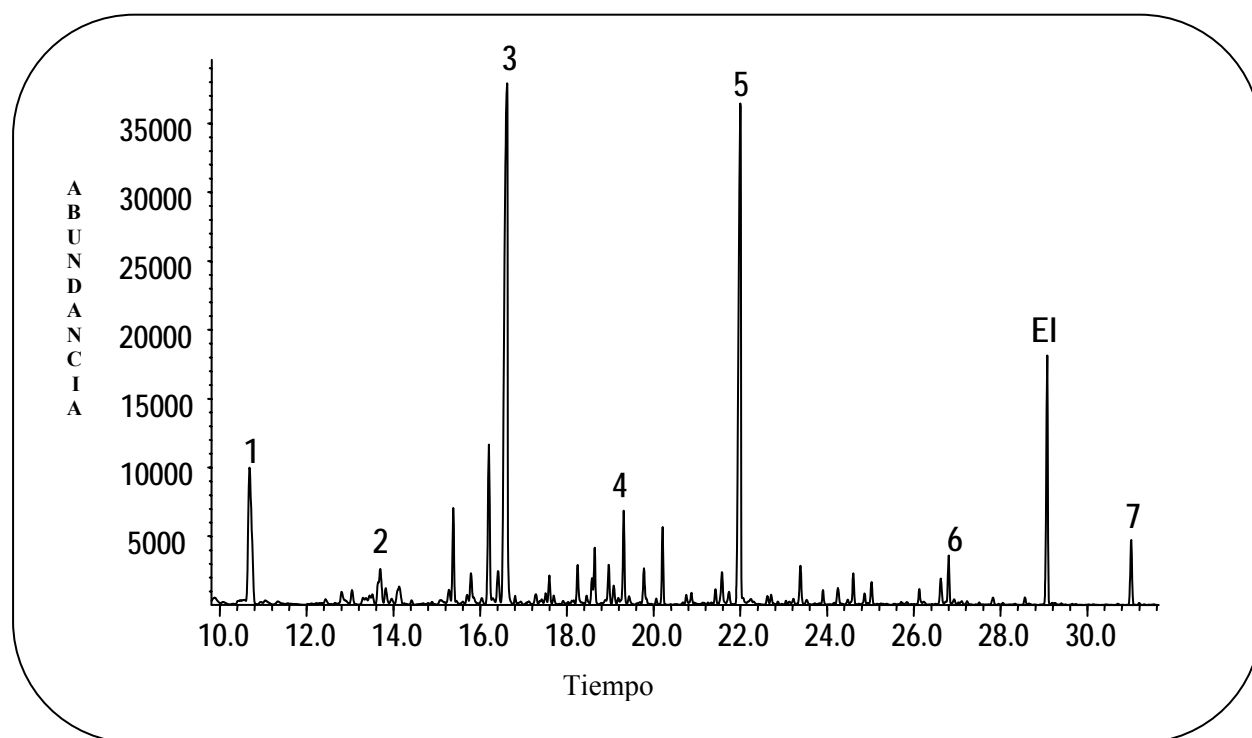


Figura 17. Cromatograma iónico total del mezcal Agave Divino (TIC). 1. Hexanoato; 2. Heptanoato; 3. Octanoato; 4. Nonanoato; 5. Decanoato; 6. Dodecanoato; 7. Tetradecanoato; EI. Estándar Interno

La mayoría de los ésteres etílicos de ácidos grasos cuantificados están presentes en todas las muestras de mezcal analizadas a excepción del tetradecanoato de etilo, como se muestra en la Tabla 15. Como se puede observar todos los mezcals presentan los mismos ésteres etílicos de ácidos grasos desde EE6 hasta EE12 y en solo 5 muestras se identificó el EE14.

Tabla 15. Ésteres identificados por CG-EM

Compuesto/ Mezcal	Hexanoato de etilo EE6	Heptanoato de etilo EE7	Octanoato de etilo EE8	Nonanoato de etilo EE9	Decanoato de etilo EE10	Dodecanoato de etilo EE12	Tetradecanoato de etilo EE14
Agave Divino	X	X	X	X	X	X	X
El Señorío	X	X	X	X	X	X	X
Rey Zapoteco	X	X	X	X	X	X	X
Espina Dorada	X	X	X	X	X	X	--
Oro d Oaxaca	X	X	X	X	X	X	--
El Famoso	X	X	X	X	X	X	X
Laguna Seca	X	X	X	X	X	X	--
Calzada	X	X	X	X	X	X	X
Casarrobias	X	X	X	X	X	X	--

X: Identificado, --: No identificado

Para la cuantificación de los ésteres etílicos de ácidos grasos en mezcal se elaboraron curvas patrón para cada uno de ellos con diferente intervalo de concentración: para EE6 y EE12 de 60 – 1000 ng/mL; para EE7 y EE14 de 30 – 500 ng/mL y para EE8 y EE10 de 125 – 2000 ng/mL. Para la cuantificación de EE9 se utilizó la curva de calibración de EE10. Se utilizó como estándar interno al EE13 (tridecanoato de etilo) a una concentración de 750 ng/mL. Los resultados se muestran en la Tabla 16.

Tabla 16. Curva patrón; (n = 3)

Compuesto	Tr (min)	Pendiente	Ordenada	r^2
EE6	10.78	3.412	- 0.074	0.9901
EE7	13.75	5.942	- 0.101	0.9922
EE8	16.71	3.743	0.280	0.9975
EE9	22.14	3.195	0.366	0.9988
EE10	22.14	3.195	0.366	0.9988
EE12	26.95	2.539	0.012	0.9989
EE14	31.32	0.499	- 0.003	0.9922

r^2 = coeficiente de correlación

Como se observa en la Tabla 16 se obtuvieron coeficientes de correlación $r^2 > 0.99$ para todas los ésteres etílicos de ácidos grasos analizados, lo que nos indica una buena linealidad en el intervalo de concentraciones utilizado.

La cuantificación de los ésteres etílicos de ácidos grasos en cada uno de los mezcales analizados se muestra en la Tabla 17.

Tabla 17. Ésteres etílicos de ácidos grasos en mezcal por MEFS (ng/mL) (n = 3)

Mezcal / Compuesto	EE6	EE7	EE8	EE9	EE10	EE12	EE14
Agave Divino	251.9 ± 9.4	31.6 ± 1.3	942.6 ± 91.4	68.52 ± 2.23	813.0 ± 65.9	74.0 ± 6.6	21.6 ± 3.0
El Señorío	101.5 ± 9.4	37.2 ± 2.6	778.8 ± 80.6	77.12 ± 5.49	693.6 ± 67.7	109.1 ± 9.9	35.6 ± 3.7
Rey Zapoteco	1077 ± 64.8	109.0 ± 5.5	4989 ± 220.5	121.73 ± 6.36	4577 ± 144.0	2049 ± 92.5	23.4 ± 1.1
Espina Dorada	618.1 ± 47.4	86.4 ± 2.6	3290 ± 766.9	119.48 ± 1.24	3785 ± 147.6	1595 ± 271.6	ND
El Famoso	571.6 ± 8.8	48.6 ± 1.7	2560 ± 111.1	77.14 ± 2.95	2564 ± 29.0	916.5 ± 55.2	ND
Oro de Oaxaca	441.9 ± 10.5	28.6 ± 0.9	1987 ± 139.4	70.3 ± 0.85	2121 ± 143.6	878.5 ± 114.1	ND
Laguna Seca	1491 ± 64.0	130.5 ± 9.7	844.3 ± 63.8	67.57 ± 1.49	1096 ± 39.6	154.6 ± 21.2	ND
Casarrobias	1431 ± 199.5	138.4 ± 12.1	9465 ± 700	186.41 ± 38.94	8618 ± 546	224.5 ± 19.4	ND
Calzada	1070 ± 101.2	92.6 ± 9.0	6547 ± 741.7	166.16 ± 13.51	6315 ± 585.6	2416 ± 118.8	ND

ND = No detectado

En la Tabla 17 observamos que en cada uno de los mezcales analizados la concentración de los ésteres etílicos de ácidos grasos es diferente, incluso el orden de concentración es amplio. Para el caso del EE14 éste solo se cuantificó en tres de las nueve muestras analizadas.

La variabilidad de los resultados es menor al 15% (Ver anexo) por lo que podemos decir que la reproducibilidad de la metodología es aceptable para los propósitos de este trabajo. Estos resultados los podemos apreciar de forma gráfica en la Figura 18.

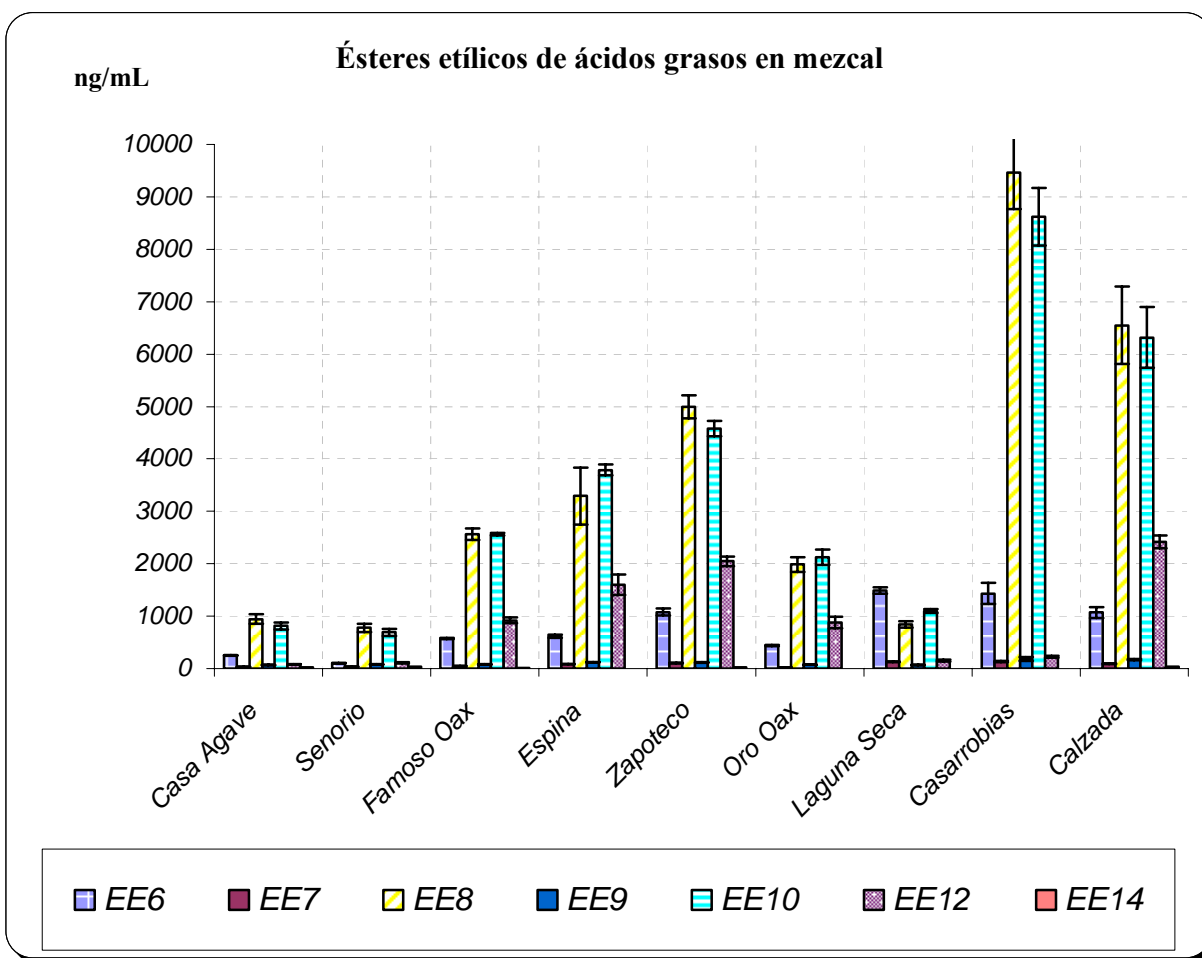
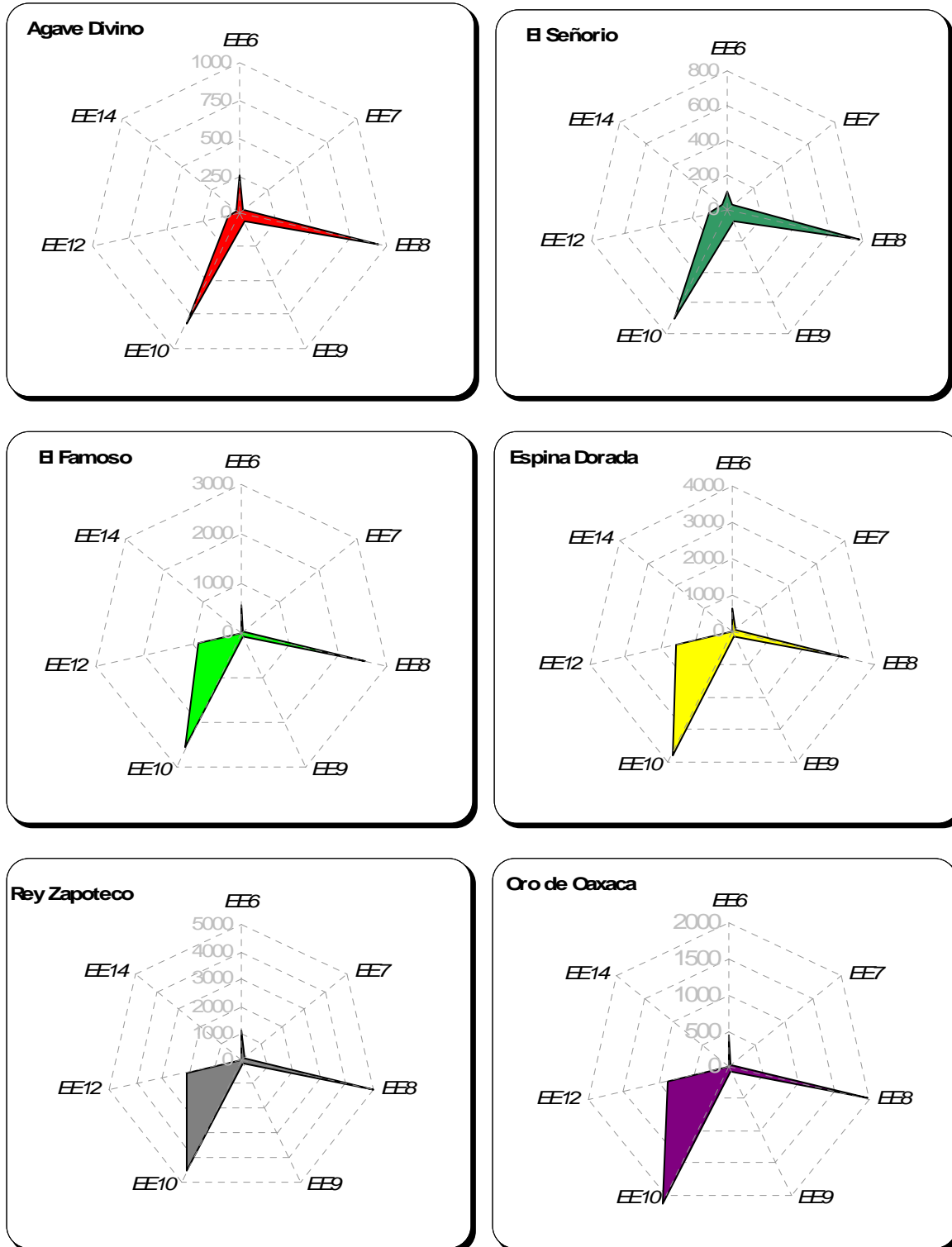


Figura 18. Concentración (ng/mL) de ésteres etílicos de ácidos grasos en mezcal por MEFS

Los ésteres etílicos de ácidos grasos son los compuestos de mayor concentración que se identificaron por MEFS-CG-EM, estos tienen una participación importante en el aroma de los alimentos que los contienen y en este caso las bebidas alcohólicas no son la excepción²⁵.

Podemos observar que en general el EE8 y EE10 son los de mayor concentración en la mayoría de las muestras analizadas. El EE8 es el de mayor concentración en 6 de las 9 muestras analizadas y le sigue el EE10. Las otras 3 muestras presentan al EE10 ligeramente mayor que el EE8. También podemos observar que no se distinguen a simple vista diferencias de los mezcales debido al tipo de Agave utilizado y que la concentración de EE es muy diferente en cada mezcal.

Para poder observar de mejor forma estas similitudes y diferencias, la Figura 19 presenta los perfiles de ésteres étlicos de ácidos grasos de los mezcales analizados.



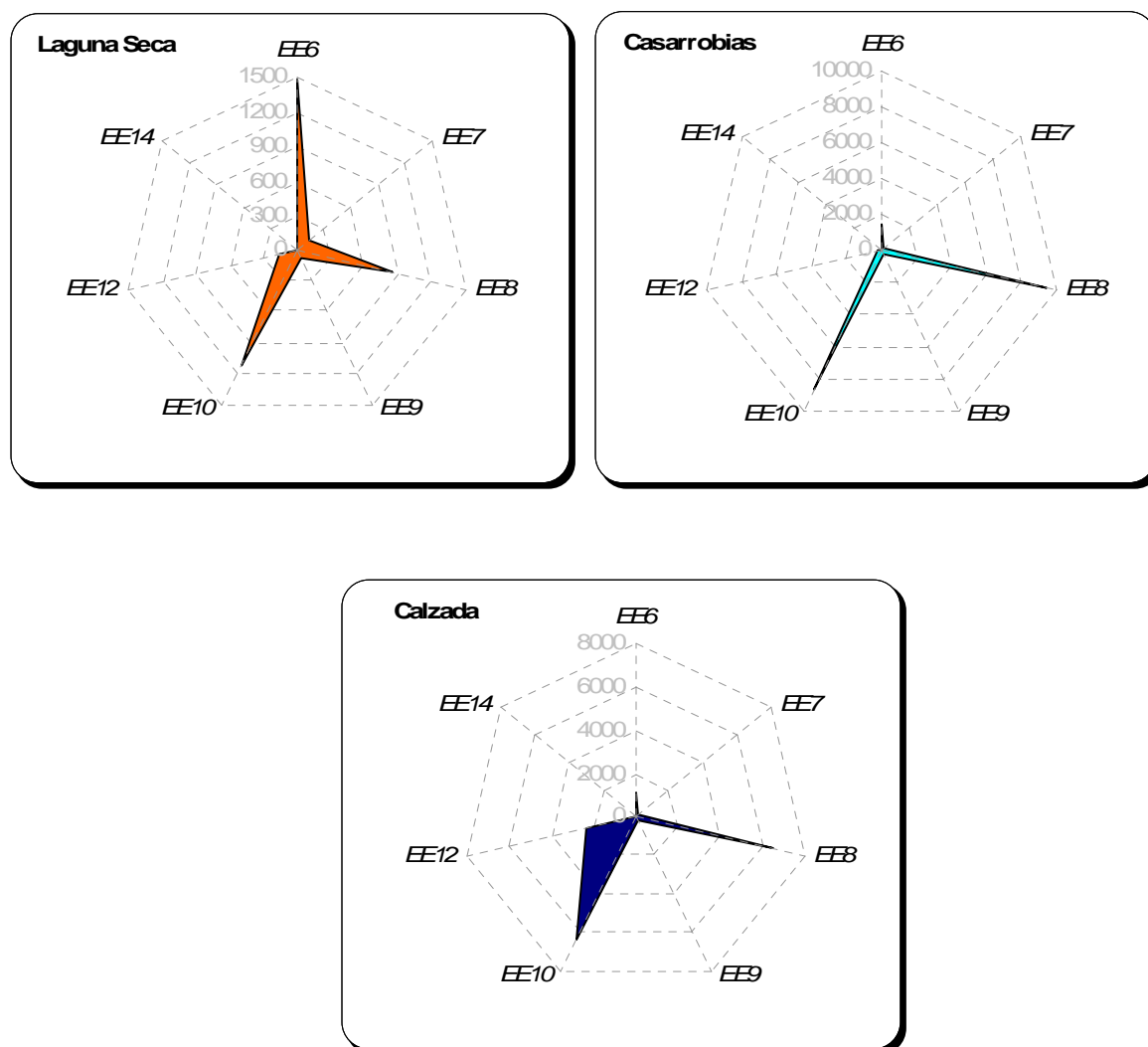


Figura 19. Perfiles de ésteres etílicos de ácidos grasos en mezcal

Podemos observar 3 grupos de mezcales que presentan un perfil similar, el más importante esta formado por los mezcales “Rey Zapoteco”, “Espina Dorada”, “El Famoso”, “Oro de Oaxaca” y “Casarrobias”, los cuales los primeros cuatro corresponden a mezcales de origen oaxaqueño mientras que el último tiene su origen en Guerrero. Todos estos mezcales presentan un perfil muy similar solo que en distintas magnitudes de concentración. Otro grupo es el que se compone por los mezcales “Agave Divino”, “El Señorío” y “Calzada” también mostrando un perfil similar. El único mezcal el cual difiere completamente de todos los demás es el “Laguna Seca” el cual tiene un perfil de ésteres muy distinto al resto.

Con lo anterior podemos decir que la región de origen y el tipo de Agave utilizado para la fabricación de los mezcales no es un factor determinante en el perfil de los ésteres etílicos de ácidos grasos, por lo que las diferencias y similitudes presentes entre las muestras son probablemente debidas al tipo de cepa utilizada, así como a las condiciones de destilación.

6.6 Determinación de alcoholes en mezcal

Se desarrollo una metodología para la determinación de los alcoholes presentes en el mezcal con el objetivo de tener un procedimiento que presentará ventajas con respecto al oficial mencionado en la norma NMX-V-005-NORMEX-2005. Estos procedimientos requieren de gran cantidad de muestra (30 mL), requieren de equipo y reactivos especiales además que generan cantidades importantes de residuos y sobre todo, la inyección de muestra sin tratamiento presenta problemas importantes desde el punto de vista cromatográfico ya que reduce la vida de la columna y se ensucia el inyector además de presentar complicaciones debido a la interferencia de algunos compuestos como ácidos carboxílicos y residuos de azucars presentes y que dificultan la separación y cuantificación de los alcoholes de interés. La metodología propuesta elimina todos esos problemas mediante un procedimiento sencillo y rápido que permite la separación eficiente de los alcoholes, requiriendo poca cantidad de muestra, únicamente 1 mL, generando pocos residuos que a su vez presentan una baja toxicidad y sobre todo, eliminando los problemas cromatográficos que el método de la norma presenta. El uso de ácido silícico como absorbente permite retener algunos compuestos que interfieren en la determinación como los ácidos carboxílicos y residuos de mono y disacáridos.

La Figura 20 muestra el cromatograma del análisis de alcoholes observándose muy limpio y libre de interferencias a diferencia de los cromatogramas obtenidos para otro tipo de compuestos.

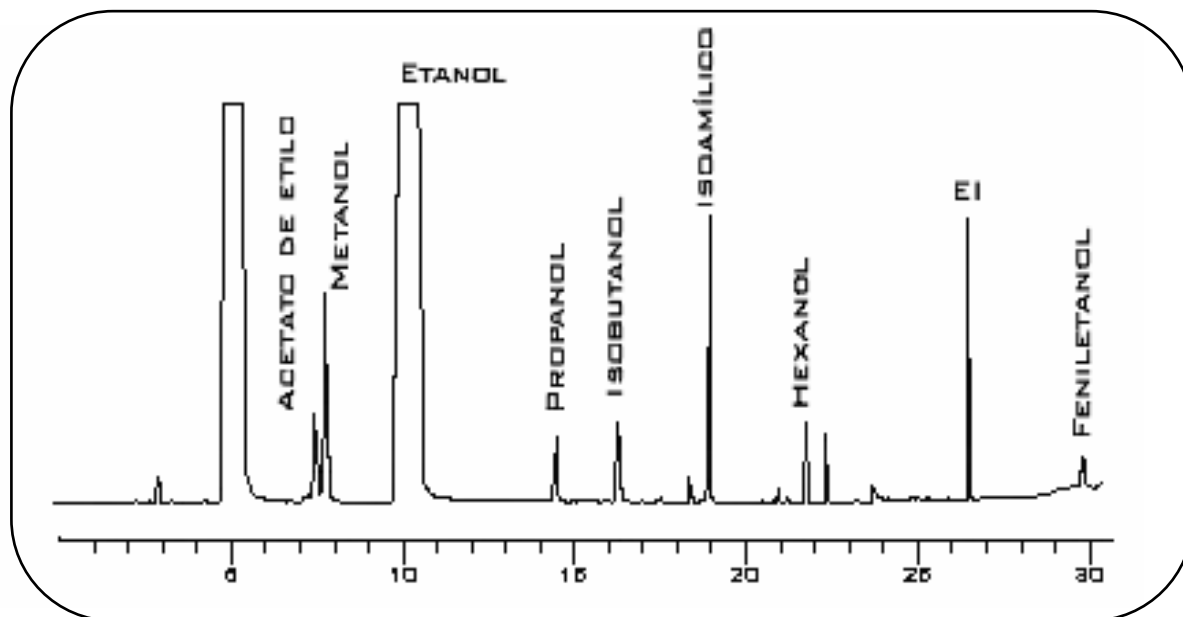


Figura 20. Cromatograma de extracto de mezcal Agave Divino

Para verificar que no había pérdida de los alcoholes por adsorción en el ácido silícico se preparó una disolución (EtOH 46%) fortificada con los estándares de cada uno de estos, adicionada de ácido silícico y se determinó el % de recobro. Los resultados se muestran en la Tabla 18.

Tabla 18. % Recobro de alcoholes

Compuesto	% Recuperación	µg adicionados	µg recuperados
Metanol	92.370	250	230.9
Propanol	90.981	100	90.9
Isobutanol	92.085	200	184.2
Isoamílico	93.782	400	375.1
Hexanol	95.096	50	47.5
Feniletanol	93.358	20	18.6

Como podemos observar en la Tabla 18, el % de recobro de los alcoholes es alto indicando que el ácido silícico no los adsorbe de manera importante, solo adsorbe los ácidos carboxílicos que interferían con la cuantificación.

La cuantificación de los alcoholes en las muestras de mezcal se muestra en la Tabla 19.

Tabla 19. Cuantificación (mg/L) de alcoholes

n = 3

<i>Mezcal / Compuesto</i>	<i>Metanol</i>	<i>Propanol</i>	<i>Isobutanol</i>	<i>Isoamílico</i>	<i>Hexanol</i>	<i>Feniletanol</i>
Agave Divino	327.1 ± 15.3	142.4 ± 8.6	155.6 ± 2.6	302.8 ± 3.6	54.0 ± 1.9	5.3 ± 0.2
El Señorío	485.0 ± 15.4	127.4 ± 3.0	212.1 ± 4.0	508.3 ± 4.2	15.3 ± 0.5	NQ
Rey Zapoteco	420.3 ± 20.6	224.6 ± 3.8	305.7 ± 4.1	862.4 ± 7.0	72.0 ± 0.8	18.5 ± 0.3
Espina Dorada	342.0 ± 22.7	88.5 ± 3.3	378.0 ± 14.3	986.5 ± 21.3	60.3 ± 1.0	30.3 ± 0.8
El Famoso	359.2 ± 6.6	272.3 ± 4.4	227.5 ± 3.79	682.0 ± 6.5	13.1 ± 0.1	2.5 ± 0.1
Oro de Oaxaca	306.7 ± 14.0	80.3 ± 1.8	145.5 ± 3.4	601.0 ± 10.9	17.2 ± 0.3	15.7 ± 0.5
Laguna Seca	82.9 ± 4.3	75.8 ± 4.0	18.2 ± 0.8	49.8 ± 1.9	11.6 ± 0.8	NQ
Casarrobias	68.4 ± 0.8	10.8 ± 0.4	33.7 ± 0.6	150.9 ± 4.5	11.0 ± 0.1	2.3 ± 0.1
Calzada	141.9 ± 8.4	48.2 ± 7.5	56.1 ± 7.3	147.9 ± 6.7	28.9 ± 3.5	1.6 ± 1.0

ND = No Detectado

NQ = No Cuantificado

La variabilidad de los resultados es aceptable para los propósitos de este trabajo ya que es menor al 10% para todos los alcoholes en las muestras (Ver anexo).

Los 5 alcoholes cuantificados (propanol, isobutanol, isoamílico, hexanol y feniletanol) corresponden a los aceites ó “fusel oils” están asociados fuertemente con el sabor que les imparten a las bebidas alcohólicas. En concentraciones adecuadas imparten un sabor agradable conocido como “fusel”, peor cuando se encuentran en concentraciones excesivas pueden impartir sabores amargos y aceitosos que resultan desagradables.

Estos alcoholes pueden formarse durante la fermentación por las levaduras⁹ o mediante reacciones de algunos carbohidratos¹⁰ y dependen de muchos factores para su formación, esto probablemente hace que cada mezcal sea muy particular y diferente a cualquier otro.

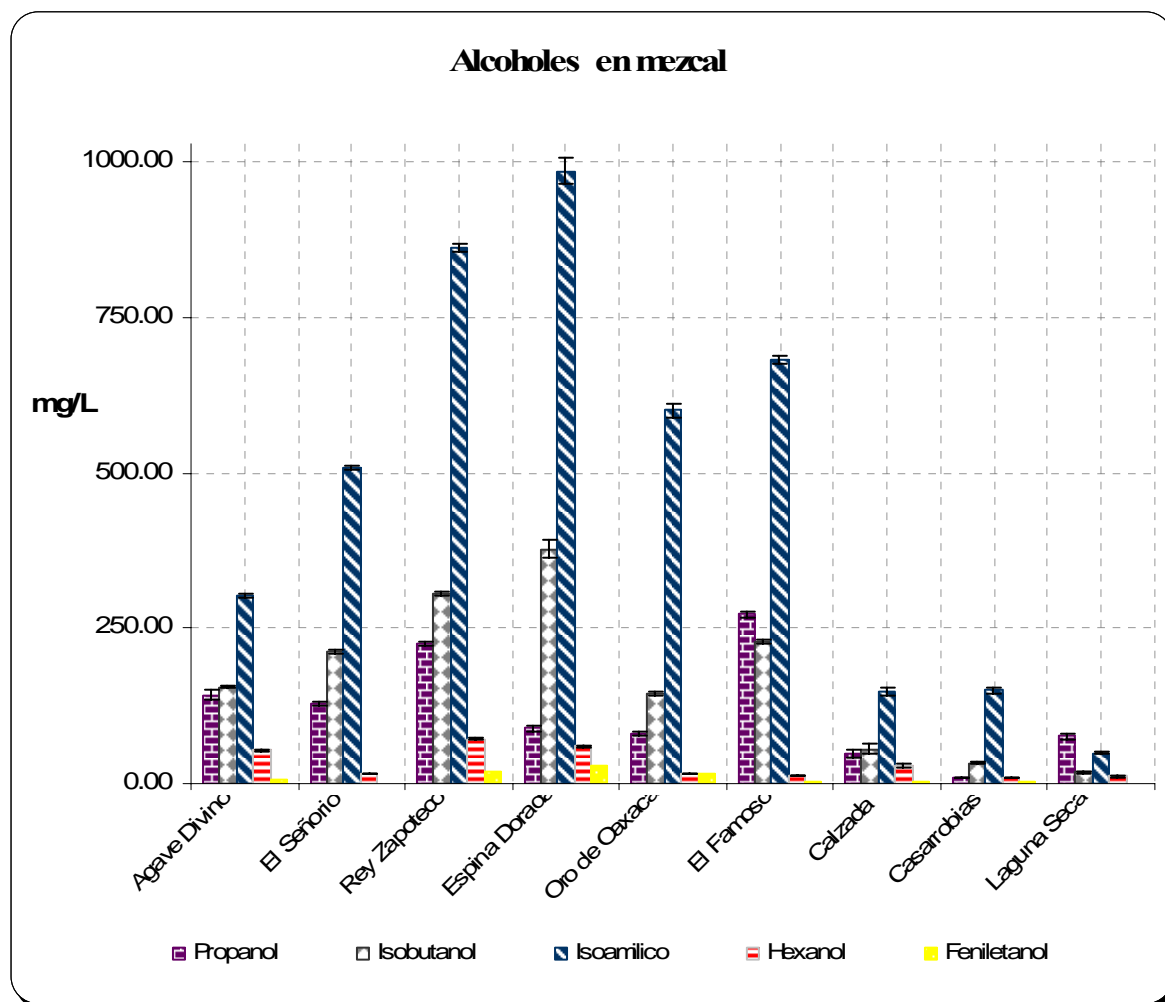
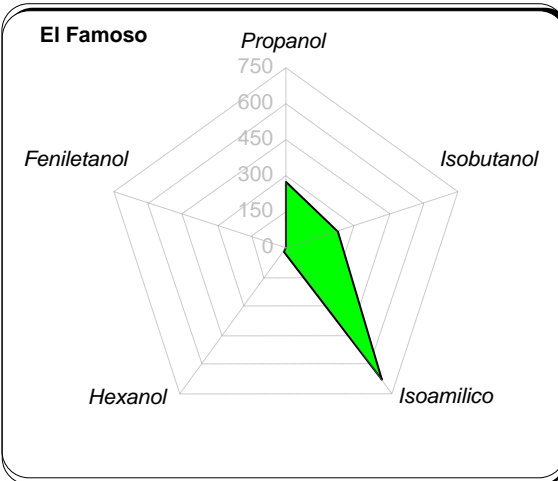
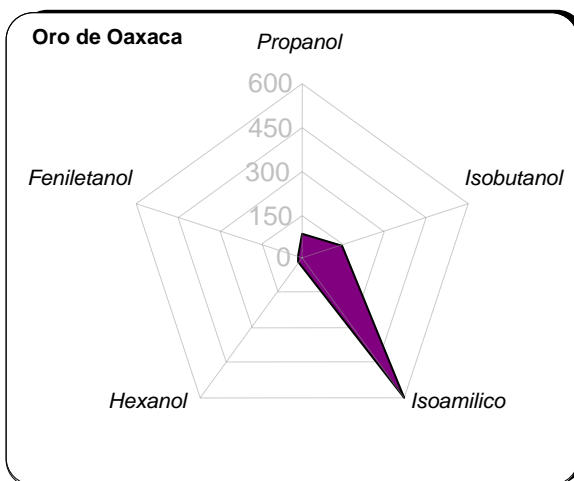
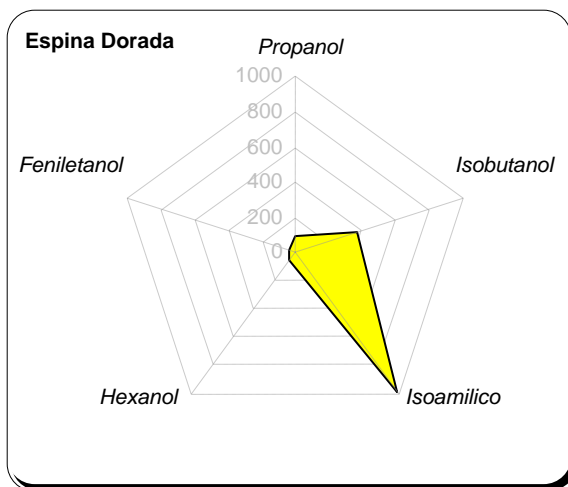
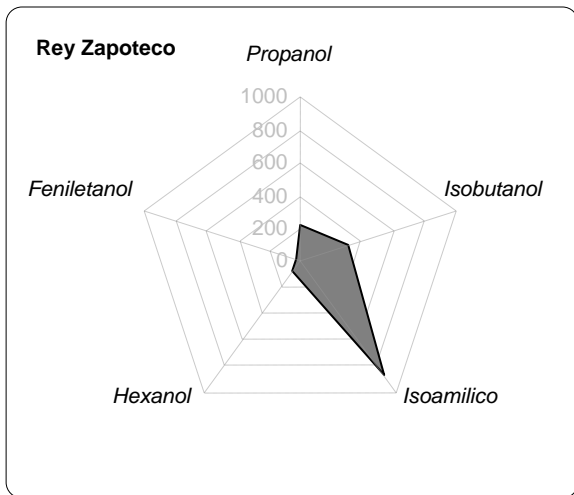
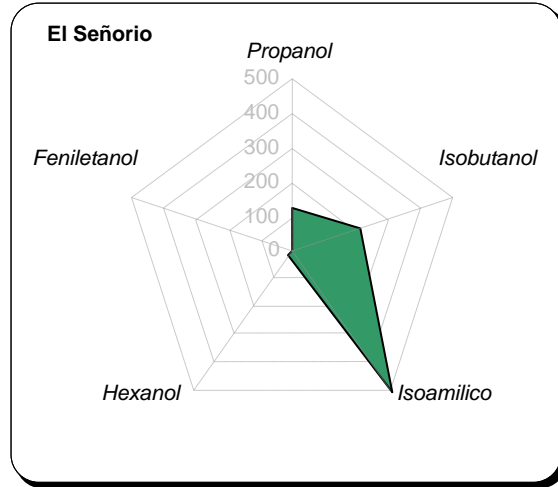
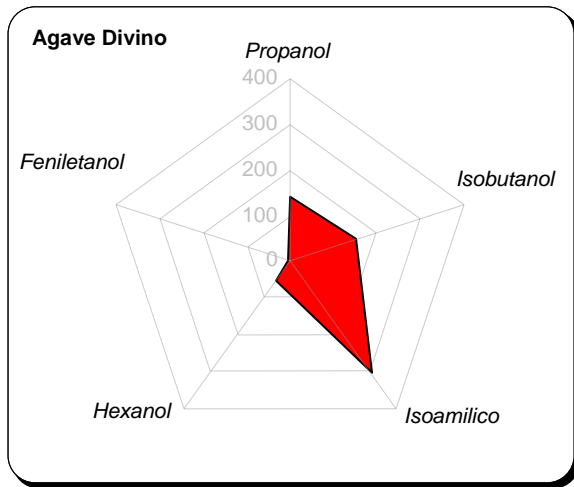


Figura 21. Alcoholes en mezcal

En los resultados (Tabla 19, Figura 21) podemos observar que el alcohol isoamílico es el alcohol más abundante en todos los mezcals con excepción del mezcal “Laguna Seca”, este alcohol se encuentra presente en concentraciones de 60 – 1000 mg/L. Algo de notar es la concentración tan baja de los alcoholes en el mezcal “Laguna Seca”, recordando que este mezcal presentó la mayor concentración de terpenos, tal vez estas diferencias en cuanto a concentración de los compuestos puede otorgarle propiedades sensoriales a este mezcal muy distintas de los otros.



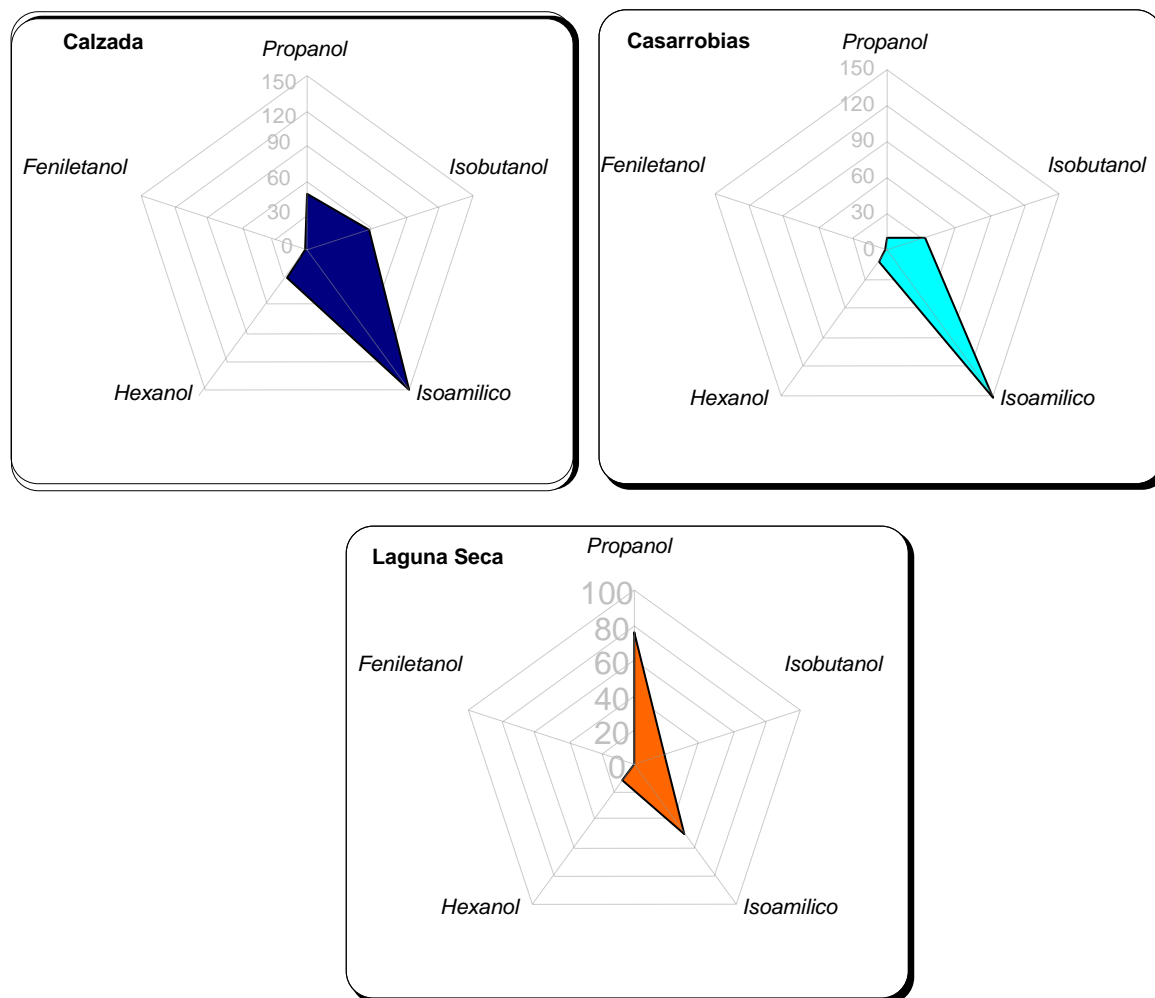


Figura 22. Perfiles de alcoholes

Si observamos los perfiles de alcoholes fusel (Figura 22) podemos notar que existen al menos 4 grupos de mezcales los cuales presentan un perfil de alcoholes fusel muy similar. El primero esta formado por los mezcales “El Señorío”, “Oro de Oaxaca”, “El Famoso” y “El Rey Zapoteco”. Otro grupo con un perfil similar el es formado por “Calzada” y “Agave Divino”, el tercer grupo formado por “Casarrobias” y “Espina Dorada” y por último el mezcal “Laguna Seca” el cuál tiene un perfil muy distinto los demás. Esto es interesante ya que el mezcal “Laguna Seca” presenta propiedades de aroma y sabor muy diferentes al resto y esto puede relacionarse con el perfil tanto de alcoholes fusel como de ésteres etílicos de ácidos grasos así como la diferencia en concentración de terpenos que presenta con respecto al resto de los mezcales.

Con lo anterior y observando que entre los mezcales de la misma región y elaborados con el mismo tipo de Agave no hay una gran similitud, podemos decir que la región de origen y el tipo de Agave utilizado para la fabricación de los mezcales no es un factor determinante en el perfil de los alcoholes fusel, por lo que las diferencias y similitudes presentes entre las muestras son probablemente debidas al tipo de cepa utilizada, así como a las condiciones de destilación.

Otro alcohol muy importante es el metanol el cuál es particularmente de interés al estar regulado por la Norma Oficial Mexicana referida al mezcal, este alcohol se encuentra presente en todas las muestras de mezcal analizadas por arriba de 100 mg/L llegando a estar hasta en concentraciones cercanas a 500 mg/L equivalente a 191 mg/L de etanol anhidro ("El Señorío").

La Norma Oficial Mexicana NOM-070-SCFI-1994 establece límites de concentración para alcoholes fusel y metanol para considerar un mezcal como auténtico. En la Tabla 22 se presentan estos límites y se pueden comparar con los resultados obtenidos.

Tabla 20. Límites permisibles y concentración (mg/100 mL de etanol anhidro) de alcoholes superiores en mezcal

<i>Mezcal</i>	<i>%EtOH v/v</i>	<i>Alcoholes Fusel</i>	<i>Metanol</i>
Agave Divino	47.3	140.07	69.14
El Señorío	44.9	191.42	107.96
Rey Zapoteco	46.6	317.76	90.04
Espina Dorada	56.8	263.05	58.28
Oro de Oaxaca	46.2	185.93	66.36
El Famoso	56.9	210.33	63.09
Laguna Seca	47.1	27.29	14.57
Casarrobias	46.4	36.27	12.02
Calzada	48.9	49.68	24.92
NOM-070-SCFI-1994	35-55	100-400	100-300

Como podemos notar, algunos de los mezcales analizados no cumplen la norma, los mezcales "Laguna Seca", "Casarrobias" y "Calzada" presentan un contenido de alcoholes fusel por debajo de los 100 mg/100 mL de EtOH que se establecen como mínimo, por otro lado el resto cumple sin rebasar el límite máximo permitido. En cuanto a contenido de metanol, solo el mezcal "El Señorío" cumple con la norma que exige un mínimo de 100 mg/100 mL de EtOH.

Basándose en lo anterior, podríamos decir que solo el mezcal “El Señorío” y quizás el “Rey Zapoteco”, estando en el límite, cumplen con la norma y pueden ser considerados como auténticos.

El acetato de etilo a pesar de no ser un alcohol, se puede determinar simultáneamente mediante este procedimiento (Tabla 21), tiene una presencia importante en algunos mezcales llegando a ser máxima en el “Rey Zapoteco” donde llega casi a 1000 mg/L o muy pequeña como en “Laguna Seca” donde no fue posible cuantificarlo. Este compuesto es un subproducto importante de la fermentación de los mostos para la producción de bebidas alcohólicas destiladas, por lo que es común encontrarlo en todas estas bebidas e imparte propiedades sensoriales específicas relacionadas con aromas y sabores frutales.

Tabla 21. Concentración (mg/L) de acetato de etilo en mezcal n = 3

<i>Mezcal</i>	<i>Concentración</i>	<i>Mezcal</i>	<i>Concentración</i>
Agave Divino	458.1 ± 16.90	Oro de Oaxaca	91.3 ± 3.7
El Señorío	84.1 ± 3.3	Laguna Seca	NQ
Rey Zapoteco	974.0 ± 39.8	Casarrobias	51.4 ± 0.6
Espina Dorada	312.2 ± 7.3	Calzada	51.4 ± 7.8
El Famoso	258.0 ± 17.9		

NQ = No Cuantificado

7. Conclusiones

- Se aplicó una metodología basada en ExLL y MEFS para la determinación de terpenos en 9 muestras de mezcal, identificando 19 terpenos y cuantificando 8, así como 7 ésteres etílicos de ácidos grasos los cuáles fueron cuantificados en un amplio intervalo de concentración. La reproducibilidad del método es aceptable encontrándose por debajo del 10%.
- El análisis de las 9 muestras de mezcal en estudio permitió identificar un número importante de compuestos (entre 120 y 204) entre los cuáles tenemos: ésteres etílicos de ácidos grasos, aldehídos, cetonas, ácidos carboxílicos, furanos, hidrocarburos simples, terpenos, alcoholes, hidrocarburos aromáticos policíclicos y compuestos heterocíclicos.
- No es posible establecer con certeza el motivo por el cuál los resultados obtenidos para la cuantificación de terpenos por ELL y MEFS son distintos, probablemente se debe a problemas de interferencias como pueden ser coeluciones, por lo que sería conveniente utilizar alguna técnica auxiliar como cromatografía bidimensional o modificar las condiciones cromatográficas así como la columna utilizada.
- La MEFS presenta ventajas importantes con respecto a la ExLL como son: ausencia de disolventes orgánicos, no genera residuos, requiere menor cantidad de muestra, entre otras, sin embargo requiere del estricto control de muchos factores para producir resultados confiables.
- La MEFS en las condiciones utilizadas resultó ser una buena opción para la determinación de ésteres etílicos, sin embargo presento problemas en la determinación de terpenos al no extraerlos suficientemente, por lo que es necesario una mejor optimización de las condiciones experimentales.

- Se desarrollo una metodología de CG que permitió la determinación de alcoholes en mezcal. Se identificaron y cuantificaron 5 alcoholes superiores o “fusel oil”, metanol y además el acetato de etilo. El procedimiento presentó una variabilidad aceptable que se encuentra por debajo del 10%.
- De las 9 muestras analizadas solo “El Señorío” cumple con todos los parámetros que establece la Norma Oficial Mexicana NOM-070-SCFI-1994 para ser considerado como “mezcal”.

Existe una gran variabilidad entre las muestras de mezcal analizadas en cuanto a perfil y concentración de todos los compuestos determinados, pero al parecer la región de origen y el tipo de Agave utilizado para la fabricación de los mezcales no es un factor determinante en el perfil de los alcoholes fusel, por lo que las diferencias y similitudes presentes entre las muestras son probablemente debidas al tipo de cepa de *Sacharomyces cerevisiae* utilizada, así como a las condiciones de destilación.

- Se cumplió con la totalidad de los objetivos planteados en este trabajo identificando y cuantificando los principales compuestos orgánicos presentes en el mezcal mediante diversas metodologías.

8. Anexos

8.1 Resultados completos

8.1.1 Determinación de terpenos por ExLL (ng/mL)

N = 3

Terpeno	1°	2°	3°	Promedio	Desviación	CV (%)
<i>Mezcal Agave Divino</i>						
Linalol	104.20	94.64	105.08	101.30	5.79	5.71
4-Terpineol	ND	ND	ND	ND	ND	ND
α -Terpineol	340.40	313.99	332.61	329.00	13.57	4.12
B-Citronelol	81.66	75.48	81.01	79.38	3.39	4.28
Eugenol	128.64	111.93	122.05	120.87	8.42	6.97
Nerolidol	129.23	115.97	125.37	123.53	6.82	5.52
Farnesol	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Mezcal El Señorío</i>						
Linalol	164.17	171.52	171.75	169.15	4.31	2.55
4-Terpineol	ND	ND	ND	ND	ND	ND
α -Terpineol	368.74	369.02	370.37	369.37	0.87	0.24
B-Citronelol	127.41	139.54	139.24	135.40	6.92	5.11
Eugenol	191.04	211.91	205.14	202.69	10.65	5.25
Nerolidol	186.92	198.79	197.57	194.43	6.53	3.36
Farnesol	210.16	238.95	227.49	225.53	14.50	6.43
<i>Mezcal El Rey Zapoteco</i>						
Linalol	227.76	252.25	244.14	241.38	12.47	5.17
4-Terpineol	ND	ND	ND	ND	ND	ND
α -Terpineol	474.65	504.29	490.72	489.89	14.84	3.03
B-Citronelol	110.32	113.28	118.39	114.00	4.08	3.58
Eugenol	82.52	86.31	88.82	85.88	3.17	3.69
Nerolidol	141.05	148.22	150.14	146.47	4.79	3.27
Farnesol	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Mezcal Espina Dorada</i>						
Linalol	71.30	72.61	76.39	73.44	2.64	3.60
4-Terpineol	ND	ND	ND	ND	ND	ND
α -Terpineol	135.62	139.79	140.08	138.50	2.49	1.80
B-Citronelol	89.73	86.12	94.40	90.08	4.15	4.61
Eugenol	140.12	143.91	145.57	143.20	2.80	1.95
Nerolidol	127.73	124.88	131.68	128.10	3.42	2.67
Farnesol	225.04	222.89	230.43	226.12	3.88	1.72

ND = No Detectado

NQ = No Cuantificado

Terpeno	1°	2°	3°	Promedio	Desviación	CV (%)
<i>Mezcal Oro de Oaxaca</i>						
<i>Linalol</i>	81.24	83.01	85.23	83.16	2.00	2.41
<i>4-Terpineol</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>α-Terpineol</i>	152.74	144.33	151.77	149.61	4.60	3.08
<i>B-Citronelol</i>	79.01	80.64	77.87	79.17	1.40	1.76
<i>Eugenol</i>	88.99	81.60	88.09	86.23	4.03	4.68
<i>Nerolidol</i>	131.51	131.99	135.37	132.96	2.10	1.58
<i>Farnesol</i>	195.72	196.32	200.54	197.53	2.62	1.33
<i>Mezcal El Famoso</i>						
<i>Linalol</i>	232.99	253.15	235.60	240.58	10.96	4.56
<i>4-Terpineol</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>α-Terpineol</i>	412.11	466.67	441.09	439.96	27.30	6.21
<i>B-Citronelol</i>	174.39	193.61	192.01	186.67	10.67	5.71
<i>Eugenol</i>	105.61	111.01	106.95	107.86	2.81	2.61
<i>Nerolidol</i>	144.10	153.95	150.92	149.66	5.05	3.37
<i>Farnesol</i>	286.54	318.00	318.22	307.59	18.23	5.93
<i>Mezcal Laguna Seca</i>						
<i>Linalol</i>	705.95	760.49	714.60	727.01	29.31	4.03
<i>4-Terpineol</i>	100.59	119.08	114.73	111.47	9.67	0.00
<i>α-Terpineol</i>	1432.48	1484.83	1384.73	1434.01	50.07	3.49
<i>B-Citronelol</i>	268.98	286.96	276.50	277.48	9.03	3.25
<i>Eugenol</i>	186.77	209.97	205.14	200.63	12.24	6.10
<i>Nerolidol</i>	117.46	123.48	125.68	122.21	4.26	3.48
<i>Farnesol</i>	215.51	225.09	232.26	224.28	8.40	3.75
<i>Mezcal Casarrobias</i>						
<i>Linalol</i>	886.64	871.95	929.37	895.99	29.83	3.33
<i>4-Terpineol</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>α-Terpineol</i>	1345.76	1383.52	1404.17	1377.81	29.62	2.15
<i>B-Citronelol</i>	510.67	529.68	557.29	532.55	23.44	4.40
<i>Eugenol</i>	87.37	91.11	92.01	90.16	2.46	2.73
<i>Nerolidol</i>	172.06	181.25	190.68	181.33	9.31	5.13
<i>Farnesol</i>	180.99	188.50	190.59	186.69	5.05	2.70
<i>Mezcal Calzada</i>						
<i>Linalol</i>	258.73	267.60	263.92	263.42	4.46	1.69
<i>4-Terpineol</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>α-Terpineol</i>	582.78	605.49	594.86	594.38	11.36	1.91
<i>B-Citronelol</i>	165.01	178.01	167.08	170.03	6.98	4.11
<i>Eugenol</i>	166.27	160.95	157.90	161.71	4.24	2.62
<i>Nerolidol</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Farnesol</i>	211.23	207.38	220.01	212.87	6.48	3.04

ND = No Detectado

NQ = No Cuantificado

8.1.2 Determinación de terpenos por MEFS (ng/mL)

N = 3

Terpeno	1°	2°	3°	Promedio	Desviación	CV (%)
<i>Mezcal Agave Divino</i>						
<i>Linalol</i>	113.47	100.00	108.23	107.24	6.79	6.33
<i>4-Terpineol</i>	39.03	41.06	35.37	38.49	2.88	7.49
<i>α-Terpineol</i>	577.78	588.60	552.28	572.89	18.65	3.26
<i>B-Citronelol</i>	66.32	63.55	67.16	65.68	1.89	2.88
<i>Geraniol</i>	34.27	38.29	34.40	35.65	2.28	6.41
<i>Eugenol</i>	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
<i>Nerolidol</i>	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
<i>Farnesol</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Mezcal El Señorío</i>						
<i>Linalol</i>	238.21	246.58	244.57	243.12	4.37	1.80
<i>4-Terpineol</i>	73.88	69.08	65.14	69.37	4.37	6.31
<i>α-Terpineol</i>	877.98	804.44	802.36	828.26	43.08	5.20
<i>B-Citronelol</i>	105.98	108.12	105.11	106.40	1.55	1.46
<i>Geraniol</i>	71.36	63.90	65.84	67.03	3.87	5.77
<i>Eugenol</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Nerolidol</i>	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
<i>Farnesol</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Mezcal El Rey Zapoteco</i>						
<i>Linalol</i>	156.59	161.39	163.12	160.37	3.38	2.11
<i>4-Terpineol</i>	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
<i>α-Terpineol</i>	527.65	588.27	546.83	554.25	30.98	5.59
<i>B-Citronelol</i>	94.96	109.82	102.94	102.57	7.44	7.25
<i>Geraniol</i>	54.01	44.00	52.24	50.08	5.34	10.67
<i>Eugenol</i>	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
<i>Nerolidol</i>	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
<i>Farnesol</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Mezcal Espina Dorada</i>						
<i>Linalol</i>	67.15	66.84	66.84	66.94	0.18	0.27
<i>4-Terpineol</i>	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
<i>α-Terpineol</i>	116.07	146.24	149.53	137.28	18.44	13.43
<i>B-Citronelol</i>	68.58	76.07	75.84	73.50	4.26	5.79
<i>Geraniol</i>	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
<i>Eugenol</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Nerolidol</i>	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
<i>Farnesol</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND = No Detectado

NQ = No Cuantificado

Terpeno	1°	2°	3°	Promedio	Desviación	CV (%)
<i>Mezcal Oro de Oaxaca</i>						
<i>Linalol</i>	79.76	82.33	73.36	78.48	4.62	5.89
<i>4-Terpineol</i>	NQ	NQ	NQ	NQ	<i>NQ</i>	<i>NQ</i>
<i>α-Terpineol</i>	239.75	237.19	220.63	232.52	10.38	4.46
<i>B-Citronelol</i>	60.17	68.91	62.12	63.73	4.59	7.20
<i>Geraniol</i>	NQ	NQ	NQ	NQ	<i>NQ</i>	<i>NQ</i>
<i>Eugenol</i>	NQ	NQ	NQ	NQ	<i>NQ</i>	<i>NQ</i>
<i>Farnesol</i>	ND	ND	ND	ND	<i>ND</i>	<i>ND</i>
<i>Mezcal El Famoso</i>						
<i>Linalol</i>	249.46	242.69	247.49	246.55	3.48	1.41
<i>4-Terpineol</i>	ND	ND	ND	ND	<i>ND</i>	<i>ND</i>
<i>α-Terpineol</i>	772.64	674.80	654.17	700.53	63.29	9.03
<i>B-Citronelol</i>	163.06	168.48	167.36	166.30	2.86	1.72
<i>Geraniol</i>	77.87	86.89	86.47	83.74	5.09	6.08
<i>Eugenol</i>	NQ	NQ	NQ	NQ	<i>NQ</i>	<i>NQ</i>
<i>Nerolidol</i>	NQ	NQ	NQ	NQ	<i>NQ</i>	<i>NQ</i>
<i>Farnesol</i>	ND	ND	ND	ND	<i>ND</i>	<i>ND</i>
<i>Mezcal Laguna Seca</i>						
<i>Linalol</i>	798.11	802.83	784.49	795.14	9.53	1.20
<i>4-Terpineol</i>	124.93	138.58	117.98	127.16	10.48	8.24
<i>α-Terpineol</i>	2182.03	2363.49	2263.06	2269.53	90.90	4.01
<i>B-Citronelol</i>	269.41	251.07	285.82	268.77	17.38	6.47
<i>Geraniol</i>	526.56	448.19	526.85	500.53	45.33	9.06
<i>Eugenol</i>	374.45	392.07	378.45	381.66	9.24	2.42
<i>Nerolidol</i>	NQ	NQ	NQ	NQ	<i>NQ</i>	<i>NQ</i>
<i>Farnesol</i>	217.96	199.49	162.44	193.30	28.28	14.63
<i>Mezcal Casarrobias</i>						
<i>Linalol</i>	217.23	247.56	231.65	232.15	15.17	6.54
<i>4-Terpineol</i>	NQ	NQ	NQ	NQ	<i>NQ</i>	<i>NQ</i>
<i>α-Terpineol</i>	665.47	751.14	706.20	707.60	42.85	6.06
<i>B-Citronelol</i>	NQ	NQ	NQ	NQ	<i>NQ</i>	<i>NQ</i>
<i>Eugenol</i>	NQ	NQ	NQ	NQ	<i>NQ</i>	<i>NQ</i>
<i>Nerolidol</i>	NQ	NQ	NQ	NQ	<i>NQ</i>	<i>NQ</i>
<i>Farnesol</i>	ND	ND	ND	ND	<i>ND</i>	<i>ND</i>
<i>Mezcal Calzada</i>						
<i>Linalol</i>	800.93	806.07	829.75	812.25	15.37	1.89
<i>4-Terpineol</i>	NQ	NQ	NQ	NQ	<i>NQ</i>	<i>NQ</i>
<i>α-Terpineol</i>	1467.11	1453.53	1538.85	1486.50	45.85	3.08
<i>B-Citronelol</i>	436.33	436.41	443.61	438.78	4.18	0.95
<i>Geraniol</i>	177.38	192.95	181.65	183.99	8.04	4.37
<i>Nerolidol</i>	ND	ND	ND	ND	<i>ND</i>	<i>ND</i>
<i>Farnesol</i>	ND	ND	ND	ND	<i>ND</i>	<i>ND</i>

ND = No Detectado

NQ = No Cuantificado

8.1.3 Determinación de ésteres etílicos de ácidos grasos por MEFS (ng/mL)

N = 3

Compuesto	1°	2°	3°	Promedio	Desviación	CV (%)
<i>Mezcal Agave Divino</i>						
EE 6	262.63	250.36	242.73	251.91	10.04	3.98
EE 7	33.06	31.54	30.36	31.65	1.35	4.28
EE 8	1042.27	923.42	862.36	942.68	91.49	9.70
EE9	66.20	68.61	70.60	68.52	2.23	3.20
EE 10	888.30	785.59	765.23	813.04	65.97	8.11
EE 12	68.02	81.20	73.05	74.09	6.65	8.97
EE 14	22.12	24.51	18.37	21.67	3.09	14.28
<i>Mezcal El Señorío</i>						
EE 6	92.43	111.33	100.82	101.53	9.47	9.33
EE 7	34.58	39.86	37.22	37.22	2.64	7.09
EE 8	692.48	852.14	791.89	778.84	80.63	10.35
EE9	71.61	77.10	82.63	77.14	5.49	7.10
EE 10	615.81	739.68	725.49	693.66	67.79	9.77
EE 12	100.75	106.44	120.16	109.12	9.97	9.14
EE 14	32.05	35.29	39.49	35.61	3.73	10.48
<i>Mezcal El Rey Zapoteco</i>						
EE 6	1009.01	1085.25	1137.99	1077.42	64.84	6.02
EE 7	113.71	110.44	102.96	109.04	5.51	5.06
EE 8	5176.46	5045.95	4746.22	4989.55	220.60	4.42
EE9	115.37	121.5	128.14	121.73	6.36	5.22
EE 10	4699.57	4614.30	4418.69	4577.52	144.01	3.15
EE 12	2105.49	1942.79	2100.48	2049.59	92.52	4.51
EE 14	23.41	24.59	22.32	23.44	1.14	4.84
<i>Mezcal Espina Dorada</i>						
EE 6	618.14	584.56	651.73	618.14	33.58	5.43
EE 7	86.41	84.53	88.30	86.41	1.88	2.18
EE 8	3290.65	3832.95	2748.34	3290.65	542.31	16.48
EE9	118.24	119.50	120.74	119.48	1.24	1.03
EE 10	3785.13	3889.50	3680.76	3785.13	104.37	2.76
EE 12	1595.39	1787.46	1403.32	1595.39	192.07	12.04
<i>Mezcal Oro de Oaxaca</i>						
EE 6	430.93	443.05	451.97	441.98	10.56	2.39
EE 7	27.62	29.32	29.00	28.65	0.90	3.15
EE 8	1831.54	2028.97	2100.85	1987.12	139.45	7.02
EE9	69.45	70.01	70.86	70.3	0.85	1.20
EE 10	1982.95	2111.49	2269.79	2121.41	143.68	6.77
EE 12	810.95	814.31	1010.26	878.50	114.11	12.99
EE 14	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND = No Detectado

NQ = No Cuantificado

<i>Compuesto</i>	<i>1°</i>	<i>2°</i>	<i>3°</i>	<i>Promedio</i>	<i>Desviación</i>	<i>CV (%)</i>
<i>Mezcal El Famoso</i>						
EE 6	575.55	577.87	561.48	571.63	8.87	1.55
EE 7	48.99	46.70	50.22	48.64	1.79	3.68
EE 8	2688.09	2485.89	2506.82	2560.27	111.19	4.34
EE9	74.26	77.20	79.49	77.14	2.95	3.82
EE 10	2532.07	2573.43	2588.16	2564.55	29.08	1.13
EE 12	861.45	916.39	971.90	916.58	55.22	6.02
EE 14	575.55	577.87	561.48	571.63	8.87	1.55
<i>Mezcal Laguna Seca</i>						
EE 6	1417.75	1536.39	1518.96	1491.03	64.06	4.30
EE 7	119.38	134.89	137.43	130.57	9.77	7.48
EE 8	771.56	870.28	891.12	844.32	63.87	7.56
EE9	66.08	67.50	69.03	67.57	1.49	2.20
EE 10	1066.14	1081.44	1141.23	1096.27	39.68	3.62
EE 12	176.74	134.41	152.82	154.66	21.23	13.73
EE 14	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Mezcal Casarrobias</i>						
EE 6	1248.64	1644.56	1402.34	1431.85	199.60	13.94
EE 7	127.25	151.36	136.61	138.41	12.15	8.78
EE 8	8822.08	10212.16	9361.72	9465.32	700.81	7.40
EE9	147.47	186.41	225.35	186.41	38.94	20.2
EE 10	8116.28	9201.11	8537.41	8618.27	546.92	6.35
EE 12	206.71	245.23	221.66	224.54	19.42	8.65
EE 14	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Mezcal Calzada</i>						
EE 6	1112.25	954.63	1143.61	1070.16	101.27	9.46
EE 7	92.66	83.64	101.65	92.65	9.00	9.72
EE 8	7028.49	5693.60	6921.58	6547.89	741.76	11.33
EE9	152.65	166.00	179.67	166.16	13.51	8.13
EE 10	6310.22	5736.19	6901.39	6315.94	582.62	9.22
EE 12	2290.95	2527.05	2432.51	2416.84	118.83	4.92
EE 14	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND = No Detectado

NQ = No Cuantificado

8.1.4 Determinación de alcoholes ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

N = 3

Compuesto	1°	2°	3°	Promedio	Desviación	CV (%)
<i>Mezcal Agave Divino</i>						
<i>Metanol</i>	342.86	326.40	312.10	327.12	15.39	4.70
<i>Propanol</i>	138.71	152.31	136.18	142.40	8.67	6.09
<i>Isobutanol</i>	156.58	152.67	157.63	155.63	2.62	1.68
<i>Alcohol isoamílico</i>	306.96	299.85	301.66	302.82	3.69	1.22
<i>Hexanol</i>	53.69	56.08	52.24	54.00	1.94	3.60
<i>Feniletanol</i>	5.62	5.03	5.33	5.33	0.29	5.50
<i>Mezcal El Señorío</i>						
<i>Metanol</i>	475.03	502.89	477.30	485.07	15.47	3.19
<i>Propanol</i>	125.57	130.97	125.92	127.49	3.02	2.37
<i>Isobutanol</i>	209.50	216.78	210.19	212.16	4.02	1.89
<i>Alcohol isoamílico</i>	506.01	513.18	505.74	508.31	4.22	0.83
<i>Hexanol</i>	14.90	15.98	15.22	15.37	0.56	3.62
<i>Feniletanol</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Mezcal Rey Zapoteco</i>						
<i>Metanol</i>	439.21	398.26	423.47	420.31	20.65	4.91
<i>Propanol</i>	228.72	221.11	224.06	224.63	3.84	1.71
<i>Isobutanol</i>	310.38	302.38	304.40	305.72	4.16	1.36
<i>Alcohol isoamílico</i>	869.81	855.73	861.84	862.46	7.06	0.82
<i>Hexanol</i>	71.66	71.47	73.02	72.05	0.84	1.17
<i>Feniletanol</i>	18.12	18.66	18.74	18.51	0.34	1.84
<i>Mezcal Espina Dorada</i>						
<i>Metanol</i>	367.52	323.79	334.79	342.03	22.75	6.65
<i>Propanol</i>	92.08	85.32	88.17	88.52	3.39	3.83
<i>Isobutanol</i>	393.84	365.90	374.33	378.02	14.33	3.79
<i>Alcohol isoamílico</i>	1010.06	968.58	980.86	986.50	21.31	2.16
<i>Hexanol</i>	61.23	60.65	59.22	60.37	1.04	1.71
<i>Feniletanol</i>	30.70	29.43	31.00	30.37	0.83	2.74
<i>Mezcal El Famoso</i>						
<i>Metanol</i>	366.01	352.76	358.83	359.20	6.63	1.85
<i>Propanol</i>	276.91	268.00	272.08	272.33	4.46	1.64
<i>Isobutanol</i>	231.41	223.84	227.30	227.51	3.79	1.67
<i>Alcohol isoamílico</i>	688.74	675.70	681.67	682.03	6.53	0.96
<i>Hexanol</i>	13.14	13.16	13.15	13.15	0.01	0.09
<i>Feniletanol</i>	2.51	2.54	2.52	2.52	0.02	0.70

ND = No Detectado

NQ = No Cuantificado

Compuesto	1°	2°	3°	Promedio	Desviación	CV (%)
<i>Mezcal Oro de Oaxaca</i>						
<i>Metanol</i>	305.46	321.40	293.32	306.73	14.08	4.59
<i>Propanol</i>	79.66	82.42	78.88	80.32	1.86	2.32
<i>Isobutanol</i>	144.11	149.48	143.16	145.59	3.41	2.34
<i>Alcohol isoamílico</i>	596.12	613.03	592.49	600.55	10.96	1.83
<i>Hexanol</i>	17.34	16.88	17.64	17.29	0.38	2.22
<i>Feniletanol</i>	15.86	15.15	16.21	15.74	0.54	3.43
<i>Mezcal Laguna Seca</i>						
<i>Metanol</i>	78.03	86.04	84.81	82.96	4.31	5.20
<i>Propanol</i>	71.10	78.47	77.90	75.82	4.10	5.40
<i>Isobutanol</i>	17.24	18.85	18.67	18.25	0.88	4.83
<i>Alcohol isoamílico</i>	47.59	50.66	51.23	49.83	1.96	3.92
<i>Hexanol</i>	11.71	10.72	12.36	11.60	0.83	7.12
<i>Feniletanol</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Mezcal Casarrobias</i>						
<i>Metanol</i>	70.99	66.67	67.79	68.48	2.24	3.27
<i>Propanol</i>	9.72	10.85	11.85	10.81	1.06	9.85
<i>Isobutanol</i>	34.21	31.93	35.22	33.79	1.69	5.00
<i>Alcohol isoamílico</i>	153.38	138.56	160.86	150.93	11.35	7.52
<i>Hexanol</i>	11.31	10.63	11.22	11.05	0.37	3.31
<i>Feniletanol</i>	2.30	2.29	2.41	2.33	0.07	2.80
<i>Mezcal Calzada</i>						
<i>Metanol</i>	145.93	151.33	128.45	141.90	11.96	8.43
<i>Propanol</i>	49.89	50.88	44.11	48.29	3.65	7.56
<i>Isobutanol</i>	58.10	58.88	51.38	56.12	4.12	7.34
<i>Alcohol isoamílico</i>	154.25	153.17	136.53	147.98	9.94	6.71
<i>Hexanol</i>	29.28	29.86	27.69	28.94	1.13	3.89
<i>Feniletanol</i>	1.61	1.65	1.64	1.63	0.02	1.05

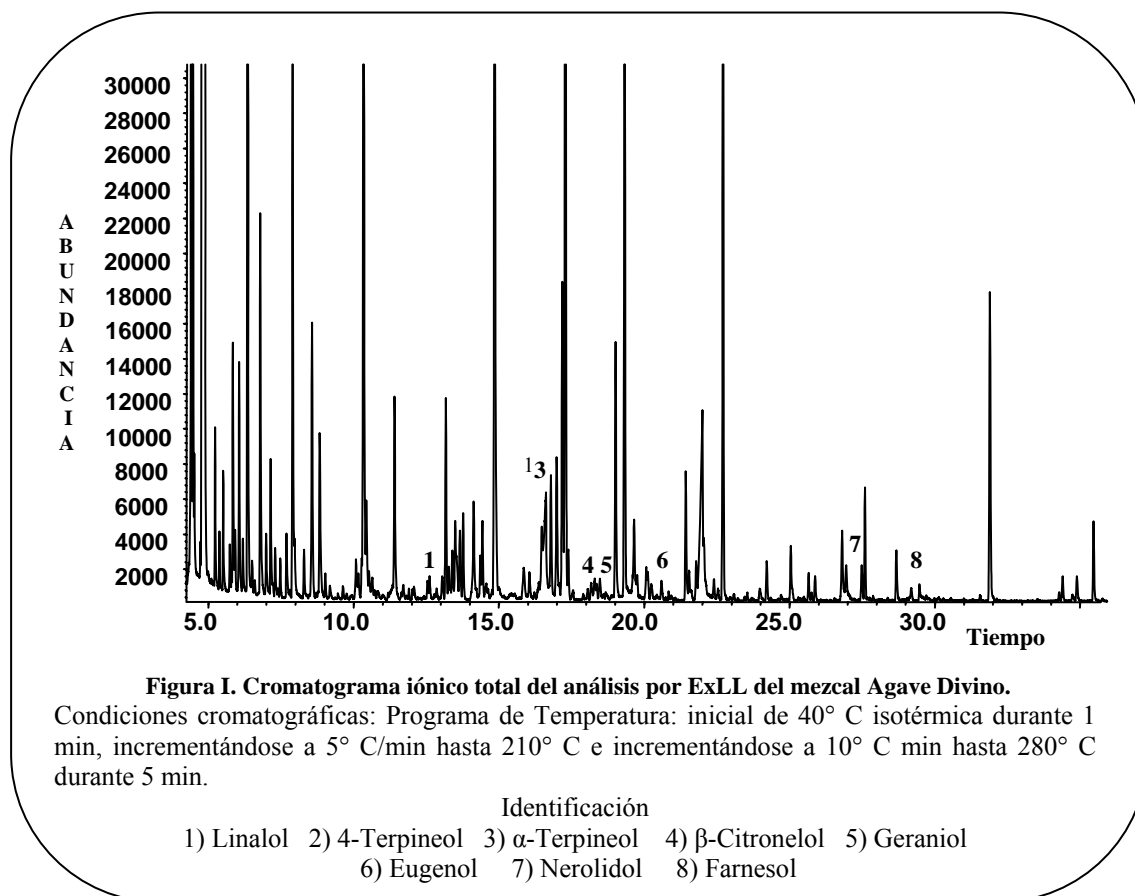
ND = No Detectado

NQ = No Cuantificado

8.1.5 Determinación de acetato de etilo ($\mu\text{g/mL}$) $n=3$

Mezcal	Concentración	Mezcal	Concentración
Agave Divino	458.1 \pm 16.90	Oro de Oaxaca	91.3 \pm 3.7
El Señorío	84.1 \pm 3.3	Laguna Seca	NQ
Rey Zapoteco	974.0 \pm 39.8	Casarrobias	51.4 \pm 0.6
Espina Dorada	312.2 \pm 7.3	Calzada	51.4 \pm 7.8
El Famoso	258.0 \pm 17.9		

8.6 Cromatogramas



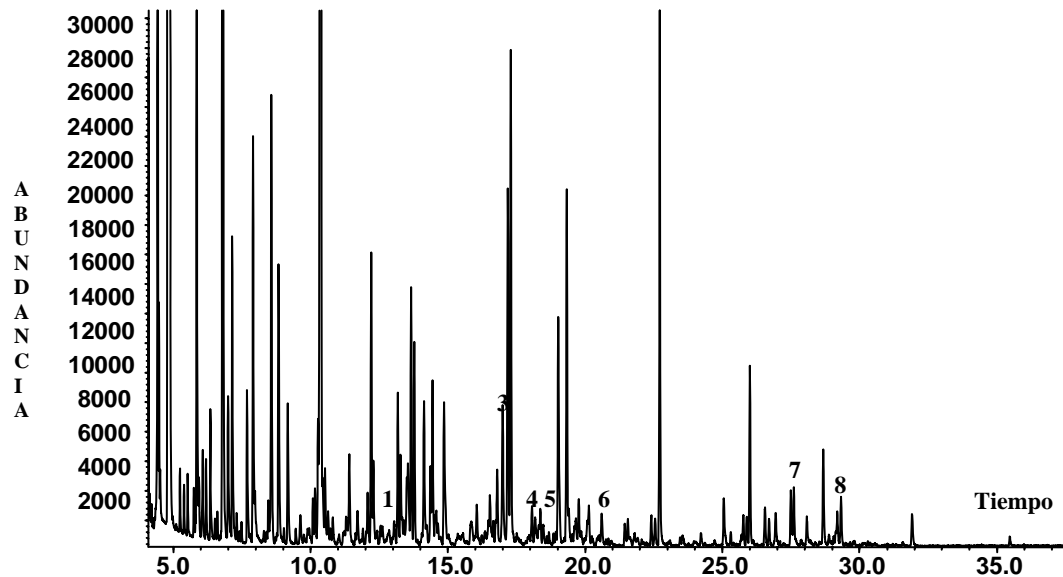


Figura II. Cromatograma iónico total del análisis por ExLL del mezcal El Senorio
Condiciones cromatográficas e identificación se indican en la Figura I

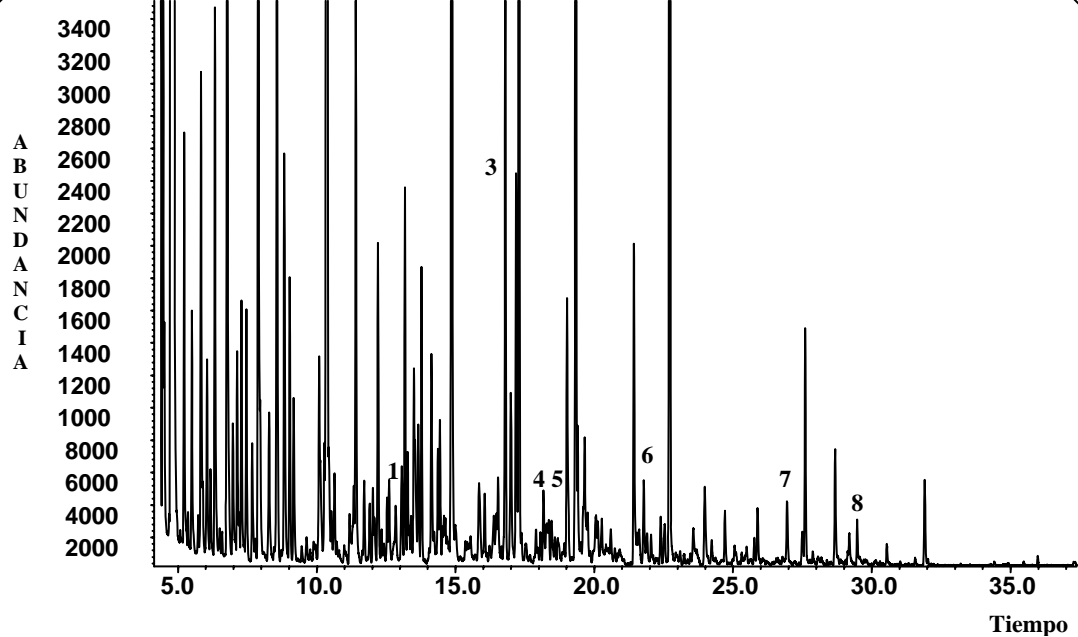
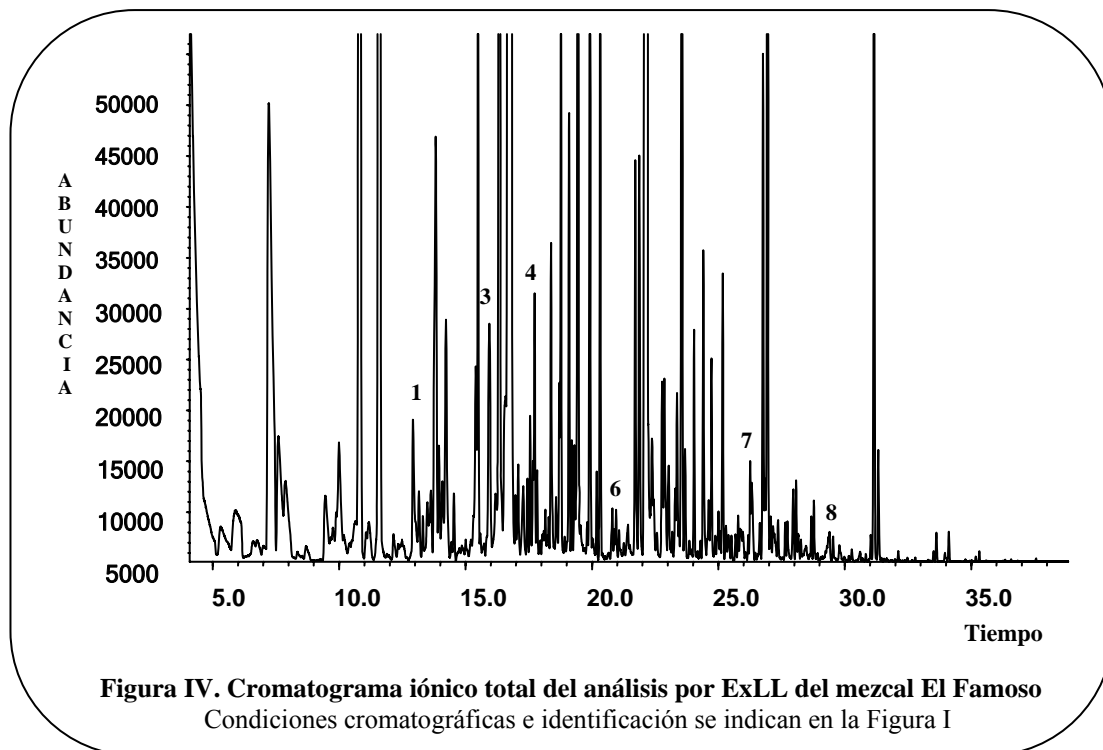
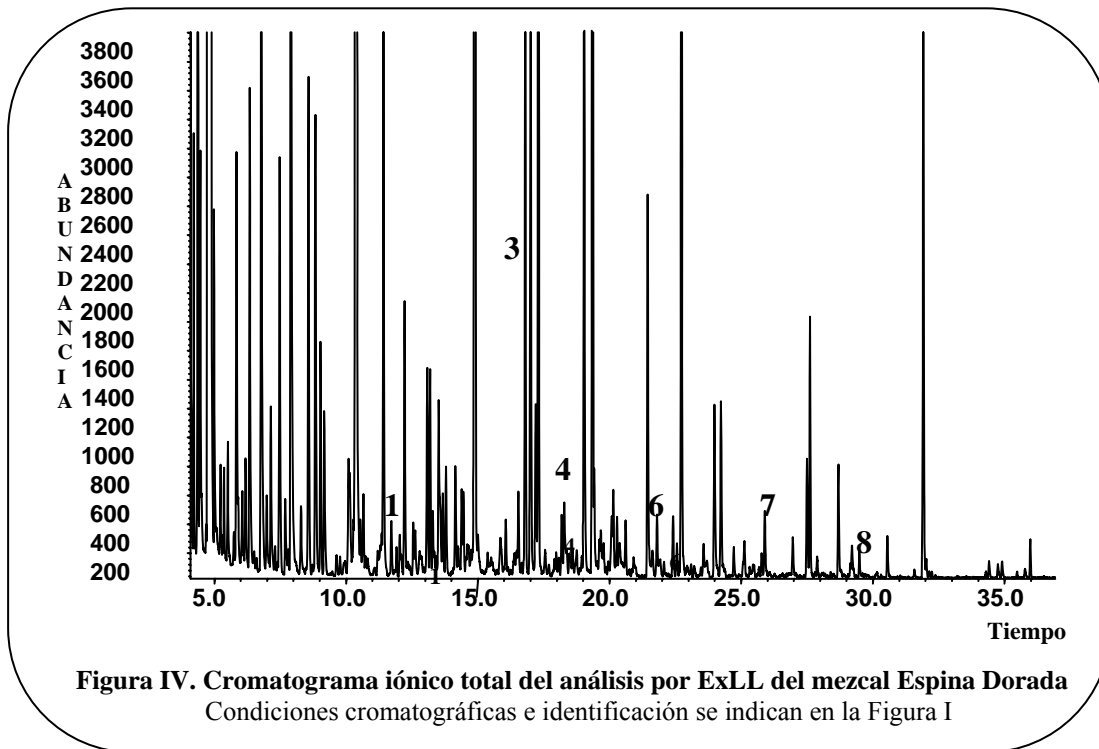
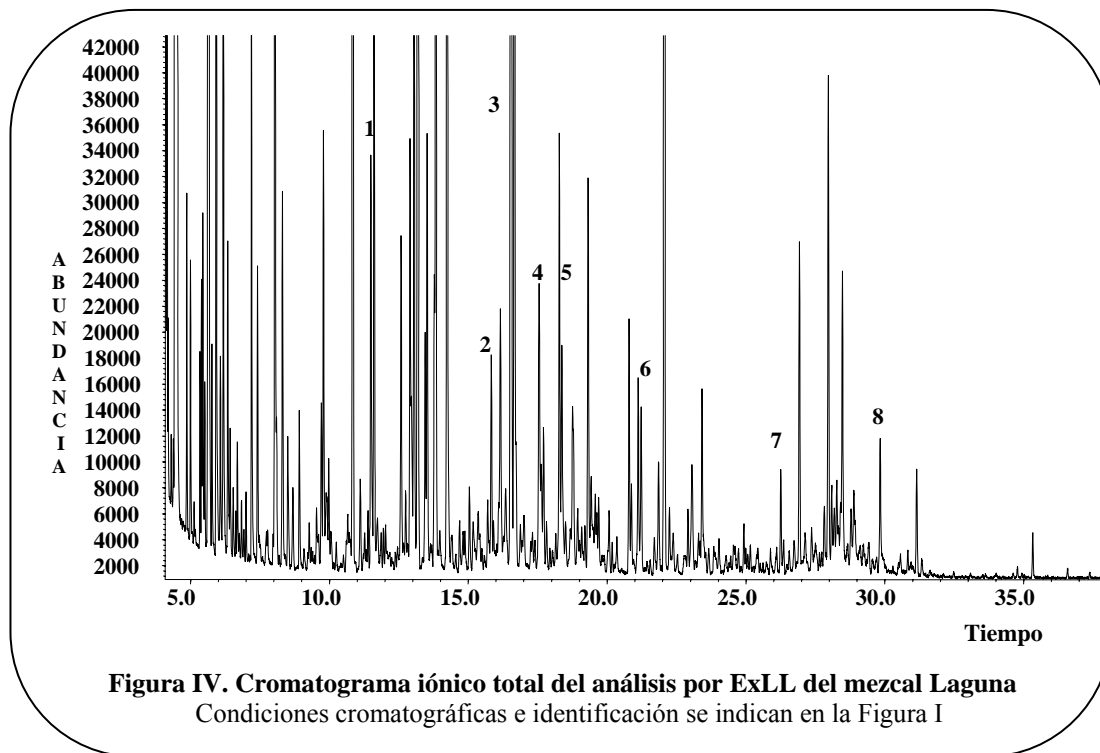
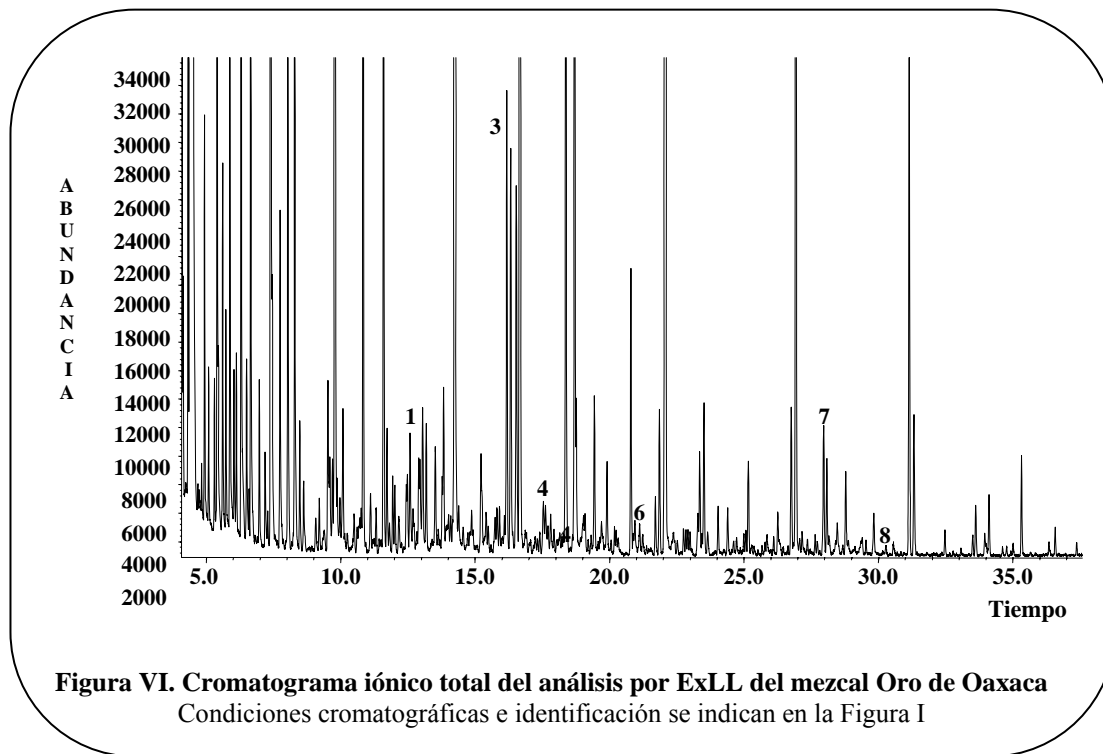
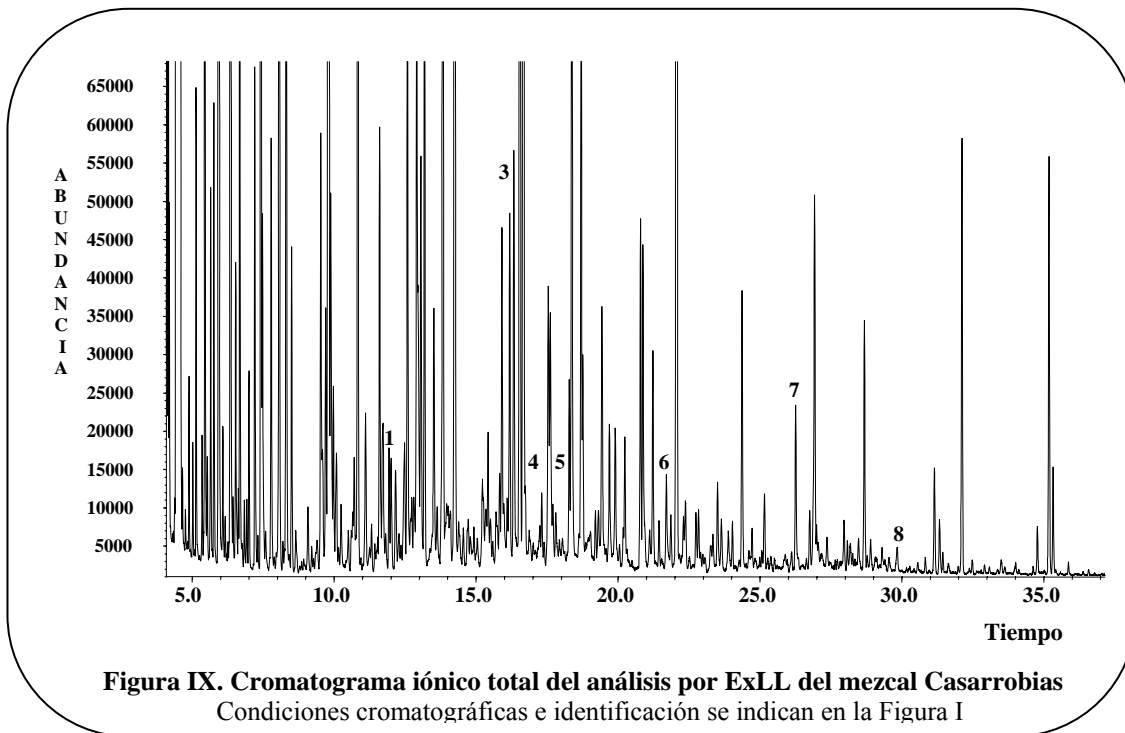
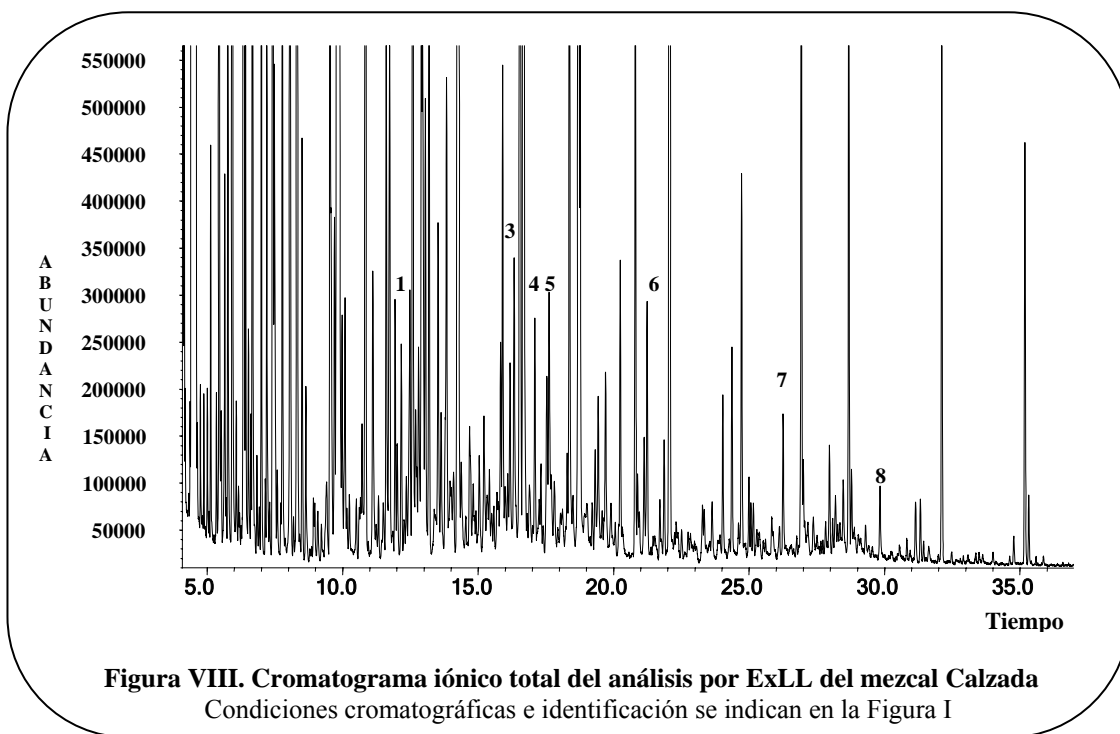


Figura III. Cromatograma iónico total del análisis por ExLL del mezcal Rey Zapoteco
Condiciones cromatográficas e identificación se indican en la Figura I







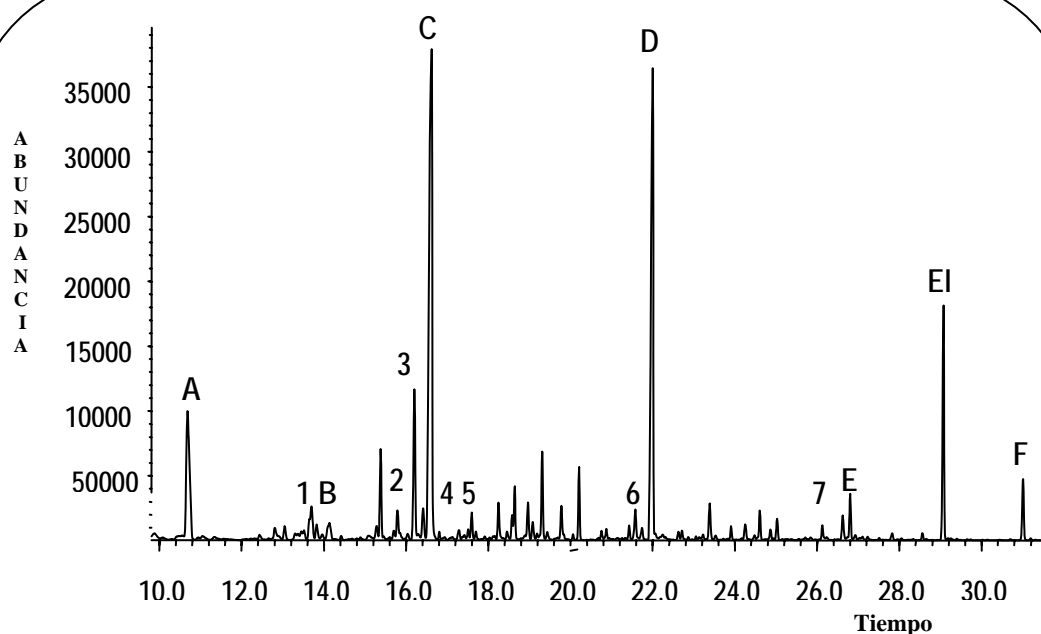


Figura X. Cromatograma iónico total del análisis por MEFS del mezcal Agave Divino.
 Condiciones cromatográficas: Programa de Temperatura: inicial de 40° C isotérmica durante 1 min, incrementándose a 5° C/min hasta 210° C e incrementándose a 10° C min hasta 280° C durante 5 min.

Identificación

- 1) Linalol 2) 4-Terpineol 3) α -Terpineol 4) β -Citronelol
 5) Geraniol 6) Eugenol 7) Nerolidol 8) Farnesol
 A) EE6 B) EE7 C) EE8 D) EE10 E) EE12 F) EE14

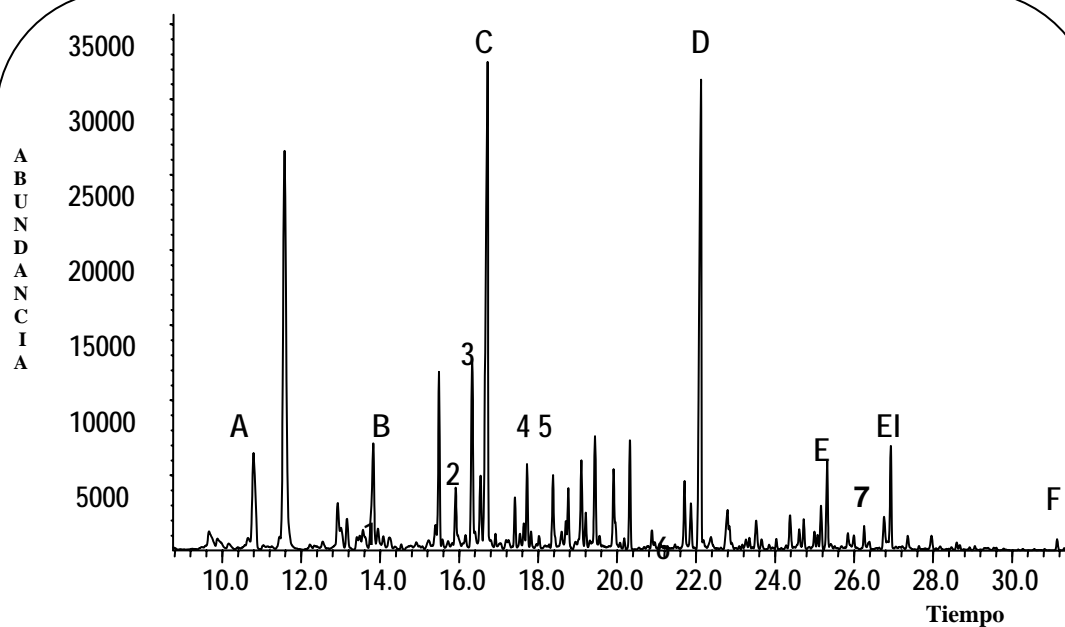
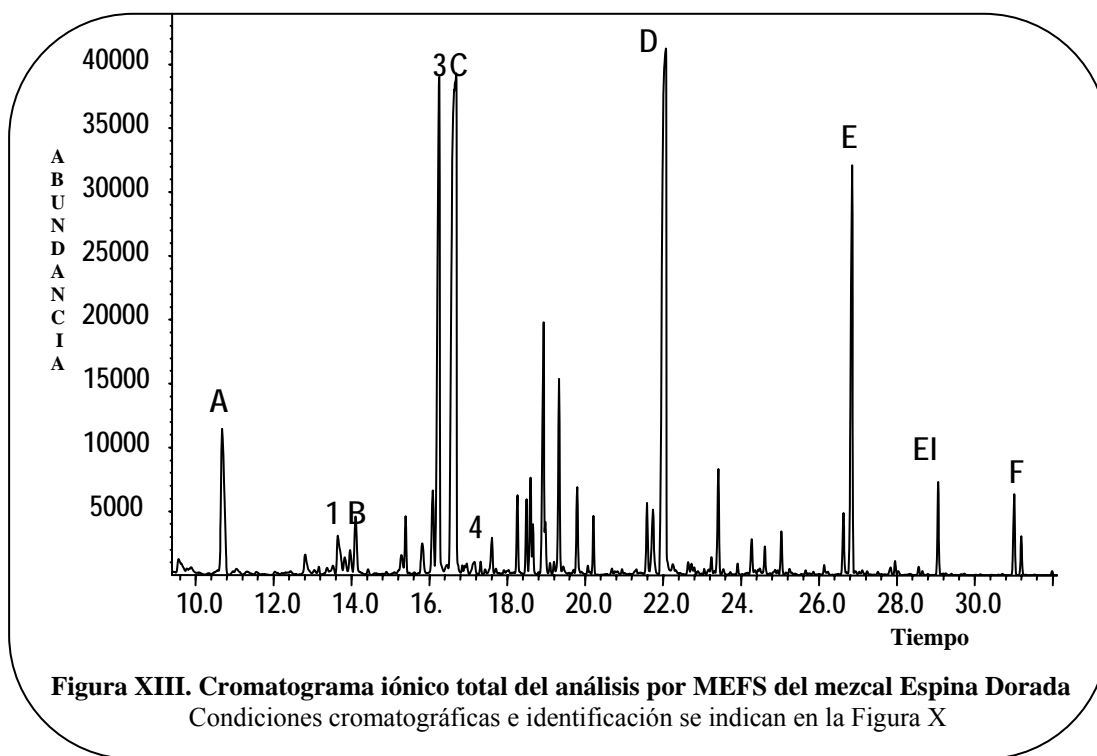
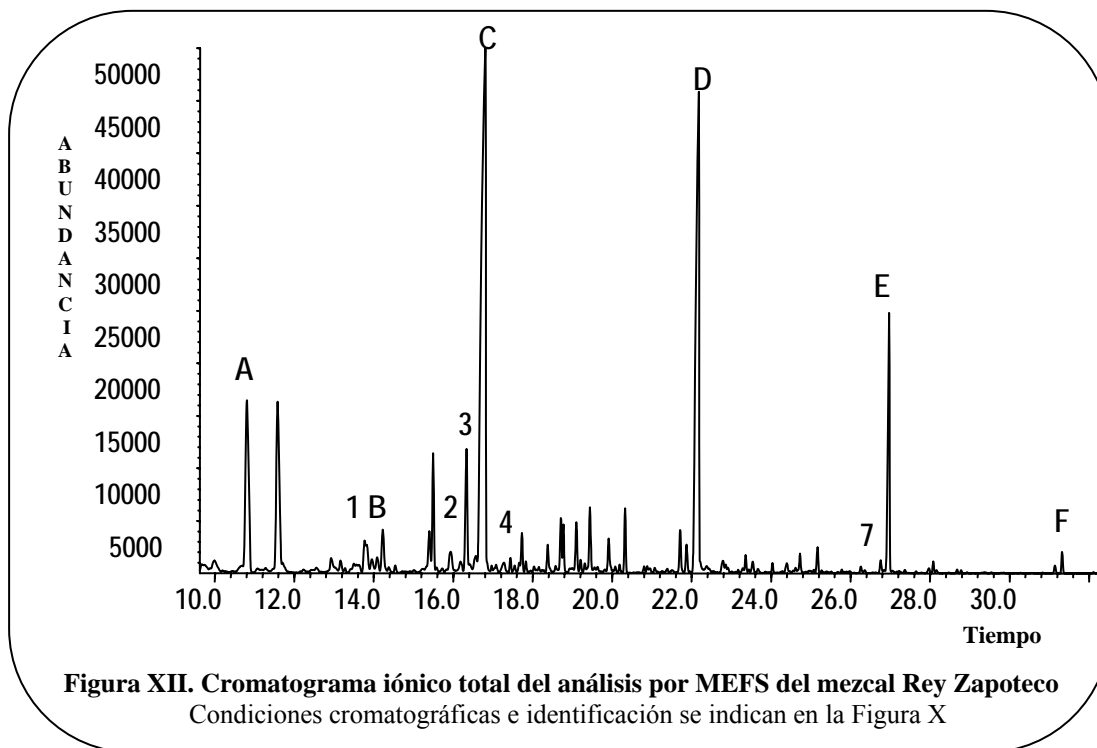
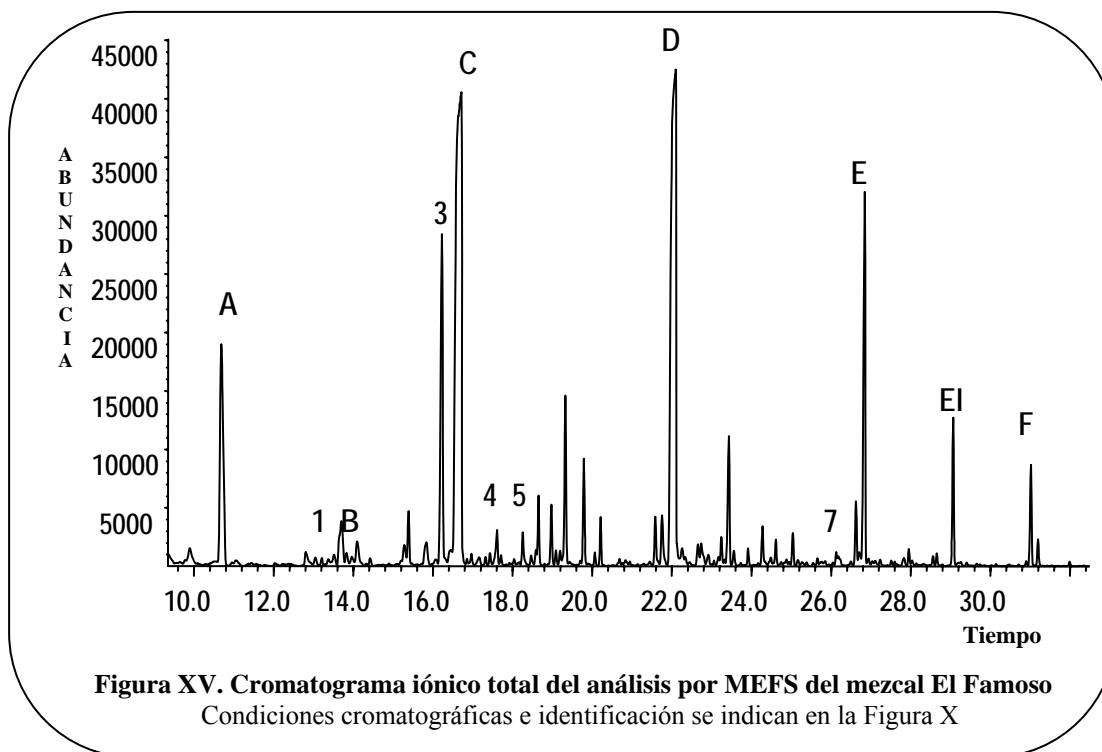
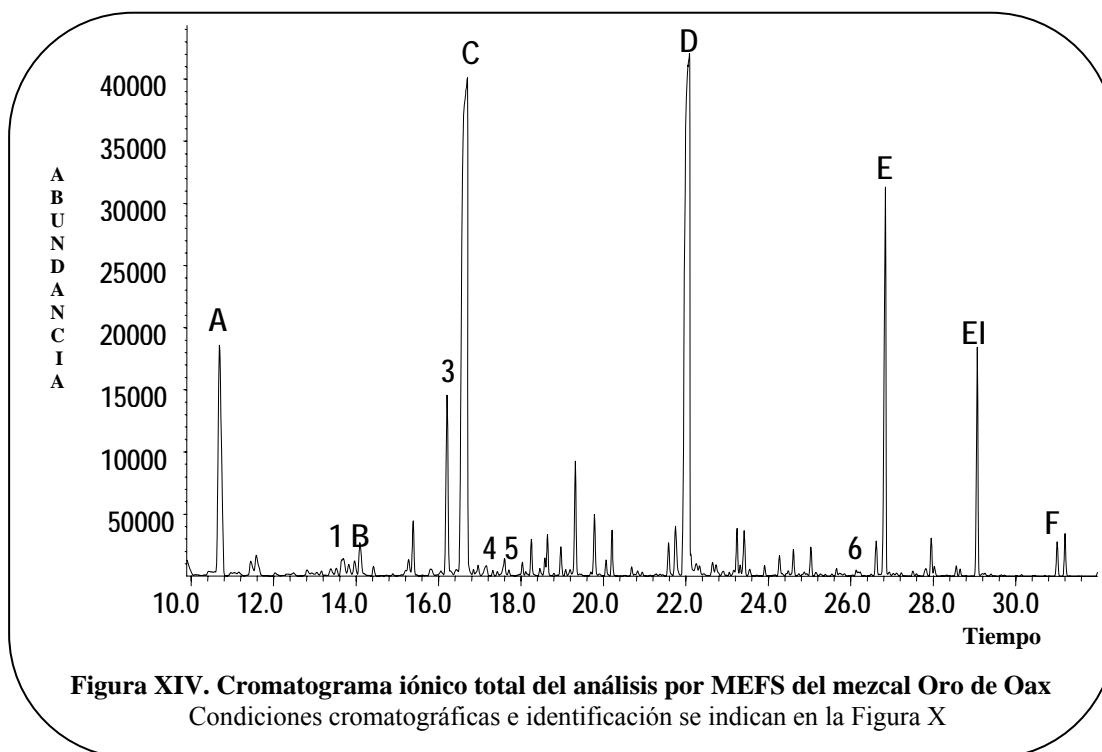
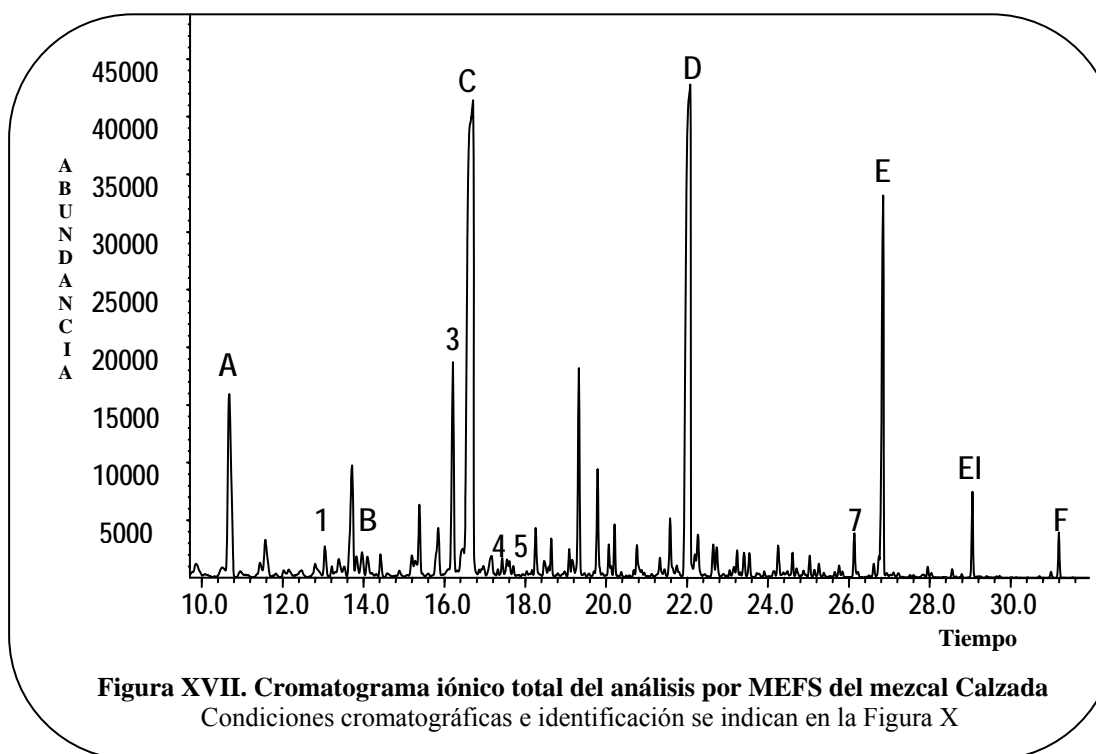
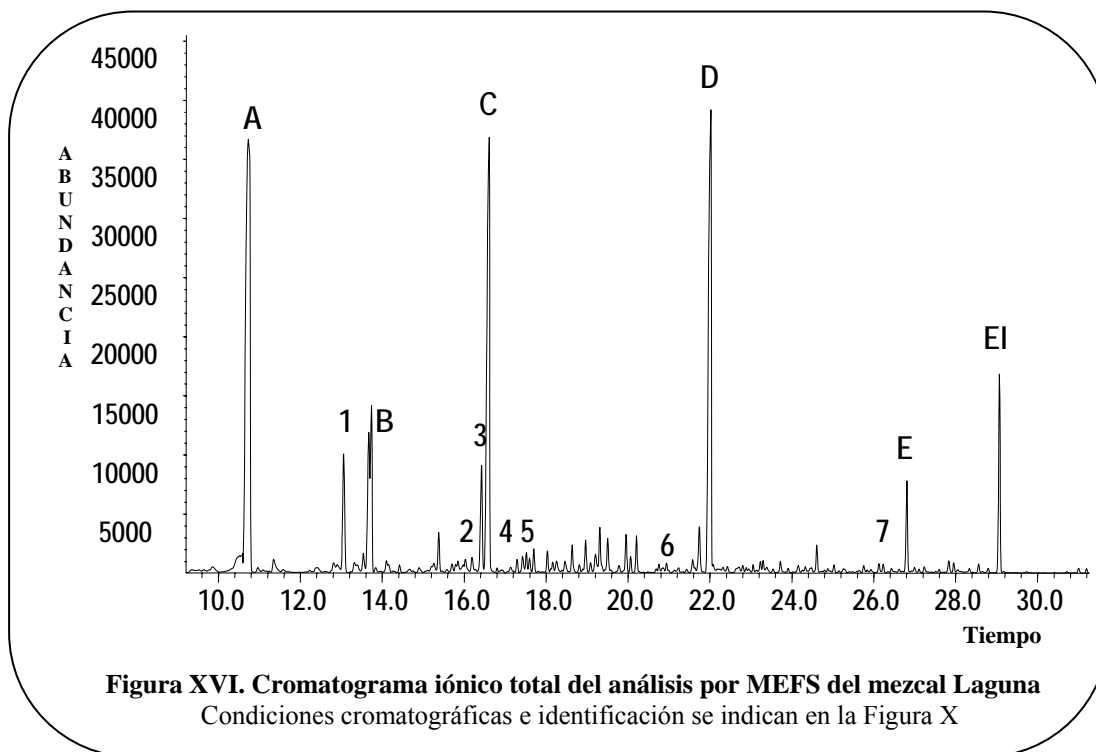
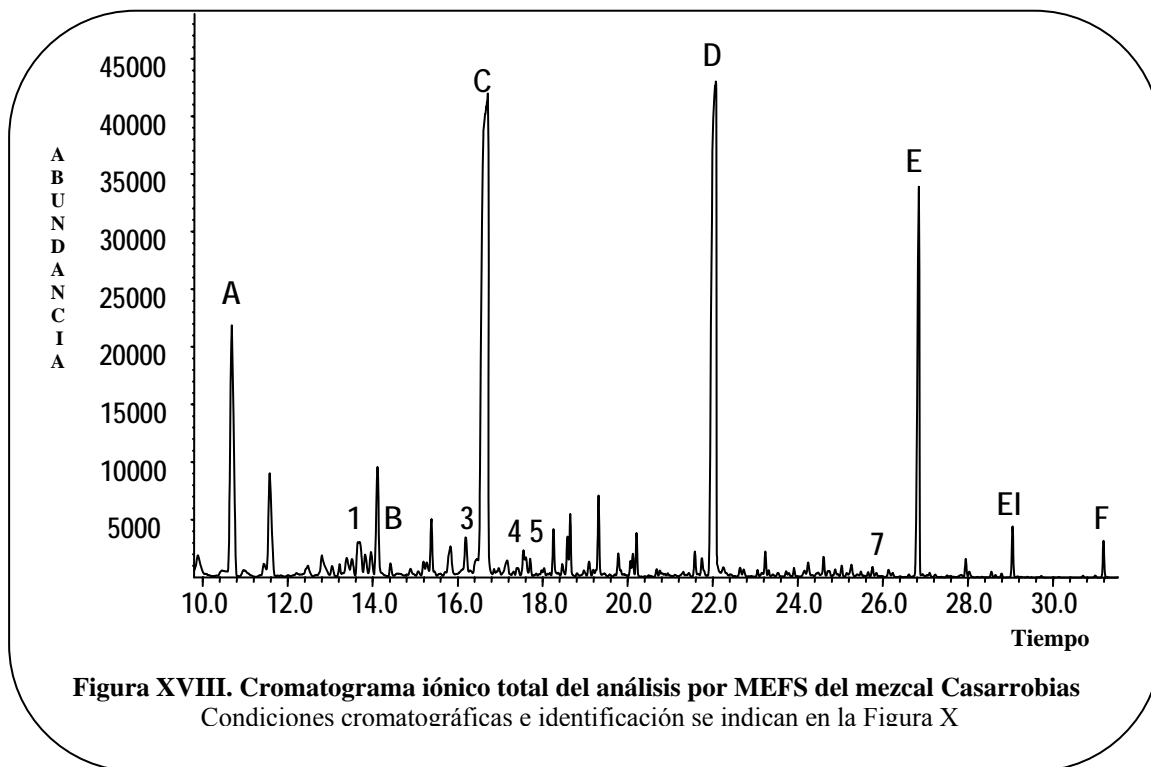


Figura XI. Cromatograma iónico total del análisis por MEFS del mezcal Señorío
 Condiciones cromatográficas e identificación se indican en la Figura X





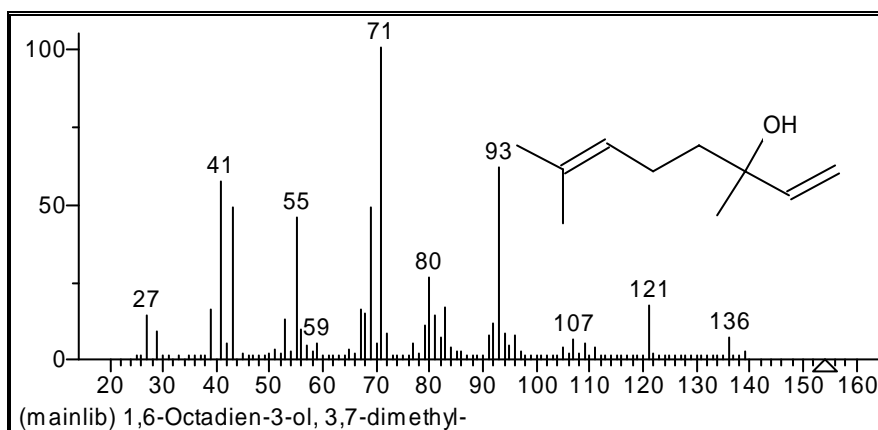




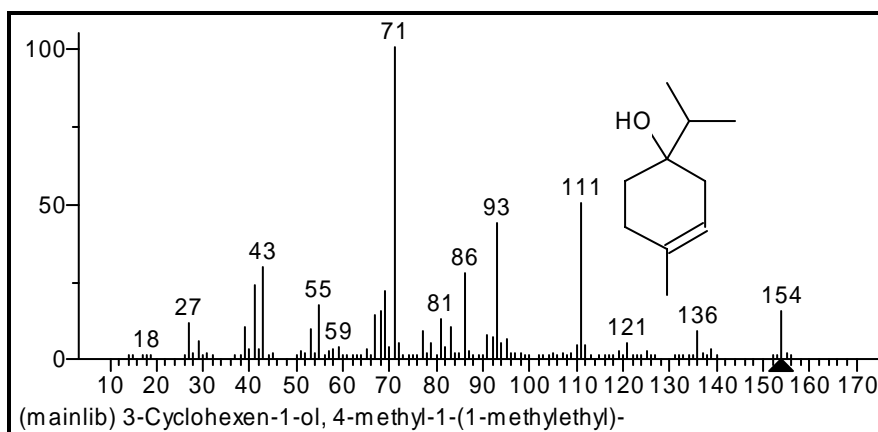
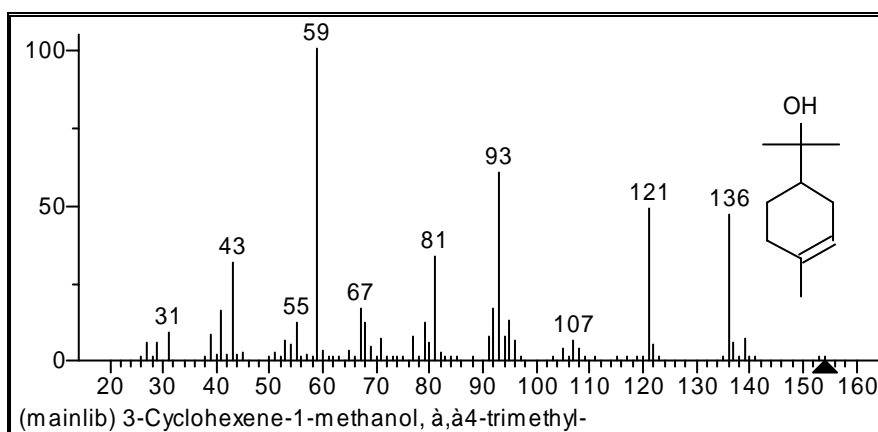
8.5 Espectros de masas de los compuestos identificados

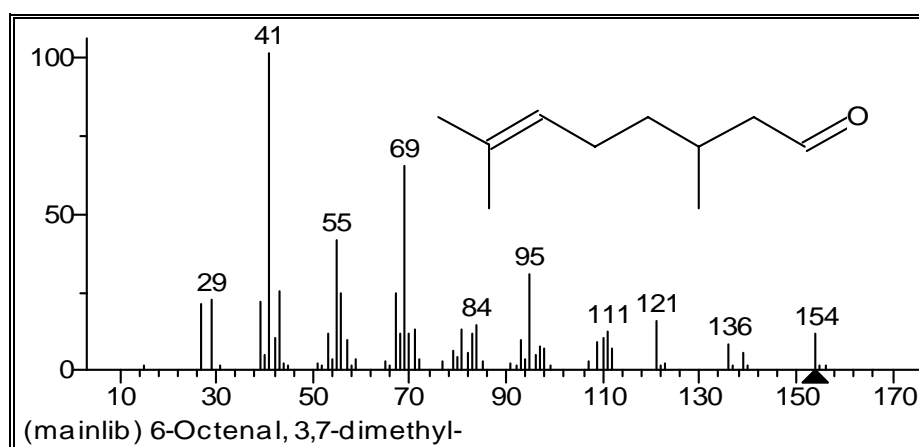
8.5.1 Terpenos

Linalol

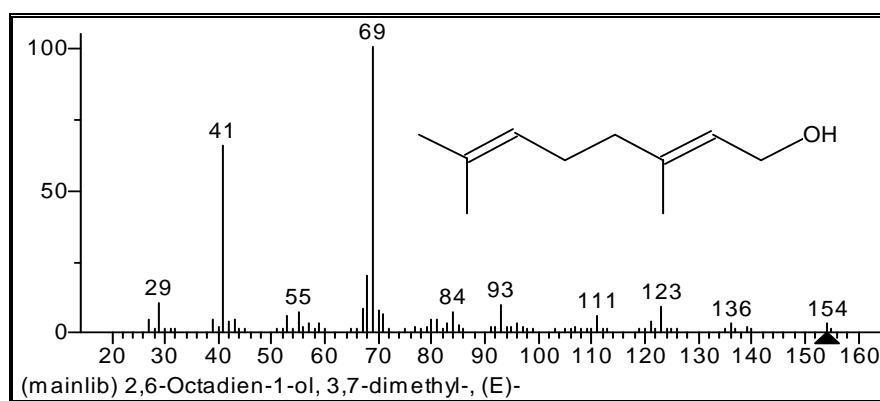


4 – Terpineol

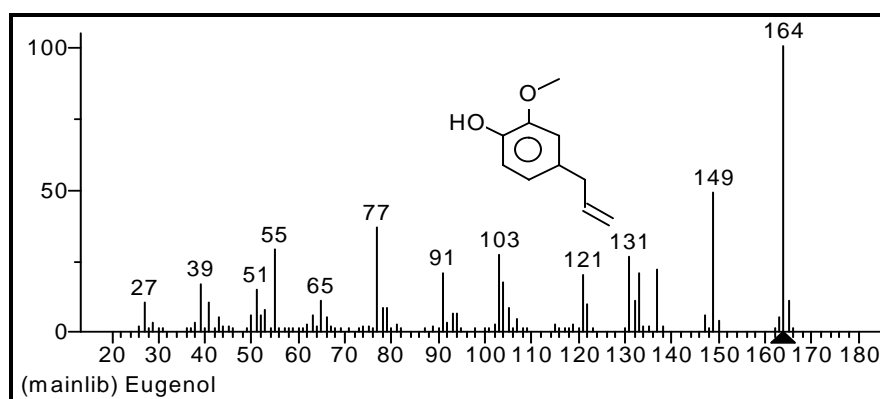
 α – Terpineol

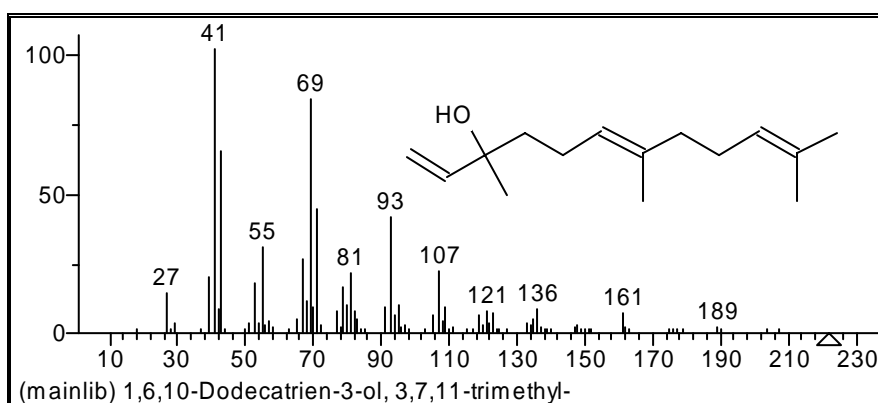
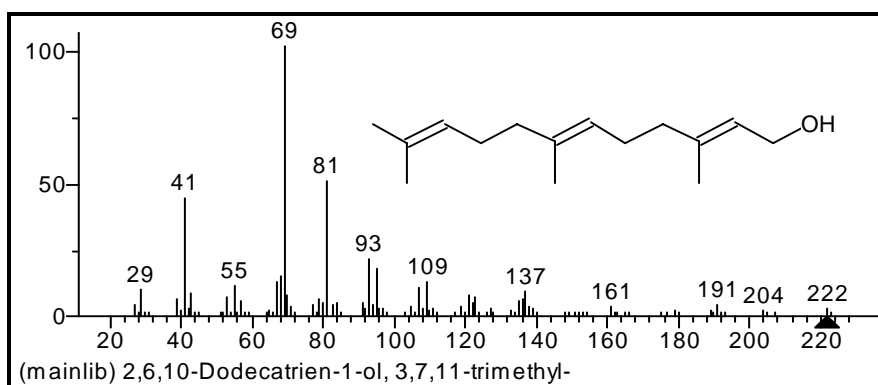
β - Citronelol

Geraniol



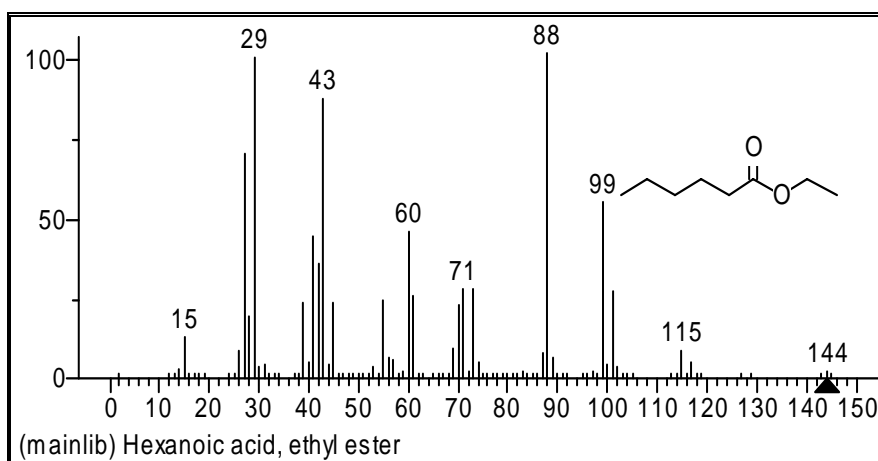
Eugenol



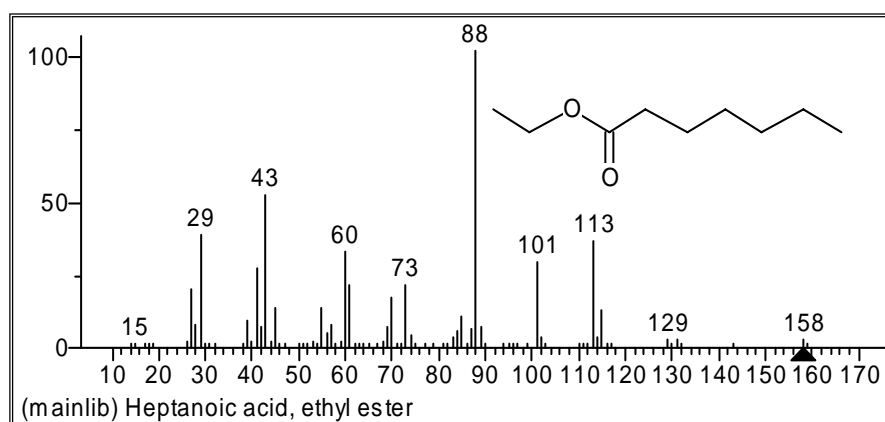
cis – Nerolidol*trans* – Farnesol

8.5.2 Ésteres etílicos de ácidos grasos

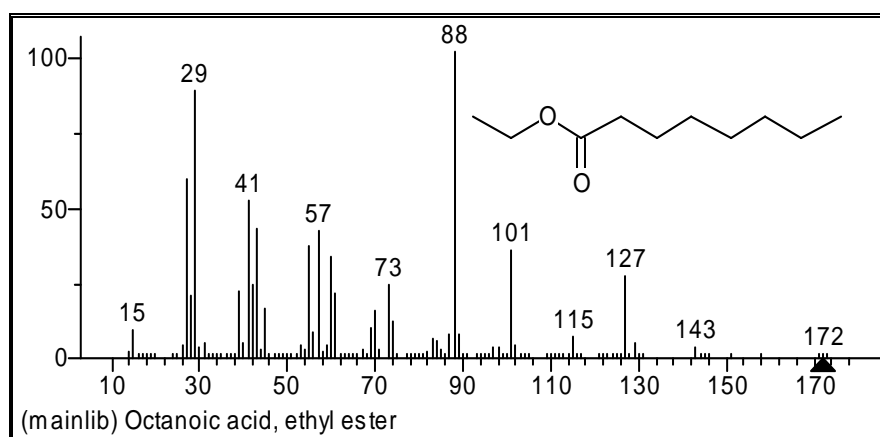
Hexanoato de Etilo



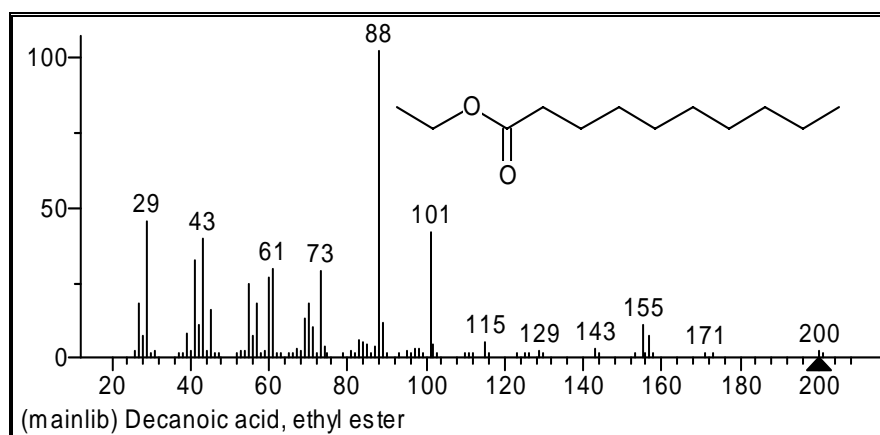
Heptanoato de Etilo



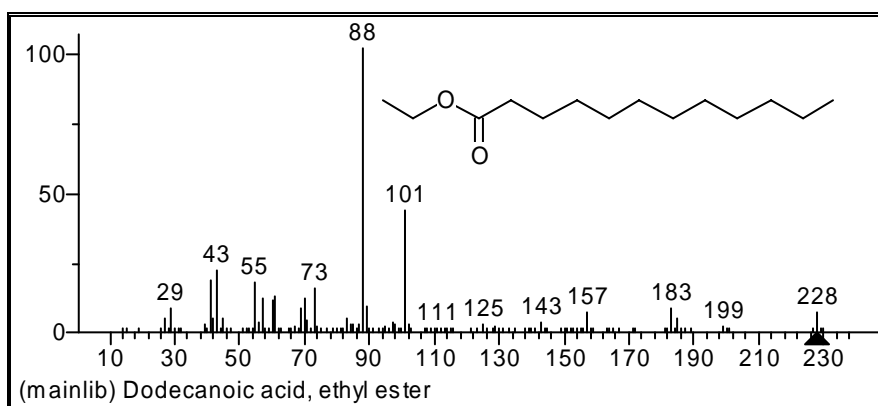
Octanoato de Etilo



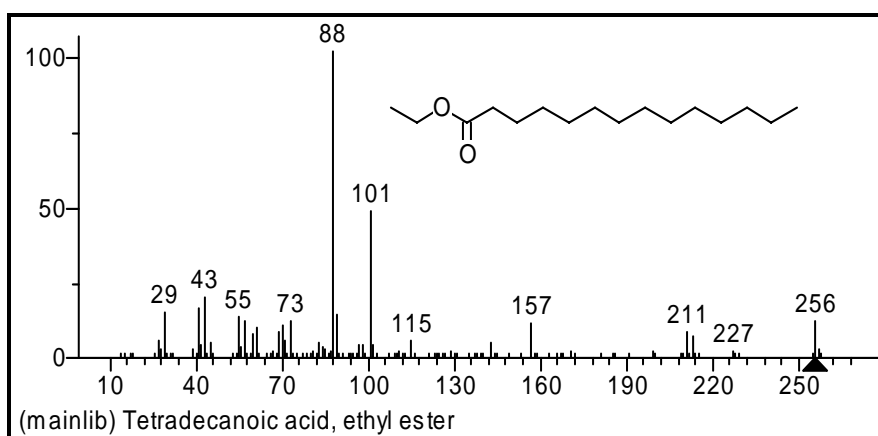
Decanoato de Etilo



Dodecanoato de Etilo



Tetradecanoato de Etilo



8.6 Prueba t de Student

Los resultados del método de ExLL se pueden contrastar mediante comparación con los obtenidos por MEFS. En este caso tenemos 2 medias muestrales χ_1 y χ_2 . Tomando como hipótesis nula que los dos métodos proporcionen el mismo resultado, es decir $H_0: \mu_1 = \mu_2$, se necesita probar si $(\chi_1 - \chi_2)$ difiere significativamente de cero. Consideramos que las 2 muestras tienen desviaciones estándar que no son significativamente diferentes.

Hipótesis nula: $H_0: \mu_1 = \mu_2$

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

Si $t_{cal} < t_{4,0.01}$ la hipótesis nula se acepta

Estadístico para el cálculo:

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{s \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

donde s se calcula a partir de

$$s^2 = \frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{(n_1 + n_2 - 2)}$$

y tiene $n_1 + n_2 - 2$ grados de libertad

Para la comparación se utiliza el valor de tablas $t_{4,0.01} = 3.74$ ($P = 0.01$).

Bibliografía.

1. Juárez Rocío. “*Determinación de Terpenos en Tequila 100% Agave*”. (Tesis Maestría, Facultad de Química, UNAM, 2006).
2. Medina Alejandra. “*Determinación de terpenos en Agave Tequilana Weber var. Azul, Agave angustifolia y Agave salmiana, así como en sus bebidas alcohólicas*”. (Tesis Facultad de Química, UNAM, 2004).
3. León-Rodríguez A, González-Hernández L, “*Characterization of volatile compounds of mezcal, an ethnic alcoholic beverage obtained from Agave salmiana*” **J. Agric. Food Chem.**, 54 (2006), 1337-1341.
4. Lachenmeier, D, Sohnius E. “*Quantification of selected volatile constituents and anions in mexican agave spirits (Tequila, Mezcal, Sotol, Bacanora)*” **J. Agric. Food Chem.**, 54 (2006), 3911-391.
5. **Historia de la comida mexicana** [en línea, disponible en <http://www.comida.com.mx/historia/platillos/mezcal.htm>; Internet; accesado el 14 febrero del 2006)
6. *Norma Oficial Mexicana NOM-070-SCFI-1994. Bebidas alcohólicas-Mezcal-Especificaciones.*
7. **Denominación de origen del mezcal y zonas que lo componen** [en línea, disponible en <http://www.alcoholinformate.org.mx/saberdelmundo.cfm?articulo=sm55>; Internet; accesado el 14 de Febrero del 2006]
8. Suomalainen H, Lehtonen M. “*The production of aroma compounds by yeast*”. **J. Inst. Brew**, 85 (1979), 149.
9. McMurry J. Organic Chemistry. (Brooks/Cole Publishing company, 1992), 1066-1070.
10. Fennema, O. Química de los alimentos. (Editorial Acribia, 2a. ed, Zaragoza, España, 1993), 684-686.
11. Peña-Alvarez A, Díaz L, Labastida C, Capella S, Medina D. “*Characterization of three Agave species by gas chromatography and solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry*”. **J of Chrom.** 1027 (2004), 131-136.
12. Carrau J. “*De novo synthesis of monoterpenes by Saccharomyces cerevisiae wine yeast*”. **FEMS Microb. Letters**, 243 (2005), 107-115.

13. Eberhardt R, Allen K. “*Complete Separations and Quantitation of fusel oils by Capillary CG*”. **Agilent Techn.** USA, 2003.
14. Eden A. “*Involvement of branched-chain amino acid aminotransferase in the production of fusel alcohols during fermentation in yeast*”. **Appl. Microb. Biotechn.** 55 (2001), 296-300.
15. Zoecklein B, et al. Wine analysis and production. Editorial Springer, 1ª ed, EU, pag 104-115, 1995.
16. Wade L. Química Orgánica (México: Prentice Hall, 1993), 987.
17. Belitz M, Grosch W. Química de Alimentos (España: Acribia, 1997), 175-178.
18. Solomons Graham. Química Orgánica (México: Limusa, 1996), 934.
19. Zhouyao Z., Min J.Y. Analytical Chemistry. (1994), 844-852.
20. Skoog D, et al. Principios de análisis Instrumental (España: McGraw Hill, 2001), 271-272, 274-275. .
21. Rubinson, Judith. Rubinson Kenneth. Química Analítica Contemporánea (México: Prentice Hall, 2000), 381-389.
22. Rojas I. “*Microextracción líquido-líquido para la extracción de compuestos fenólicos en agua por cromatografía de gases*. (Tesis Facultad de Química, UNAM, 1998), 21-24.
23. Pawliszyn, J. “*Detection of substituted benzenes in water at the pg/ml level using solid-phase microextraction and gas chromatography-ion trap mass spectrometry*”. **J Chrom.**; 625(1992), 247-55.
24. Marsili, Ray. Techniques for analyzing Food Aroma. (New York: Marcel Dekker Inc, 1997).
25. Mallouchos A, Kamaitis M. “*Investigation of volatiles evolution during the alcoholic fermentation of grape must using free and immobilized cells with the help of solid phase microextraction (SPME) headspace sampling*”. **J Agric Food Chem.**; 50(2002), 3840-8.