



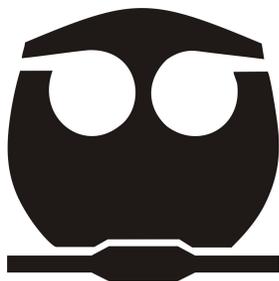
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Determinación de Hidrocarburos
Aromáticos Policíclicos (HAP's) en Mezcal
por Cromatografía de Gases y
Espectrometría de Masas (CG-EM).**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO DE ALIMENTOS

P R E S E N T A
RODRIGO ALONSO VILLEGAS



MÉXICO, D.F.

2007



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.

Dedico este trabajo a:

Dios

Por darme salud y la fuerza para salir adelante

Mi Familia

Irma, Rosalinda, Julieta, Heriberto (q. e. p. d.), Arely y Jonathan

**Gracias por todo lo que me han dado, su amor y sacrificio, el cual estaré
agradecido toda mi vida**

Agradecimientos:

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO (UNAM)

FACULTAD DE QUÍMICA

**Por haberme brindado los conocimientos necesarios para lograr unos de los
muchos objetivos que tengo en esta vida**

Dra. Araceli Peña Álvarez

Por todo el apoyo brindado y la oportunidad de trabajar con usted

Dra. Patricia Severiano Pérez

Por su confianza y sinceridad en todo momento

M. en C. Carmen Labastida Rubio

Por sus enseñanzas y su enorme paciencia

También al resto de mi familia: Sara, Roberto, Erik, Aldo, Georgina (q. e. p. d.), Miguel, Miguelito, Sara, Rodrigo, Miguel, Laura, Romi, Mario, Rebeca, Cristian, Paula, Ximena, Leticia, Guillermina, Karla, Fernanda y los que faltaron saben que los tengo en mi corazón porque son parte de mi familia los quiero mucho!!!

A mis amigos del laboratorio 101: Erika, Miguel, David y Magali.

A la Generación 2002 de QA's: Rubén, Andrés, Carmen, José, Javier, Naka, Persy, Tere y los que faltaron saben que los tengo presentes, al equipo de fútbol que quedamos campeones el año pasado

A mis amigos que conocí en la Facultad de Química y otras facultades y que siempre estarán conmigo en todo momento

A todos mis amigos de la Prepa 9 en especial a Hallan, Alejandra, Gil y los que faltaron en esta larga lista que no terminaría

A todas las grandiosas mujeres que han estado conmigo todos estos años porque aprendí muchas cosas de ellas y que saben que las seguiré teniendo en cuenta toda mi vida

A la música que sin ella no podría seguir disfrutando de esta maravillosa vida en especial a Oasis y The Beatles

Al equipo de futbol Pumas de la UNAM que me ha llenado de gran felicidad todos estos años por su gran desempeño

HERE AND NOW, I'M GONNA LIVE FOREVER!!!...

ÍNDICE

	Página
Resumen	1
1. Introducción	2
2. Antecedentes	4
2.1 Mezcal	4
2.2 Elaboración del mezcal	4
2.3 Legislación del mezcal	5
2.4 Química del mezcal	6
2.5 Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP's)	7
2.5.1 Características generales de los HAP's	7
2.5.2 Origen y formación de los HAP's	11
2.5.3 Generación de los HAP's en el proceso de elaboración del mezcal	13
2.5.4 Metabolismo y toxicidad de los HAP's	14
2.5.5 Legislación de los HAP's	16
2.6 Cromatografía de Gases (CG)	17
2.7 Espectrometría de Masas (EM)	19
2.8 Acoplamiento CG-EM	21
2.9 Técnicas de preconcentración, concentración y análisis de los compuestos responsables del sabor, olor y aroma en alimentos	21
2.9.1 Microextracción en Fase Sólida (MEFS)	22
2.9.2 El Dispositivo de la MEFS	23
2.9.3 Procedimiento de la MEFS	24
3. Objetivos	26
3.1 General	26
3.2 Particulares	26
4. Desarrollo Experimental	27
4.1 Muestras	27
4.2 Materiales y reactivos	27
4.3 Metodología	28
4.3.1 Determinación de HAP's por HS-MEFS-CG-EM	28
4.3.1.1 Preparación de disoluciones estándar de HAP's	28
4.3.1.2 Preparación de curva patrón	29
4.3.1.3 Procedimiento para la determinación de HAP's en mezcal por HS-MEFS-CG-EM	30
4.3.1.4 Procedimiento para la elaboración de la curva patrón	31
4.3.2 Condiciones de MEFS	31
4.3.3 Condiciones cromatográficas	32
4.3.4 Esquema analítico para la determinación de HAP's en mezcal por HS-MEFS-CG-EM	33
5. Resultados y Discusión	34
5.1 Microextracción en Fase Sólida (MEFS)	34
5.2 Optimización de la MEFS	34
5.3 Identificación de HAP's en mezcal por HS-MEFS-CG-EM	40
5.4 Cuantificación de HAP's en mezcal por HS-MEFS-CG-EM	44
6. Conclusiones	54
7. Anexos	56
7.1 Cromatogramas	56
7.2 Espectros de Masas de los HAP's identificados	61
7.3 Gráficas de la curva patrón (relativa) de los HAP's estudiados	64
8. Bibliografía	66

Resumen

Se desarrolló una metodología para la extracción y concentración de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's) presentes en el mezcal, así como para su cuantificación utilizando la técnica de Microextracción en Fase Sólida (MEFS) seguida de Cromatografía de Gases (CG) acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM). Se analizaron 10 muestras de mezcal elaboradas de diferente especie de Agave (*A. angustifolia*, *A. salmiana*, *A. espadín* y *A. cupreata*), identificándose 7 hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's); de los cuales sólo 6 se cuantificaron en cada una de las muestras de mezcal. Se trabajó con buena precisión y se obtuvieron límites bajos de detección de los 6 hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's), cuantificándose: naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno y antraceno en las muestras de mezcal estudiadas.

1. Introducción

El mezcal es una bebida alcohólica tradicional de México, con una importancia cultural y económica, principalmente en algunos estados de la República. El sabor tan peculiar del mezcal, es en realidad una delicada mezcla de compuestos orgánicos presentes en una matriz de etanol-agua; estos compuestos proporcionan el aroma y sabor característicos. A pesar de que el mezcal es una de las bebidas más conocidas y populares en nuestro país, los estudios acerca de su composición son muy escasos¹.

Actualmente en México existe legislación para este producto mediante la norma NOM-070-SCFI-1994², la cual establece especificaciones para el contenido de algunos compuestos orgánicos, 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.

A pesar de que en otras bebidas alcohólicas como el tequila, ron, ginebra, champagne, vodka, coñac, etc. se han desarrollado tecnologías avanzadas para mejorar su composición química y en consecuencia tener un mejor control de calidad en ellas, el mezcal es una bebida alcohólica en la que se ha tratado de conservar su elaboración artesanal; es por ello que tiene denominación de origen⁴.

Actualmente la elaboración de mezcal sigue siendo un proceso artesanal y no estandarizado debido a esto existe la posibilidad que durante la etapa de cocimiento de las piñas de Agave se incorporen los productos de la combustión incompleta de la materia orgánica presentes en el cocimiento; entre ellos los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's) depositándose en el producto final por su carácter hidrofóbico ya que pueden acumularse en el tejido lipídico de la

planta de Agave específicamente en la piña. El proceso de cocimiento generalmente se realiza en cuatro días³.

Al ser los HAP's compuestos contaminantes prioritarios⁶ y algunos de ellos pueden ser potencialmente cancerígenos¹⁶ es necesario que se profundice en su estudio, para poder identificarlos y cuantificarlos en este tipo de productos, mediante procedimientos analíticos sensibles ya que la presencia de éstos podría originar un problema de seguridad alimentaria.

El objetivo principal de este trabajo es identificar y cuantificar la presencia de estos compuestos en el mezcal mediante Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM); así mismo se pretende optimizar el método de extracción que será utilizado, este método será la Microextracción en Fase Sólida (MEFS)¹³.

2. Antecedentes

2.1 Mezcal

La palabra "mezcal" se deriva de las palabras náhuatl *melt* -maguey e *ixcalli* -asado que significan "Agave cocido al horno" por el proceso de elaboración del mismo.

Actualmente, la Norma Oficial Mexicana NOM-070-SCFI-1994² lo define como una "bebida alcohólica que se obtiene por la destilación de y rectificación de los mostos o jugos preparados directamente con los azúcares extraídos de las cabezas maduras de distintas especies de Agave; entre las especies de Agave más comunes se encuentran: *Angustifolia haw*, *Esperrima jacobi*, *Weberi cela*, *Salamina Otto* y tal vez el más estrechamente relacionado con el mezcal el *Potatorum zucc.*, las piñas son previamente cocidas y sometidas a fermentación alcohólica".

2.2 Elaboración del mezcal

La producción de mezcal en muchas zonas rurales de México es el resultado de conocimientos transmitidos de generación en generación. Los mezcaleros han incorporado nuevos elementos para mejorar la elaboración del destilado de Agave, pero conservando en esencia el sistema aprendido siglos atrás. De manera esquemática, el mezcal se produce de la siguiente manera³:

a) Selección de las mejores plantas. A partir de la cosecha del Agave se seleccionan las plantas que alcancen por lo menos ocho años de edad (etapa de maduración), y después se procede al corte de las pencas y extracción de la piña.

b) Cocimiento. Posteriormente, las piñas (corazón del Agave) se colocan en un horno natural, que consiste en una excavación circular formando un gran recipiente recubierto de piedra cuyo energético para cocinar las piñas son rocas previamente calentadas con leña y madera, hasta alcanzar el "rojo vivo". El proceso de cocimiento se cumple aproximadamente en cuatro días.

c) Molienda. Las piñas así cocidas se cortan en trozos y se someten a maceración en molinos artesanales instalados en el suelo, con una gran piedra circular de tracción animal.

d) Fermentación. El mosto o jugo resultante se coloca en tinajas de madera donde fermenta en forma natural con los microorganismos del ambiente durante cuatro o cinco días (dependiendo de la temperatura ambiente).

e) Destilación. Finalmente, se procede a la doble destilación, para obtener un alcohol natural, homogéneo y de buena calidad.

2.3 Legislación del mezcal

Cuando uno degusta el mezcal encuentra diferentes variedades, formas, consistencias, distintos colores y sabores, por lo anterior la NOM-070-SCFI-1994², hace una diferencia, basada en el porcentaje de agave, estas son:

- Tipo I Mezcal 100% de Agave. Elaborado con los mostos que únicamente contienen azúcares provenientes de los Agaves.
- Tipo II Mezcal con otros azúcares: Elaborado por lo menos con un 60% de los mostos de los Agaves, a los que se les adiciona un 40% de otros azúcares.

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*.

*Abocado: Procedimiento para suavizar el sabor del mezcal, mediante la adición de uno o más productos naturales, saborizantes o colorantes.

- Mezcal joven: es aquel obtenido directamente del proceso de destilación.

El mezcal, al igual que el coñac, champagne, tequila, entre otras, sólo es posible obtenerlo de 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
- Durango

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 según la NOM-070-SCFI-1994².

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

2.4 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 como terpenos, ácidos grasos, alcoholes, alcoholes superiores (aceites de fusel), ésteres, etc. Muchas de estas reacciones son llevadas a cabo por enzimas presentes en el propio Agave y en las levaduras que realizan la fermentación, mientras que otras reacciones simplemente son el resultado de las condiciones del medio^{1,20}.

2.5 Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos (HAP's)

La familia de los HAP's es un grupo de hidrocarburos que consisten en moléculas que contienen dos o más anillos aromáticos fusionados y como característica común presentan baja solubilidad en agua y elevada solubilidad en disolventes orgánicos. Generalmente, los HAP's son producidos por combustión incompleta natural (incendios forestales) o antropogénica (combustión de automóviles u otra emisión contaminante humana) y se pueden encontrar en el agua, aire, suelo, alimentos y sedimentos¹⁷. Los HAP's pueden incorporarse al organismo por ingestión, inhalación o absorción dérmica. Como consecuencia de su baja solubilidad en agua y elevada en sustancias de naturaleza lipídica se acumulan en los tejidos y órganos del cuerpo, pudiendo permanecer así largos periodos de tiempo hasta llegar a interactuar con el ADN provocando mutaciones y algunas veces cáncer como una consecuencia fatal¹⁶.

2.5.1 Características generales de los HAP's

Esta clase de compuestos orgánicos formados al menos por dos anillos fusionados de benceno, los cuales difieren en el número y posición del anillo. Representan un grupo de más de 100 sustancias químicas diferentes que se forman durante la combustión incompleta de carbón, petróleo y gasolina, basura y otras sustancias orgánicas como tabaco y carne asada, ahumada o rostizada⁷. El naftaleno es el compuesto más simple de los HAP's y los compuestos aromáticos de interés tienen hasta 5 y 6 anillos¹⁹.

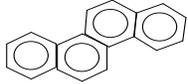
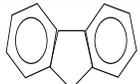
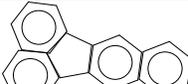
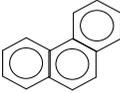
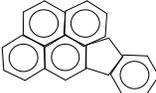
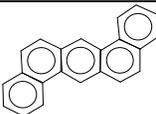
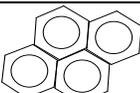
Nombre	Estructura	Nombre	Estructura
Naftaleno		Benzo[a]antraceno	
Acenaftileno		Criseno	
Acenafteno		Benzo[b]fluoranteno	
Fluoreno		Benzo[k]fluorantreno	
Fenantreno		Benzo[a]pireno	
Antraceno		Indeno[1,2,3-cd]pireno	
Fluoranteno		Dibenzo[a,h]antraceno	
Pireno		Benzo[g,h,i]perileno	

Figura 1. Estructura de los 16 HAP's considerados como contaminantes prioritarios por la Agencia de Protección Ambiental de EE. UU. (EPA, por sus siglas en inglés)¹².

Los HAP's individuales difieren sustancialmente en sus propiedades físicas y químicas y para reflejar este intervalo se presenta los 16 HAP's considerados por la Agencia de Protección Ambiental de EE. UU. (EPA, por sus siglas en inglés), Organización Mundial de la Salud (OMS) y Comunidad Económica Europea (CEE), como contaminantes orgánicos prioritarios (POPs, por sus siglas en inglés) debido a sus efectos potencialmente carcinogénicos¹⁶.

Tabla 2. Características fisicoquímicas de los HAP's¹².

HAP's*	Peso Molecular	Solubilidad en agua (mg/L) ¹	Presión de vapor (kPa) ²	Log kow ¹	Notas ³
Nap (2)	128	31.0	0.012	3.37	Tóxico
Acy (3)	152	3.5	0.004	3.74	
Ace (3)	154	3.9	5.81×10^{-4}	4.00	Tóxico
Flu (3)	166	1.98	4.16×10^{-5}	4.18	
Ant (3)	178	0.073	2.26×10^{-6}	4.54	Carcinógeno
Phe (3)	178	1.3	9.04×10^{-5}	4.57	Carcinógeno
Fla (3)	202	0.26	0.0012 Pa	5.22	
Pyr (4)	202	0.14	3.33×10^{-7}	5.18	Tóxico
BaA (4)	228	0.04	2.93×10^{-9}	5.75	Carcinógeno
Cry (4)	228	0.002	8.38×10^{-8}	5.75	Carcinógeno
BbF (5)	252	0.0012	6.66×10^{-8}	6.09	
BkF (5)	252	6.0×10^{-4}	7.86×10^{-12}	6.30	Carcinógeno
BaP (5)	252	3.8×10^{-3}	7.45×10^{-10}	6.04	Carcinógeno
DahA (5)	278	5.0×10^{-4}	1.33×10^{-11}	6.75	Carcinógeno
BghiP (6)	276	3.0×10^{-4}	1.39×10^{-11}	6.86	
Ind (6)	276	5.3×10^{-2}	1.33×10^{-12}	6.58	Carcinógeno

1) Mackay y Callcot, 1998; 2) Meharg y col., 1998; 3) Dzomback y Luthy, 1984.

Nap - Naftaleno, Acy - Acenaftileno, Ace - Acenafteno, Flu - Fluoreno, Ant - Antraceno, Phe - Fenantreno, Fla - Fluoranteno, Pyr - Pireno, BaA - Benzo[a]antraceno, Cry - Criseno, BbF - Benzo[b]fluoranteno, BkF - Benzo[k]fluoranteno, BaP - Benzo[a]pireno, DahA - Dibenzo[a,h]antraceno, BghiP - Benzo[g,h,i]perileno, Ind - Indeno[1,2,3-cd]pireno.

*Número de anillos que presenta el compuesto.

A temperatura ambiente los HAP's normalmente se encuentran en estado sólido. Las características comunes de estas sustancias son puntos de fusión y ebullición elevados, presión de vapor baja y solubilidad en agua muy baja, la cual decrece al aumentar la masa molecular y tamaño de la molécula. Son solubles en disolventes orgánicos y por lo tanto, tiene carácter no polar (hidrofóbico)⁶.

Como regla general, la persistencia de un compuesto incrementa al aumentar el tamaño de la molécula. Por ejemplo, la relativa baja persistencia del naftaleno y otros compuestos de baja masa molecular indican su escasa capacidad de bioacumulación mientras que los compuestos de mayor masa molecular, como el benzo[a]pireno, son altamente persistentes y por lo tanto, bioacumulables¹⁶.

Desde el punto de vista químico son poco reactivos, las reacciones que pueden sufrir e inducir son de radicales libres por ejemplo, con óxidos de nitrógeno, óxidos de azufre, ácido nítrico, ácido sulfúrico, etc.

La principal vía de degradación de estos compuestos incluye procesos químicos, fotolíticos o metabólicos asociados a microorganismos. En algunos casos se dan conjuntamente más de una, dependiendo de condicionantes como la temperatura, el oxígeno y los microorganismos disponibles. Entre los procesos químicos se incluyen los tratamientos de cloración y ozonización del agua, entre los fotolíticos la acción conjunta de oxígeno y luz solar. La actividad de los microorganismos se desarrolla normalmente a través de un co-metabolismo de los HAP's con materia orgánica nutriente.

Al ser considerados como contaminantes orgánicos prioritarios (POPs, por sus siglas en inglés), pueden permanecer en el ambiente durante largos períodos de tiempo sin ser alterados ni modificados de sus propiedades tóxicas⁵.

Una clasificación consta de los derivados alifáticos y alicíclicos del benceno, una segunda clasificación es la llamada polifenólica, la cual comprende a los compuestos en los cuales dos o más anillos bencénicos se encuentran fusionados.

Estos compuestos difieren en el número de posiciones del anillo aromático y el número y posición de sustituyentes químicos en el sistema básico; confiriéndoles características fisicoquímicas y toxicológicas especiales, como son su alta hidrofobicidad, su carácter lipofílico y su semivolatilidad, lo cual los hace peligrosos para los seres vivos.

Los HAP's se han clasificado en dos grandes grupos, el primer grupo se encuentra constituido por los HAP's de baja masa molecular, formados por dos o tres anillos aromáticos, entre los que se destacan el naftaleno y el fluoreno. En el segundo grupo destacan aquellos compuestos formados por cuatro o siete anillos aromáticos a los

cuales se les denomina HAP's de alta masa molecular, destacando por su nivel de toxicidad el dibenzo[a, h]antraceno y el benzo[a]antraceno. Con base en ello, se ha observado una relación estrecha entre el tamaño del compuesto y su solubilidad, ya que a mayor masa molecular disminuye su solubilidad en agua. Sin embargo, aumenta la toxicidad, el carácter lipofílico y la persistencia en el medio⁷.

2.5.2 Origen y formación de los HAP's

La fuente más importante de los HAP's es la combustión incompleta de cualquier material orgánico que contenga carbono e hidrógeno. Esto puede ocurrir naturalmente por incendios forestales y actividad volcánica, pero se reconoce que la mayoría de los HAP's detectados en matrices ambientales provienen de fuentes antropogénicas debidas a la quema de madera y combustibles fósiles. El mecanismo exacto de la formación de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's) no se ha establecido con certeza¹². Sin embargo, se ha postulado su formación a partir de una reacción de radicales libres y de la adición intermolecular o polimerización de pequeñas moléculas. Por otra parte, se ha comprobado su formación cuando se expone la materia orgánica a temperaturas elevadas de combustión (400-1000 °C), mediante un proceso de pirolisis orgánica y de condensación de los mismos reactivos.

De esta manera, la formación de los HAP's puede ser atribuida a la combustión incompleta de madera, material orgánico y combustibles fósiles. Diversas investigaciones a nivel mundial revelan la presencia de estos compuestos en aire, suelo, alimentos y agua. Los HAP's son sustancias ampliamente distribuidas en el ambiente, siendo su origen muy diverso, ya que es posible encontrarlos en el agua, en el aire, formando parte de los componentes de la gasolina, en el humo del cigarro, en los gases de escape de los automóviles, en la superficie del suelo y en los productos asados, ahumados y rostizados⁷.

A continuación se proponen algunas posibles rutas de formación de los HAP's a partir de compuestos simples como son el etileno, naftaleno, etc.

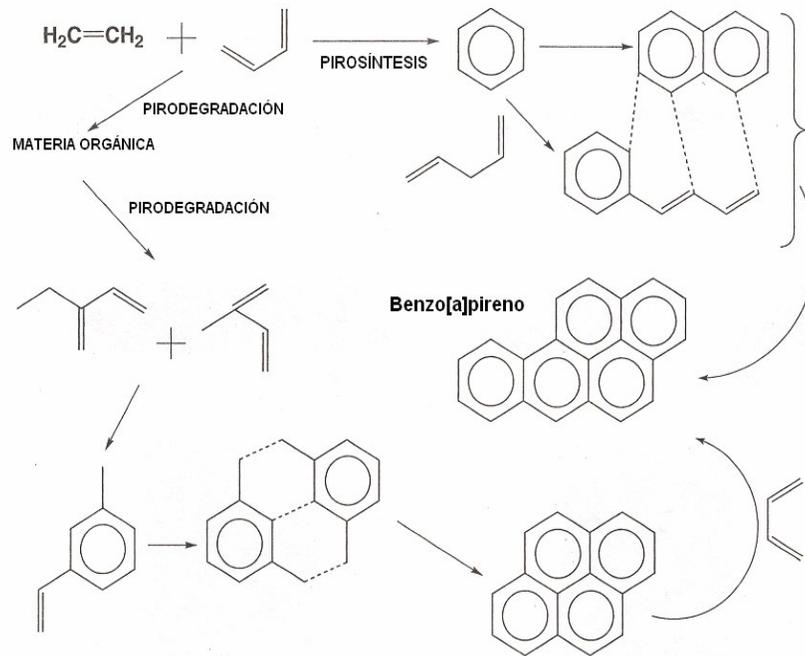


Figura 2. Mecanismo de formación del benzo[a]pireno¹².

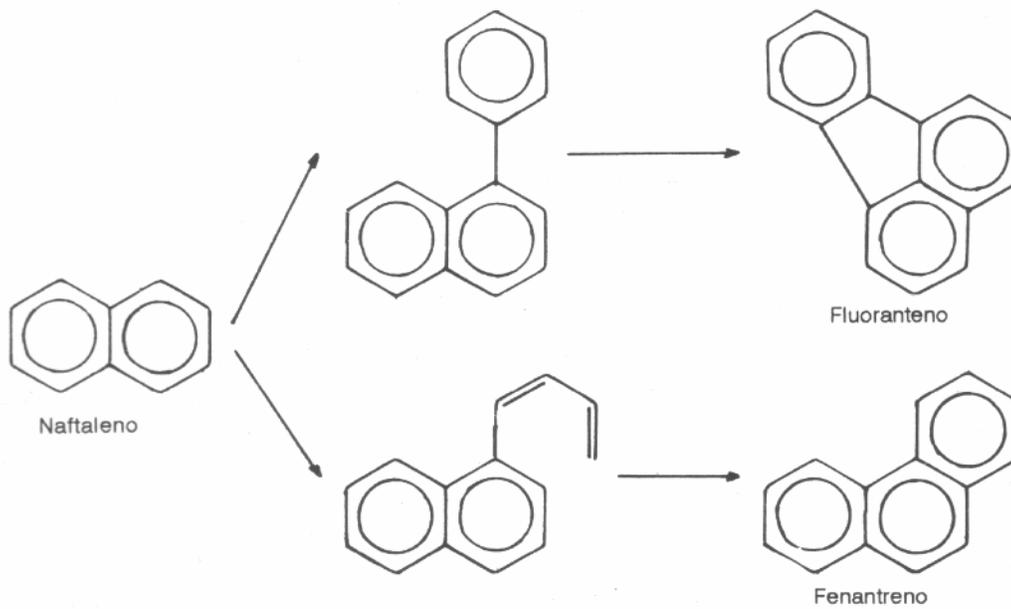


Figura 3. Mecanismo de formación del fenantreno y fluoranteno a partir de naftaleno⁷.

2.5.3 Generación de los HAP's durante el proceso de elaboración del mezcal

Como ya se mencionó, la elaboración de mezcal sigue siendo un proceso artesanal y no estandarizado. No obstante, actualmente se reportan tres formas para producir el mezcal: la artesanal, la tradicional y la moderna:

Tabla 3. Formas de producción del mezcal⁸.

Formas de producción/actividad	Producción artesanal	Producción tradicional	Producción moderna
Especie (s) de Agave	Varias, sobre todo las silvestres	Una sola, preferentemente el <i>espadín</i> (<i>A. angustifolia haw</i>)	Uso exclusivo de <i>A. espadín</i>
Cocimiento	En horno de tierra	En horno de piedra o tierra	En horno de piedra o autoclaves
Molido o triturado	Con mazos de madera o de piedra	En molinos con rueda de piedra jalada por bestias de tiro	Con desgarradoras mecánicas
Fermentación	En cueros de res, ollas de barro o canoas	En tinas de madera fabricadas exprofeso	En recipientes cilíndricos de acero
Destilación	En ollas de barro con carrizo como tubería	En alambiques de cobre con el uso de leña	En alambiques de cobre o acero de mayor capacidad con uso de leña o gas
Producción	Muy pequeña. Su uso se reserva para las fiestas patronales, normalmente no se comercializa	Para consumo casero y comercial	Eminentemente comercial
Características del mezcal	Inmejorable. Sabor suave y complejo. Olor característico. No produce resaca	De buena calidad. Fuertes variaciones en sus características en función del toque particular que cada productor le imprime	De buena calidad, sin grandes variaciones en sus características, con sabores menos complejos y aromáticos
Productores	Indígenas, generalmente alejados de las vías de comunicación principales	Principalmente indígenas cercanos a las vías de comunicación y a los centros urbanos	Indígenas y mestizos que viven cerca de los centros urbanos más importantes
Nivel de marginación de las comunidades	Alto y muy alto	Medio y alto	Bajo y medio

Debido a este hecho existe la posibilidad que durante la etapa de cocción de las piñas de Agave se depositen los productos de la combustión incompleta de la materia orgánica entre ellos los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's), los productos de la pirólisis orgánica de la madera compuesta de lignina, celulosa, hemicelulosa, etc. y también algunos compuestos producidos por las reacciones de *Maillard* llamados melanoidinas (compuestos precursores para formar HAP's), depositándose hasta el producto final por su carácter hidrofóbico ya que pueden acumularse en el tejido lipídico de la planta de Agave específicamente en la piña. El proceso de cocimiento generalmente se realiza en cuatro días^{3,18}.

2.5.4 Metabolismo y toxicidad de los HAP's

Los HAP's son altamente liposolubles y por lo tanto rápidamente absorbidos en el tracto intestinal de los mamíferos y otros organismos. Están distribuidos en una amplia variedad de tejidos con una marcada tendencia para localizarse en tejidos adiposos.

Los HAP's por sí mismos son compuestos relativamente no reactivos con respecto a macromoléculas biológicas en condiciones fisiológicas. Sin embargo, requieren activación biológica para manifestar genotoxicidad, incluyendo mutagenicidad y carcinogenicidad. Una vez que han entrado al organismo, el sistema de defensa celular trabaja para "eliminar" estas sustancias extrañas con ayuda del metabolismo de destoxificación⁷.

El metabolismo de los HAP's en los mamíferos se da principalmente en el hígado y es catalizado por el sistema enzimático del citocromo P₄₅₀, aunque otras enzimas metabólicas también están incluidas. Iniciando el metabolismo, los HAP's se convierten en moléculas más polares y solubles en agua para ser excretadas fuera del organismo, hasta completar su remoción o el proceso de destoxificación biológica (Figura 4). Sin

embargo, el metabolismo de algunos HAP's también genera intermediarios reactivos que son capaces de formar enlaces covalentes (aductos) con las bases nitrogenadas del ADN, resultando de esta manera tóxicos para el organismo hasta llegar a provocar mutaciones y algunas veces cáncer¹².

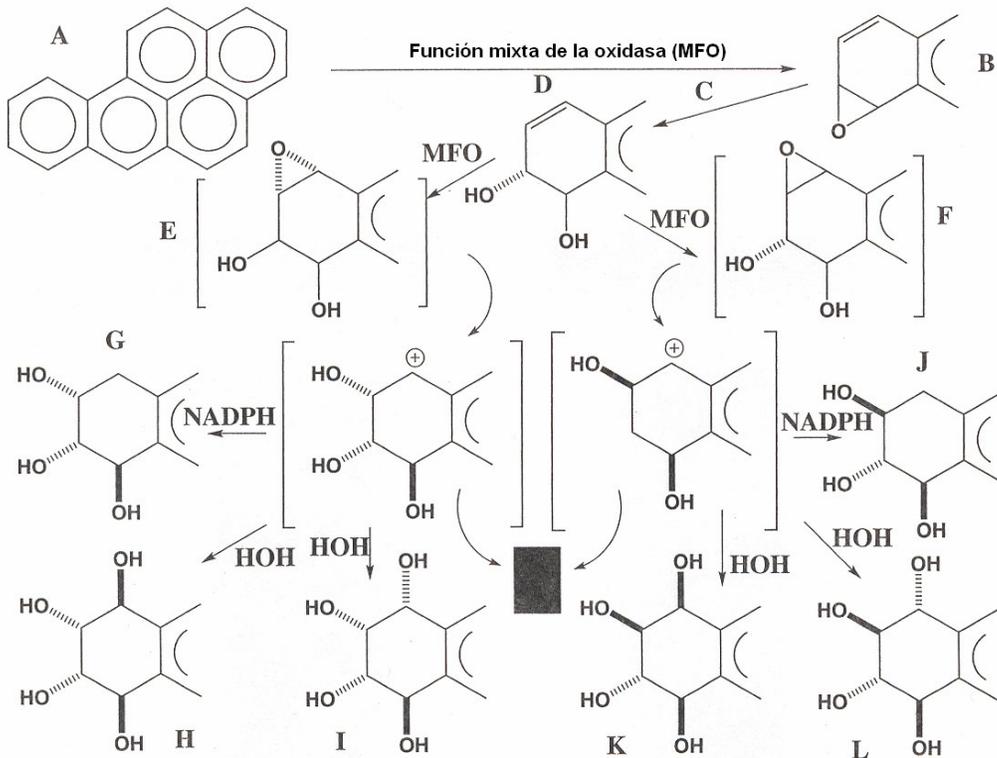


Figura 4. Metabolismo del Benzo[a]pireno¹².

El metabolismo de los HAP's es complejo. En general, los compuestos lipofílicos originales se convierten mediante epóxidos intermediarios en fenoles, dioles y tetroles que si son solubles en agua, éstos a su vez pueden conjugarse con el ácido sulfúrico y el glucurónico o el glutatión. El mecanismo de reacción es el siguiente:

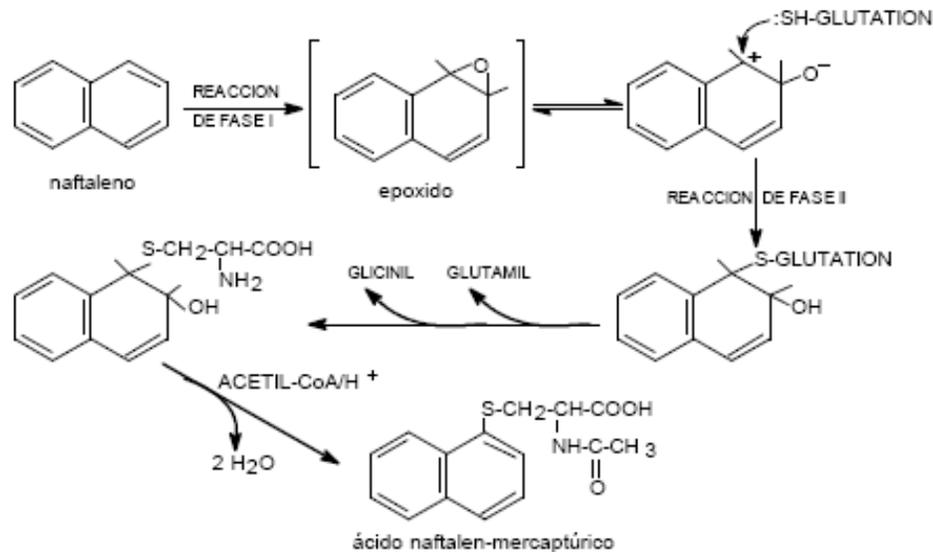


Figura 5. Conjugación con glutatión del naftalen 1,2-óxido (epóxido)⁷.

Este metabolismo produce en su mayor parte una detoxificación, pero algunos HAP's se activan a especies (principalmente diolepóxidos) que se unen al ADN y también a la hemoglobina, produciendo así mutaciones que finalmente evitan que las células se reproduzcan normalmente y como consecuencia la capacidad de generar tumores. Los metabolitos y sus conjugados como el derivado del ácido mercaptúrico se excretan en la orina y las heces, pero los no conjugados que se excretan en la bilis pueden hidrolizarse por acción de las enzimas de la flora intestinal y reabsorberse¹⁶.

2.5.5 Legislación de los HAP's

Actualmente, la normatividad para los HAP's es muy escasa sobretodo en México⁵ y los estudios con animales de laboratorio siguen dando resultados muy interesantes pero falta trasladarlos a los efectos negativos que puede causar a los humanos¹². Como ya se explicó en el apartado anterior se conocen algunas vías de metabolismo de detoxificación de los HAP's en el organismo humano. A pesar de esto, se sabe que algunos HAP's tienen acción carcinogénica y se ha señalado su presencia en el agua debido a que existen muchas fuentes de formación de estos compuestos en el

ambiente¹⁷ y, por consiguiente, el peligro que suponen para el humano tiene mucho riesgo. En general, la concentración de seis compuestos representativos del grupo (fluoranteno, 3,4-benzofluoranteno, 11,12- benzofluoranteno, 3,4-benzopireno, 1,12-benzoperileno e indeno [1,2,3-cd]pireno) no debe pasar de 0.2 µg/L. Esta concentración puede medirse valiéndose de un método de extracción líquido-líquido modificado.

La presencia de concentraciones superiores indica que persiste la contaminación y que el tratamiento de aguas ha sido insuficiente. Dado este hecho, las normas internacionales recomiendan a cada país que el agua superficial tratada debe ser objeto de exámenes periódicos y poseer de un centro capaz de determinar los HAP's en el agua potable¹⁴.

Además, debido a su alta toxicidad, en países como Alemania, Italia y Suiza se ha establecido una concentración máxima de 1.0 µg/Kg de producto de benzo[a]pireno en alimentos asados, ahumados, horneados ó rostizados, mientras que en EE. UU. el límite para este compuesto es de 0.03 µg/Kg de producto. Por otra parte, México no cuenta con ninguna legislación que establezca los límites permisibles de HAP's en productos alimenticios, siendo un país en el cual el consumo de productos alimenticios que pudieran contener HAP's no está limitado⁷.

2.6 Cromatografía de Gases

La Cromatografía de Gases es un método de separación basado en el equilibrio de distribución y elusión de la muestra entre 2 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 6) donde es vaporizada obligatoriamente 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 eluyen de la columna 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 mediante un complejo proceso se genera una señal que es procesada para crear un cromatograma¹¹.

La desventaja de la Cromatografía de Gases es que no es posible saber la estructura o la masa molecular de los compuestos que presentan una señal en el cromatograma, 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 no son característicos de cada compuesto, ya que varían de acuerdo a las condiciones cromatográficas y a la columna usada (polar o no polar). Para solucionar este inconveniente, se desarrolló una técnica acoplada a la Cromatografía de Gases que permite la identificación de los analitos separados y predecir la masa molecular de los mismos, se trata de la Cromatografía de Gases acoplada a la Espectrometría de Masas (CG-EM)⁹.

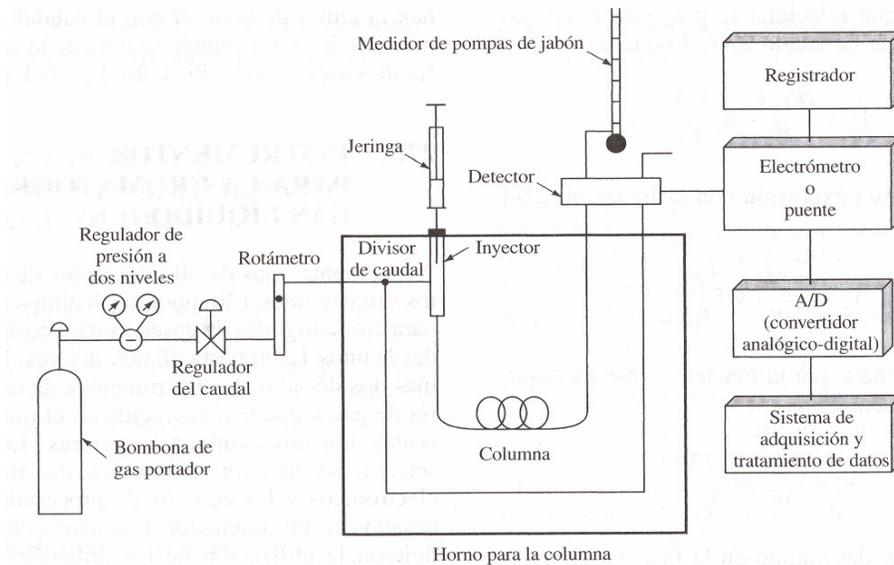


Figura 6. Esquema básico de un cromatógrafo de gases¹¹.

2.7 Espectrometría de Masas

El nombre de Espectrometría de Masas (EM) comprende diversas técnicas que se emplean para determinar las masas y estructura de los iones, átomos o moléculas.

Este proceso consta de 3 pasos:

- Generación de fragmentos de moléculas en fase gaseosa
- Ionización de los mismos
- Separación de acuerdo a su relación masa/carga

El conjunto de técnicas denominadas Espectrometría 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 átomos y moléculas. 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 los átomos y moléculas que inicialmente no son gases¹¹.

Fundamento. La muestra se introduce en forma de gas, líquido o sólido para ser inmediatamente vaporizada mediante el empleo de una técnica adecuada (Figura 7). Las moléculas gaseosas obtenidas pasan a la cámara de ionización en donde son ionizadas por un haz de electrones que incide sobre ellas generando iones fragmento característicos de cada molécula. Los iones son acelerados por un campo eléctrico y dirigidos al analizador de masas en donde son separados de acuerdo a su relación masa/carga. Esta pequeña corriente de iones es amplificada por el transductor y el equipo electrónico asociado para producir la señal de salida. Al graficar la corriente iónica de salida en función de la relación masa/carga, se obtiene el espectro de masas.

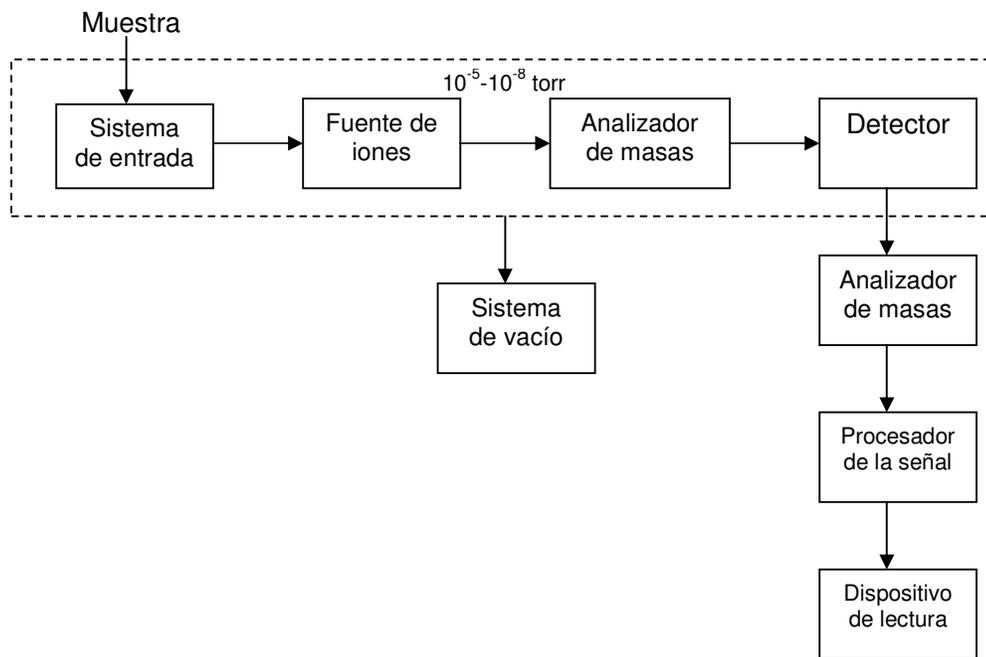


Figura 7. Esquema básico de un espectro de masas¹¹.

El espectro de masas da indicios de la masa del compuesto y su patrón de fragmentación, así como su abundancia. Estas evidencias permiten elucidar la estructura de los compuestos presentes¹¹.

2.8 Acoplamiento GC-EM

Una de las principales ventajas de la Espectrometría de Masas es que permite identificar especies atómicas y moleculares 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. La ventaja de los métodos cromatográficos consiste en permitir separar los compuestos en sus componentes moleculares. Sin embargo, una de las principales limitaciones es que con frecuencia no se identifican los componentes que se eluyen. Por las ventajas y limitaciones complementarias de la Cromatografía de Gases y la Espectrometría de Masas, 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 Cromatografía de Gases¹⁵.

2.9 Técnicas de preconcentración, concentración y análisis de los compuestos responsables del sabor, olor y aroma en alimentos y bebidas.

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 muchos atributos sensoriales como el sabor, olor, aroma, etc. Para su determinación, se han utilizado técnicas que involucran la extracción y concentración del analito para su posterior análisis:

- Técnicas de Cromatografía de Gases –“*head space*” ó espacio de cabeza (HS)
- Técnicas de Desorción Térmica Directa
- Técnicas de Extracción Líquido - Líquido (ELL)
- Técnicas de Microextracción en Fase Sólida (MEFS)

En este trabajo sólo se utilizó la técnica de MEFS para el análisis de las muestras de mezcal por lo que se describirá brevemente^{1,10}.

2.9.1 Microextracción en Fase Sólida (MEFS)

La Microextracción en Fase Sólida (MEFS) es una técnica relativamente nueva para la rápida extracción libre de disolventes o preconcentración de compuestos orgánicos volátiles o semivolátiles.

Utiliza el equilibrio de partición 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 Berladi y Pawliszyn¹³ para el análisis químico del agua. 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 Microextracción son independientes de la forma de la matriz; líquida, sólida y todos los gases pueden ser muestreados rápidamente. La MEFS es una técnica de equilibrio 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 partición, volumen de la muestra ó volumen del “*head space*” (espacio de cabeza), velocidad de agitación, adición de NaCl, pH de la matriz, tiempo de extracción, tiempo de desorción y temperatura de la extracción⁵.

Algunas de las ventajas son:

- Es una técnica de extracción libre de solventes
- Con sólo 3 tipos de materiales adsorbentes se cubre la totalidad 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 ppt, mucho más bajo que para las técnicas de "head space" (ppm) o "purga y trampa" (ppb).

2.9.2 El Dispositivo de la 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 No. 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 cromatógrafo de gases, 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 polidimetilsiloxanodivinilbenceno (PDMS/DVB) que es medianamente polar o la de poliacrilato (PA) que es polar¹⁵.

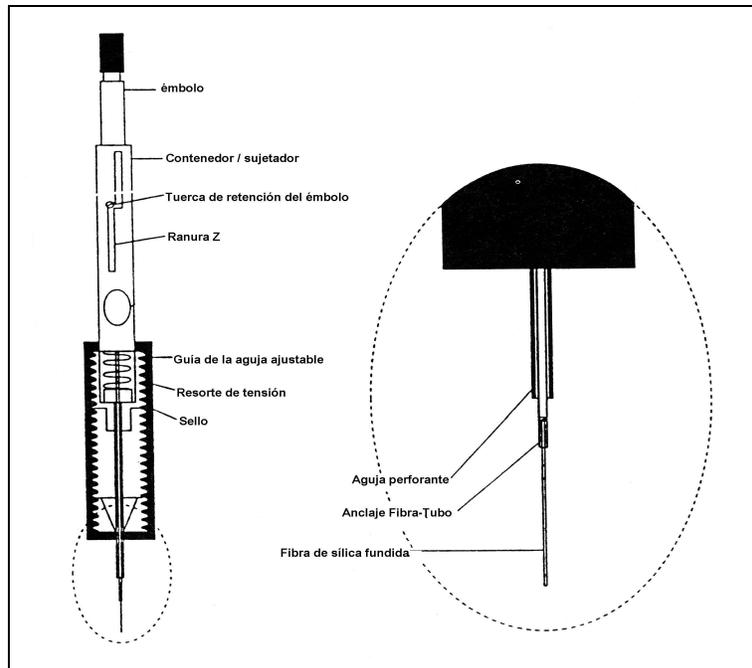


Figura 8. Representación del dispositivo de MEFS¹⁰.

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.

2.9.3 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 teflón (septum). Se coloca el vial en una parilla de agitación/calentamiento y se coloca una pequeña barra magnética que agitará 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 partición 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 cromatógrafo de gases permaneciendo

allí un tiempo determinado (tiempo de desorción) donde los analitos extraídos son desorbidos por acción del calor y transferidos a la columna para el análisis¹⁰.

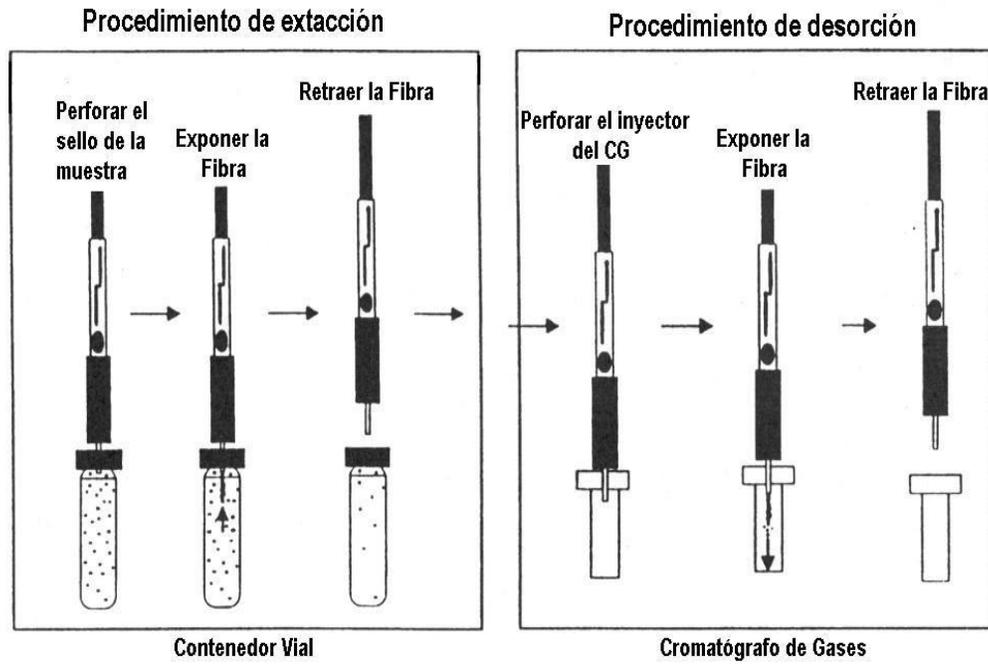


Figura 9. Secuencia de pasos para la MEFS¹⁰.

Existen dos modalidades principales de uso: la MEFS de inmersión directa y la MEFS de "head space" ó espacio de cabeza; 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.

3. Objetivos

3.1 General

- Determinar los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's) en diferentes muestras de mezcal.

3.2 Particulares

- Desarrollar y optimizar una metodología para la extracción, identificación y cuantificación de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's) en mezcal utilizando la técnica de Microextracción en Fase Sólida (HS-MEFS) seguida de Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM).
- Aplicar esta metodología para determinar los HAP's en diferentes muestras de mezcal de las regiones de Oaxaca, Guerrero, San Luis Potosí, Jalisco y Durango.

4. Desarrollo experimental

4.1 Muestras

Las muestras de mezcal analizadas (Tabla 4) se obtuvieron de los estados de Oaxaca, Guerrero, San Luis Potosí y Durango pertenecientes a variedades distintas de Agave.

Tabla 4. Muestras de mezcal analizadas.

Nombre del mezcal	Denominación	Origen	Especie	%v/v Etanol
El Señorío	Joven 100% Agave	Oaxaca	<i>A. angustifolia</i>	40
Agave Divino	Joven 100% Agave	Oaxaca	<i>A. angustifolia</i>	40
La Venencia	Joven 100% Agave	Oaxaca	<i>A. angustifolia</i>	45
Alipús	Joven 100% Agave	Oaxaca	<i>A. espadín</i>	42
Beneva	Añejo 100% Agave	Oaxaca	<i>A. angustifolia</i>	38
Mezcal Joven	Joven 100% Agave	Oaxaca	<i>A. angustifolia</i>	45
Laguna Seca	Joven 100% Agave	S. L. P.	<i>A. salmiana</i>	38
Real de Magueyes	Joven 100% Agave	S. L. P.	<i>A. salmiana</i>	42
Sanzekan	Joven 100% Agave	Guerrero	<i>A. cupreata</i>	42
Dioseño	Joven 100% Agave	Durango	<i>A. durangensis</i>	50

4.2 Materiales y Reactivos

- Estándares de HAP's: naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno y fenantreno-d10 (Chem Service, EE.UU.)

Tabla 5. Grado de pureza de los estándares de HAP's utilizados en el trabajo experimental.

Compuesto	Peso molecular	Fórmula mínima	Presentación	Pureza (%)
Naftaleno	128	$C_{10}H_8$	5 g	99.6
Acenaftileno	152	$C_{12}H_{10}$	5 g	85.1
Acenafteno	154	$C_{12}H_{10}$	5 g	99.5
Fluoreno	166	$C_{16}H_{10}$	5 g	99.0
Fenantreno	178	$C_{14}H_{10}$	5 g	99.0
Antraceno	178	$C_{14}H_{10}$	5 g	99.2
Fenantreno-d10	188	$C_{14}H_{10}$	5 g	98.0

- Tolueno R. A. (J. T. Baker, México)
- Acetona R. A. (J. T. Baker, México)
- Etanol anhidro R. A. (J. T. Baker, México)
- Agua destilada, grado analítico
- Viales de capacidad de 12 mL (SUPELCO, EE.UU.)
- Fibra de PDMS/DVB (polidimetilsiloxano/divinilbenceno) para la técnica de Microextracción en Fase sólida para uso de Cromatografía de Gases con un grosor de fase estacionaria de 65 μm , temperatura de acondicionamiento (260°C por 30 min.), temperatura recomendada de operación (200-270°C) y es estable en la mayoría de los disolventes orgánicos al interactuar con agua (SUPELCO, EE.UU.)
- Soporte para fibra de MEFS (SUPELCO, EE.UU.)
- Agitadores magnéticos de 1 cm
- Parrilla de agitación 04644-Series (Cole-Parmer, EE.UU.)

4.3 Metodología

4.3.1 Determinación de HAP's por HS-MEFS CG-EM

4.3.1.1 Preparación de disoluciones estándar de HAP's

Disolución estándar de HAP's. Se pesan aproximadamente 5 mg de cada estándar, se disuelven y se aforan a 5 mL con etanol anhidro (disolución 1 de concentración 1000 ppm). De la disolución 1 de cada estándar se toma una alícuota de 50 μL , se transfieren a un matraz aforado de 5 mL y se lleva al aforo con etanol anhidro (disolución 2 de concentración 10 ppm). De la disolución 2 se toma una alícuota de 500 μL , se transfieren a un matraz aforado de 5 mL y se lleva al aforo con etanol anhidro (disolución 3 de concentración 1 ppm). Las disoluciones 1, 2 y 3 se sellan con cinta teflón, se cierran perfectamente y se mantienen en refrigeración.

Disolución de Estándar Interno (EI). Se pesan aproximadamente 5 mg de fenantreno-d10, se disuelven y se aforan a 5 mL con etanol anhidro (disolución 4 de concentración 1000 ppm). De la disolución 4 se toma una alícuota de 50 μ L, se transfiere a un matraz aforado de 5 mL y se lleva al aforo con etanol anhidro (disolución 5 de concentración 10 ppm). De la disolución 5 se toma una alícuota de 500 μ L, se transfiere a un matraz aforado de 5 mL y se lleva al aforo con etanol anhidro (disolución 6 de concentración 1 ppm). Se sella con cinta teflón, se cierra perfectamente y se mantiene en refrigeración.

4.3.1.2 Preparación de curva patrón

Se preparó una curva patrón con siete niveles de concentración: 250, 100, 50, 25, 10, 5 y 2.5 ppb. La disolución 2 del estándar de HAP's de concentración 10 ppm se utilizó para preparar los estándares de HAP's de 250, 100 y 50 ppb y la disolución 3 del estándar de HAP's de concentración 1 ppm se utilizó para preparar los estándares de HAP's de 25, 10, 5 y 2.5 ppb (Tabla 6); utilizando como disolvente una disolución al 38% de etanol anhidro, ésta se preparó adicionando 19 mL de etanol anhidro y llevando al aforo de 50 mL con agua destilada.

Tabla 6. Curva patrón para la determinación de HAP's en mezcal; n = 3.

Curva patrón	Conc. estándar HAP's (ppm)	Vol. de alícuota	Conc. EI (ppm)	Vol. alícuota EI (μ L)	Vol. aforo (mL)	Conc. estándar HAP's (ppb)	Concentración EI (ppb)
1	10	125	1	50	5	250	30
2	10	50	1	50	5	100	30
3	10	25	1	50	5	50	30
4	1	125	1	50	5	25	30
5	1	50	1	50	5	10	30
6	1	25	1	50	5	5	30
7	1	12.5	1	50	5	2.5	30

4.3.1.3 Procedimiento para la determinación de HAP's en mezcal por HS-MEFS-CG-EM

En un frasco vial de 12 mL se coloca 1 mL de mezcal (a temperatura ambiente), se diluye con 4 mL de agua destilada y se adicionan 50 μ L de la disolución 6 de concentración 1 ppm del Estándar Interno (fenantreno-d10). Se coloca un agitador magnético de 1 cm y se cierra el vial con un tapón horadado y una septa de teflón. El vial se coloca en una parilla de agitación y se agita a 1200 rpm a temperatura ambiente durante 5 minutos (tiempo de estabilización). Una vez transcurridos los 5 minutos, se inserta el soporte de la fibra para MEFS (la fibra se acondicionó antes de usarla, y después se hizo un blanco de la misma para asegurar que estuviera limpia, es decir que no había ningún compuesto absorbido en ella que pudiera interferir en el análisis. El acondicionamiento de la fibra se realizó después de cada análisis), y se expone la fibra de PDMS/DVB en el modo “*head space*” ó espacio de cabeza durante 40 minutos (tiempo de extracción). Transcurrido el tiempo de extracción, se guarda la fibra de PDMS/DVB en el soporte, se inyecta en el cromatógrafo de gases donde se deja desorber por 2 minutos y se deja en el cromatógrafo para que esté lista para la siguiente extracción como lo muestra la Figura 10. Este procedimiento se hace para cada muestra de mezcal por triplicado ($n = 3$).

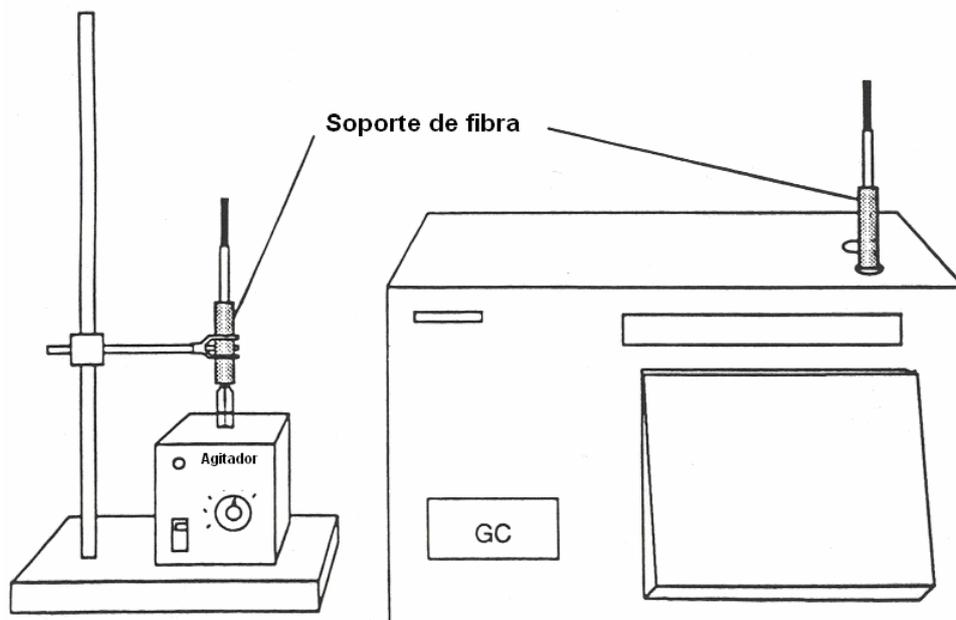


Figura 10. Esquema básico para la determinación de HAP's en mezcal por HS-MEFS-CG-EM¹³.

4.3.1.4 Procedimiento para la elaboración de la curva patrón

Para la elaboración de la curva patrón se lleva a cabo el mismo procedimiento del apartado anterior solamente que en vez de agregar al frasco vial 1 mL de mezcal, se agrega 1 mL de las disoluciones correspondientes mostradas en la Tabla 6 del apartado 4.3.1.2.

4.3.2 Condiciones de Microextracción en Fase Sólida (MEFS)

- Fibra PDMS/DVB
- 1 mL de estándar de HAP's o mezcal + 4mL de H₂O destilada
- Temperatura de extracción: Ambiente
- Tiempo de estabilización: 5 minutos con agitación a 1200 rpm
- Tiempo de HS-MEFS: 40 min.
- Tiempo de desorción: 2 min.

4.3.3 Condiciones cromatográficas

a) Cromatógrafo de Gases 5890A con inyector split/splitless, Detector de Ionización de Flama (DIF), columna Hewlett Packard (HP) y columna capilar de sílice fundida 5% fenil-95% dimetilpolisiloxano; 30 m de longitud x 0.25 µm, grosor de fase estacionaria x 0.32 mm, fase estacionaria; 19091J-413 HP-5 (Agilent Technologies, EE. UU.)

Temperatura del inyector = 250 °C en modo splitless (2 min.)

Temperatura del detector = 310 °C

Programa de temperatura: inicial de 60 °C isotérmica durante 1 min, incrementándose a 20 °C/min hasta 250 °C y aumentando a 10 °C min. hasta 300 °C durante 4.5 min.

Gas acarreador = Nitrógeno.

Tiempo de análisis = 20 min.

b) Cromatógrafo de Gases 5890 acoplado a un Detector Selectivo de Masas 5971 Hewlett Packard (HP) con inyector split/splitless y columna capilar de sílice fundida de 5% fenil-95% dimetilpolisiloxano; 30 m de longitud x 0.25 µm, grosor de fase estacionaria x 0.25 mm, fase estacionaria; Zebron ZB-5 (Phenomenex, EE. UU.)

Temperatura del inyector = 250°C en modo splitless (2 min.)

Programa de Temperatura = inicial de 40° C isotérmica durante 1 min, incrementándose a 5° C/min hasta 210° C y aumentando a 10° C min hasta 280° C.

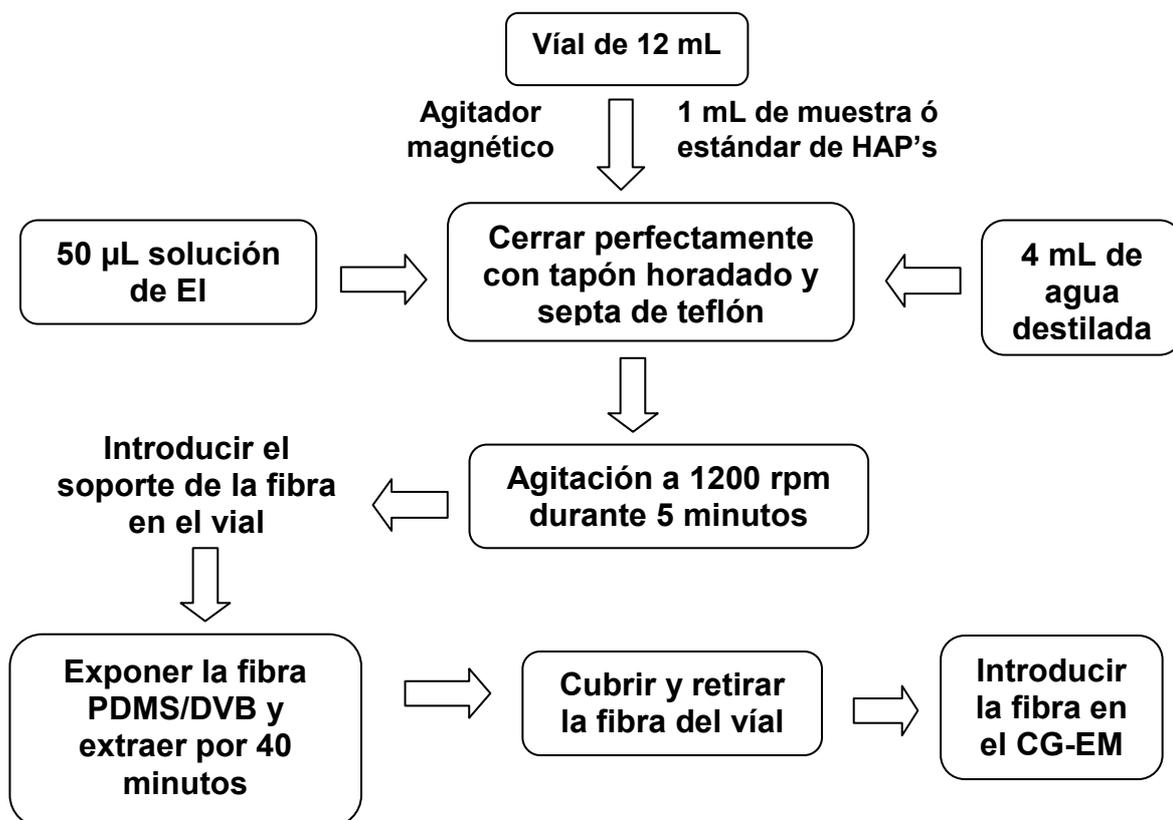
Gas acarreador = Helio con flujo de 2 mL/min.

Tiempo de análisis = 42 min.

Temperatura de línea de transferencia = 280° C

Los análisis se realizaron en el modo Barrido Total del Espectro (por sus siglas en inglés, SCAN) y posteriormente, en el modo Análisis Selectivo de Iones (por sus siglas en inglés, SIM).

4.3.4 Esquema analítico para la determinación de HAP's en mezcal por HS-MEFS CG-EM



5. Resultados y Discusión

5.1 Microextracción en Fase Sólida (MEFS)

Para la determinación de HAP's en mezcal se propuso la utilización de MEFS ya que es un método que se ha utilizado ampliamente para la determinación de contaminantes como pesticidas, plaguicidas, herbicidas y otros contaminantes de diferentes muestras ambientales y alimentarias⁶. Este método ofrece ventajas sobre otros métodos de extracción como Extracción en Fase Sólida, Extracción Líquido-Líquido ó Extracción de Fluidos Supercríticos¹³.

5.2 Optimización de la MEFS

La optimización del método de extracción es el punto más importante en el esquema analítico ya que de este depende la eficiencia del método y la confiabilidad de los resultados obtenidos.

Generalmente los parámetros para optimizar la MEFS son: volumen de la muestra ó volumen del “*head space*” ó espacio de cabeza, velocidad de agitación, tipo de fibra, adición de NaCl, pH de la matriz, tiempo de extracción, tiempo de desorción y temperatura de la extracción⁵.

En este estudio se seleccionaron los siguientes parámetros: adición de NaCl en la MEFS, el tiempo de desorción y el perfil del tiempo de extracción para obtener una extracción eficiente de los compuestos estudiados. Antes de realizar el estudio de la adición de NaCl, el tiempo de desorción y el perfil del tiempo de extracción se acondicionó la fibra, y después se hizo un blanco de la misma para asegurar que estuviera limpia, es decir que no hubiera ningún compuesto absorbido en ella que

podiera interferir en el análisis. El acondicionamiento de la fibra se realizó después de cada análisis como se indico en el apartado 4.3.1.3.

De igual forma se determinaron las condiciones cromatográficas óptimas que permitieron una resolución adecuada de los compuestos estudiados.

Considerando las características fisicoquímicas de la matriz (mezcal) donde se encuentran los HAP's se utilizó una disolución de etanol anhidro-agua destilada al 38% asemejando las condiciones reales en las que se encuentran estos compuestos en el mezcal¹⁰.

Para llevar a cabo la MEFS se le adiciona 1 mL de estándar de HAP's más 4 mL de agua destilada para disminuir la concentración del etanol, ya que las concentraciones altas de este compuesto dañan las fibras de microextracción¹⁵. Un mL de estándar de HAP's es suficiente para que se realice la MEFS, preconcentrando los compuestos al ser absorbidos por la fibra para su posterior análisis cromatográfico. La determinación de HAP's en mezcal se realizó a temperatura ambiente y sin modificación del pH.

a) Adición de NaCl en la MEFS

La adición de NaCl en la MEFS va a permitir saturar la disolución y así lograr modificar la fuerza iónica de la misma por lo tanto, el equilibrio de la disolución. Este fenómeno se presenta porque al encontrarse una mayor cantidad de NaCl disuelta en la disolución va a favorecer que los compuestos volátiles y semivolátiles se desplacen a la fase vapor, enriqueciéndose de ellos para su absorción en la fibra, que posteriormente es desorbida en el cromatógrafo de gases.

En estas pruebas se utilizaron los siguientes estándares de HAP's: naftaleno, acenafteno, fluoreno, fenantreno y antraceno en concentración de 5 ppm.

Condiciones de Microextracción en Fase Sólida (MEFS):

- Fibra PDMS/DVB
- 1 mL de estándar de HAP's + 4mL de H₂O destilada
- Temperatura de extracción: Ambiente
- Tiempo de estabilización: 5 minutos con agitación a 1200 rpm
- Tiempo de HS-MEFS: 40 min.
- Tiempo de desorción: 2 min.

Condiciones cromatográficas descritas en el inciso a) del apartado 4.3.3

Los resultados del efecto de la adición de NaCl en la MEFS al estándar de HAP's de 5ppm se presentan en la Tabla 7:

Tabla 7. Adición de NaCl a la técnica de MEFS.

<i>HAP's/Área</i>	<i>g NaCl</i>		
	<i>0</i>	<i>1.0</i>	<i>1.20</i>
<i>Naftaleno</i>	217768	49290	95938
<i>Acenafteno</i>	227570	49789.5	88189.88
<i>Fluoreno</i>	106763.1	26509.5	50486
<i>Fenantreno</i>	10841.5	3851.5	6829.5
<i>Antraceno</i>	17746	6960.5	17309

En el Gráfico 1 podemos observar que la mayor extracción de los HAP's se presenta al no adicionar NaCl a la MEFS (0 g); por esta razón para los siguientes estudios de la evaluación de los parámetros no se adicionó NaCl en la MEFS.

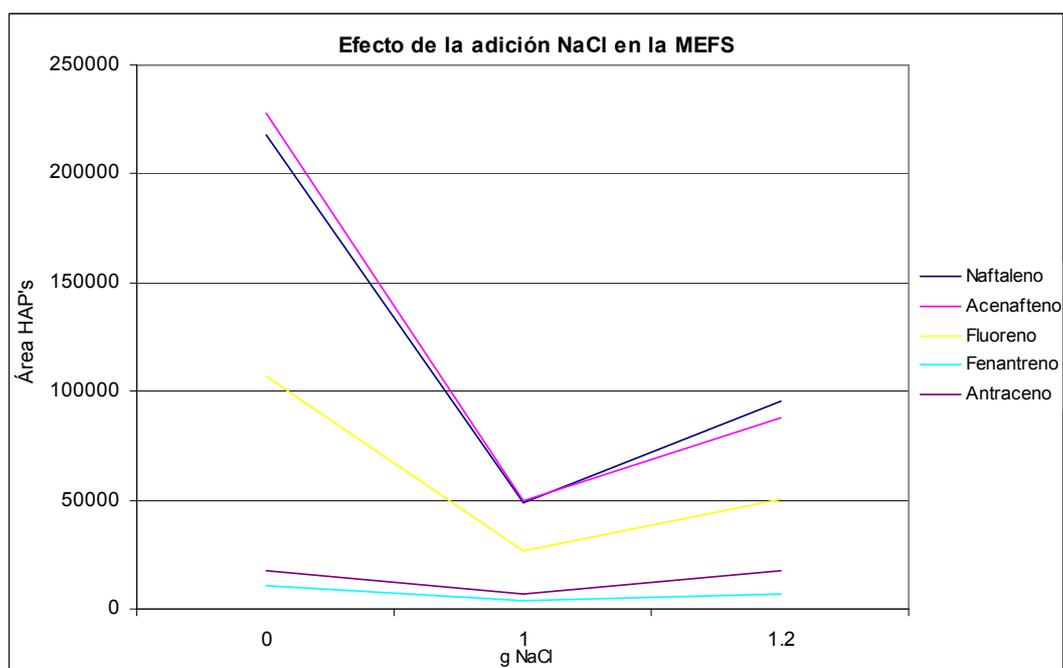


Gráfico 1. Efecto de la adición de NaCl del estándar de HAP's de 5 ppm.

b) Tiempo de desorción

En este parámetro se utilizaron las mismas condiciones de MEFS y cromatográficas a excepción del tiempo de *splitless* que fue el mismo que el tiempo de desorción. Se estudiaron 1 y 2 min. Los resultados se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Efecto de la modificación del tiempo de desorción

HAP's/Área	1 min.	2 min.
Naftaleno	16755	43515
Acenafteno	14038.12	29822
Fluoreno	9002.5	22430
Fenantreno	2539	9938
Antraceno	2329	11329

De acuerdo a los resultados de la Tabla 8 se observa que a un tiempo de desorción de 2 min. hubo una mayor extracción de los HAP's. Por lo tanto, para nuestro estudio no se adicionó NaCl a la MEFS y el tiempo de desorción fue de 2 min.

c) Perfil de tiempo de extracción

El perfil de tiempo de extracción es el tiempo en que la fibra en posición de “head space” ó espacio de cabeza está expuesta a la solución con el objetivo de extraer la mayor cantidad de muestra. Es un parámetro muy importante para esta técnica ya que permite tener una extracción eficiente de los HAP's. Es por esto, que se evaluaron 3 diferentes tiempos de extracción los cuales fueron 30, 40 y 50 min. Obteniéndose los siguientes resultados mostrados en la Tabla 9:

Tabla 9. Perfil de tiempo de extracción del estándar de HAP's

HAP's /Área	Tiempo de extracción (min.)		
	30	40	50
Naftaleno	75054	89312	68923
Acenafteno	53698	67900	41870
Fluoreno	24419	39313	26414
Fenantreno	18774	33673	28143
Antraceno	9011	17632	11335

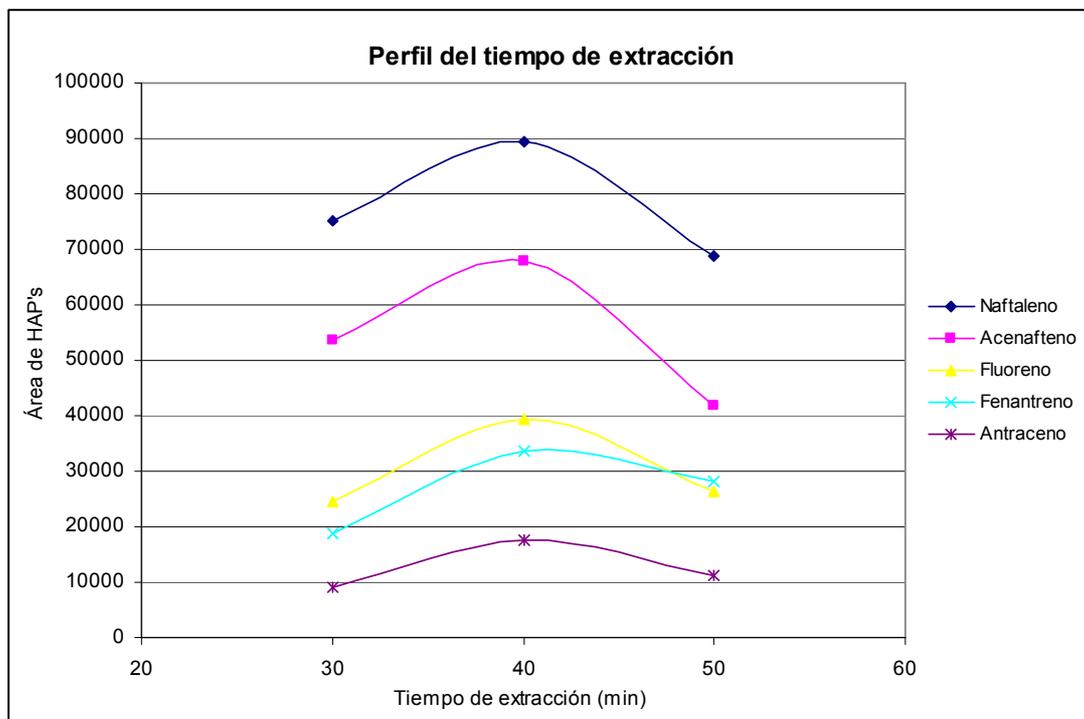


Gráfico 2. Perfil del tiempo de extracción: 30, 40 y 50 min.; estándar de HAP's a 5 ppm.

Algunos artículos⁵ han publicado que a mayor tiempo de análisis se tiene mayor extracción de los compuestos de menor peso molecular; sin embargo, como se observa en el Gráfico 2 a un tiempo de 40 min. se obtiene la mayor absorción de los HAP's en estudio. Mientras que a 50 min. empieza a disminuir la absorción, aparentemente en ese tiempo se alcanza un cierto equilibrio. Por lo tanto, a 40 min. se realizó la extracción.

En resumen, se presentan las condiciones óptimas para la extracción de HAP's utilizando Microextracción en Fase Sólida (MEFS):

- 0 g NaCl
- Tiempo de desorción de 2min.
- Tiempo de extracción: 40min.

Ya establecidas las condiciones de análisis para realizar la MEFS se llevó a cabo la identificación de los HAP's en el estándar de 5 ppm por Cromatografía de Gases, obteniéndose los siguientes resultados que se muestran en la Tabla 10:

Tabla 10. Tiempo de retención del estándar de HAP's de 5 ppm por CG*.

HAP's	Tiempo de retención (min.)
Naftaleno	5.39
Acenafteno	7.74
Fluoreno	8.42
Fenantreno	9.63
Antraceno	9.78

*Condiciones cromatográficas descritas en el inciso a) del apartado 4.3.3.

5.3 Identificación de HAP's en mezcal por HS-MEFS-CG-EM

Ya optimizadas las condiciones de MEFS, se procedió a trabajar en el equipo de CG-EM por el modo Barrido Total del Espectro (por sus siglas en inglés, SCAN) para analizar los mezcales y posteriormente, hacer la identificación y confirmación de los HAP's identificados en CG.

Cabe mencionar que para el análisis cualitativo de los HAP's en los mezcales en estudio se incluyó al acenaftileno (Acy) porque al hacer la identificación de los HAP's en los mezcales por CG-EM se encontraba presente en todas las muestras analizadas.

Posteriormente, para la identificación de los HAP's se realizó una extracción mediante la técnica HS-MEFS y después se analizó en el equipo de Cromatógrafo de Gases–Espectrometría de Masas (CG-EM) de una mezcla estándar a dos diferentes concentraciones para obtener los tiempos de retención y los iones fragmento y moleculares característicos de cada compuesto los cuales serían útiles para la identificación de los HAP's presentes en el mezcal.

Los espectros de masas con los que se identificaron los HAP's estudiados se encuentran en el apartado 7.2 de los anexos al final de este trabajo.

La Figura 11 muestra el cromatograma iónico Total del análisis por HS-MEFS-CG-EM de la mezcla estándar de HAP's a 5 ppm. Se observa buena resolución de los 6 HAP's estudiados en un tiempo total de análisis de aproximadamente 42 minutos.

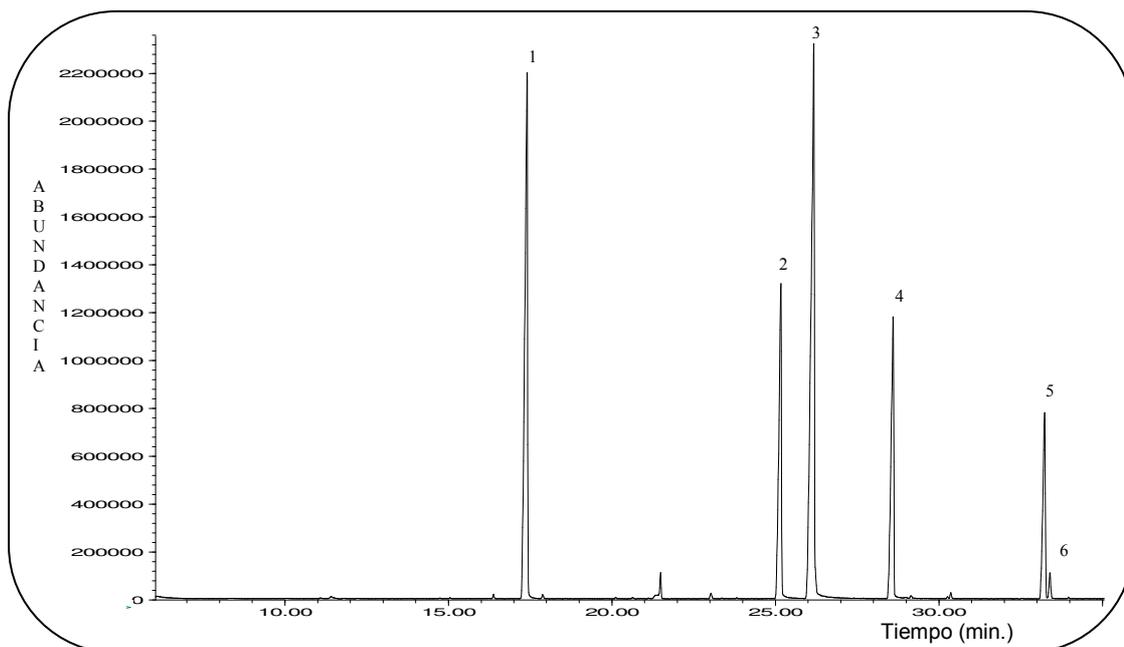


Figura 11. Cromatograma Iónico Total del Estándar de HAP's a 5 ppm. Identificación: 1. Naftaleno; 2. Acenaftileno; 3. Acenafteno; 4. Fluoreno; 5. Fenantreno y 6. Antraceno. Condiciones cromatográficas descritas en el inciso *b*) del apartado 4.3.3. Los análisis se realizaron en el modo Barrido Total del Espectro (por sus siglas en inglés, SCAN) y posteriormente en el modo Análisis Selectivo de Iones (por sus siglas en inglés, SIM).

En la Tabla 11 se presentan los tiempos de retención y los iones moleculares de cada uno de los HAP's identificados.

Tabla 11. HAP's identificados en los mezcales estudiados.

Compuesto	Tiempo de retención (min.)	Estructura	Fórmula mínima	Ion Molecular
Naftaleno	17.2		C ₁₀ H ₈	128
Acenaftileno	24.8		C ₁₂ H ₁₀	152
Acenafteno	25.9		C ₁₂ H ₁₀	154
Fluoreno	28.4		C ₁₆ H ₁₀	166
Fenantreno	33.1		C ₁₄ H ₁₀	178
Antraceno	33.4		C ₁₄ H ₁₀	178

En la Tabla 12 se presentan los HAP's identificados en cada una de las muestras de mezcal analizadas:

Tabla 12. Identificación cualitativa de HAP's en los mezcales analizados por HS-MEFS- CG-EM.

Mezcal	HAP's						2-etenil naftaleno
	Naftaleno	Acenaftileno	Acenafteno	Fluoreno	Fenantreno	Antraceno	
El Señorío	X	X	X	X	X	X	X
Agave Divino	X	X	X	X	X	X	X
La Venencia	X	X	X	X	X	X	X
Alipus	X	X	X	X	X	X	X
Mezcal Joven	X	X	X	X	X	X	X
Beneva	X	X	X	X	X	X	X
Laguna seca	X	X	X	X	X	X	X
Real magueyes	X	X	X	X	X	X	X
Sanzekan	X	X	X	X	X	X	X
Dioseño	X	X	X	X	X	X	X

Como podemos observar en la Tabla 12 se identificaron siete HAP's, los primeros seis que se analizaron (naftaleno, acenafteno, fluoreno, fenantreno y antraceno) están en el grupo de los 16 HAP's considerados, por la Agencia de Protección Ambiental de EE. UU. (EPA, por sus siglas en inglés), como contaminantes orgánicos prioritarios (POPs, por sus siglas en inglés); mientras que el séptimo HAP llamado *2-etenil naftaleno* no está considerado en el grupo de los 16 HAP's de la EPA pero, probablemente también se genera en la etapa de cocción de las piñas de Agave en el proceso de elaboración del mezcal.

Cabe mencionar que la identificación cualitativa de los HAP's en cada una de las muestras de mezcal no se puede saber si existe una relación con respecto al tiempo y temperatura de cocción de cada una de las piñas de Agave utilizadas para la elaboración del mezcal de cada región, al igual que el tipo de madera o combustible para llevar a cabo la cocción de las piñas de Agave, la forma del recipiente en el que se depositan las piñas para la cocción, ya que es trascendental recordar que la forma

en que se realiza la cocción con relación al tiempo y la temperatura es posible que se generen en mayor o menor cantidad los HAP's y se conserven hasta el producto terminado.

Además, es importante decir que el *2-etenil naftaleno* se identificó pero no se cuantificó ya que no pertenecía al grupo de los 16 HAP's de la EPA y además, no se contaba con el estándar en el laboratorio para realizar la cuantificación.

Lo que se observó, es que al identificarse los siete HAP's en cada una de las muestras de mezcal, a medida que aumentaba el área del *2-etenil naftaleno* disminuía el área del acenafteno. También, se observó que los intervalos de las áreas de los HAP's en cada una de las muestras fue muy amplio lo que se confirmó posteriormente en el análisis cuantitativo.

La Figura 12 muestra un ejemplo del cromatograma Iónico Total del análisis por HS-MEFS-CG-EM de la muestra de mezcal "*Dioseño*" proveniente del estado de Durango. Se observa una buena resolución de los 6 HAP's estudiados en un tiempo total de análisis de aproximadamente 42 minutos.

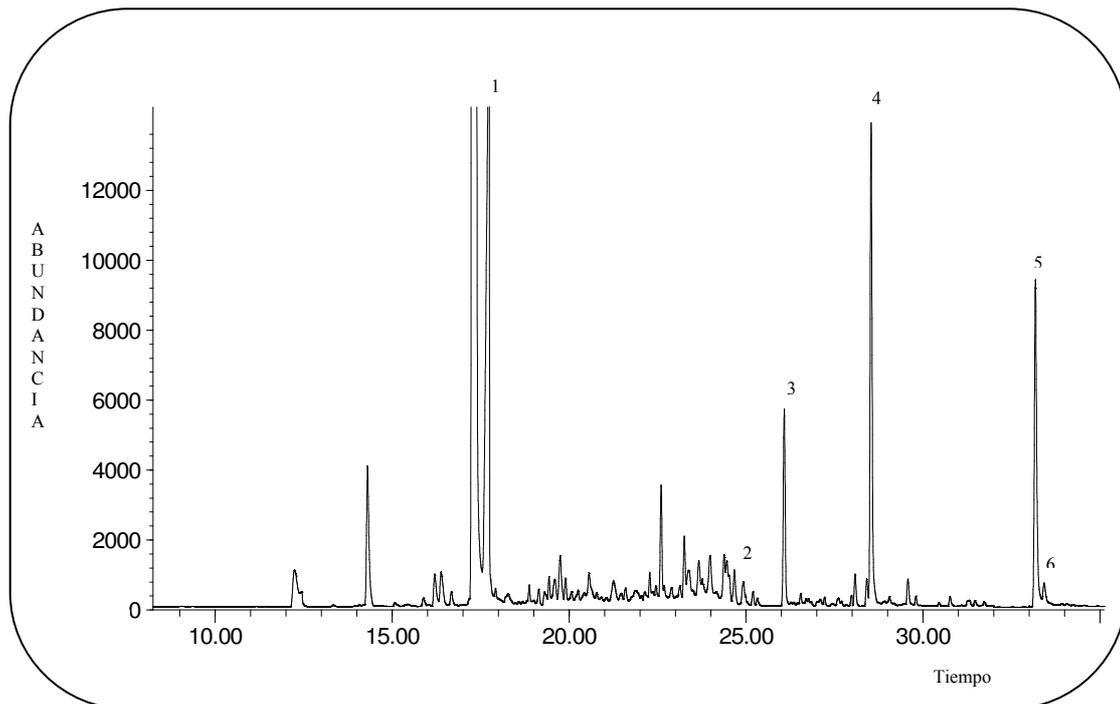


Figura 12. Cromatograma Iónico Total de la muestra de mezcal "Dioseño". Identificación: 1. Naftaleno; 2. Acenaftileno; 3. Acenafteno; 4. Fluoreno; 5. Fenantreno y 6. Antraceno. Condiciones cromatográficas descritas en el inciso *b*) del apartado 4.3.3. Los análisis se realizaron en el modo Barrido Total del Espectro (por sus siglas en inglés, SCAN) y posteriormente en el modo Análisis Selectivo de Iones (por sus siglas en inglés, SIM).

Los cromatogramas de los mezcales restantes se encuentran en el apartado 7.1 de los anexos al final de este trabajo.

5.4 Cuantificación de HAP's en mezcal por HS-MEFS-CG-EM

Para la cuantificación de los HAP's en los diferentes mezcales se preparó una curva patrón ($n = 3$) con siete niveles de concentración: 250, 100, 50, 25, 10, 5 y 2.5 ppb de los 6 HAP's utilizando los siguientes estándares: naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno y antraceno. Se utilizó al *Fenantreno-d10* como estándar interno.

Esta curva patrón se realizó por el modo barrido total (por sus siglas en inglés, SCAN) en donde se logró apreciar buena linealidad y un aceptable coeficiente de correlación, pero los límites de detección no era tan bajos por lo que no se lograba detectar los HAP's de concentración menor a 5 ppb.

Así que se probó la misma curva patrón en el modo Análisis Selectivo de Iones (por sus siglas en inglés, SIM) con el objetivo de aumentar la sensibilidad del equipo de Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (CG-EM) y disminuir los límites de detección y en consecuencia de cuantificación de los HAP's de más baja concentración.

En la curva patrón obtenida para los 6 HAP's por el modo SIM se obtuvo un coeficiente de correlación mayor a $r^2 = 0.9900$ como se muestra en los resultados de la Tabla 13:

Tabla 13. Resultados de la curva patrón (absoluta) de HAP's analizadas por HS-MEFS-GC-EM; n =3.

Compuesto	Pendiente	Ordenada	Coefficiente Correlación	Límite Detección	Límite Cuantificación
Naftaleno	69509	207934	0.9991	1 ppb	2.5 ppb
Acenaftileno	18104	-94865	0.9975	1 ppb	2.5 ppb
Acenafteno	23093	-100807	0.9951	1 ppb	2.5 ppb
Fluoreno	10195	-27365	0.9996	1 ppb	2.5 ppb
Fenantreno	3896.2	-187.33	0.9989	1 ppb	2.5 ppb
Antraceno	4562.1	2193.1	0.9988	1 ppb	2.5 ppb

Tabla 14. Resultados de la curva patrón (relativa) de HAP's analizadas por HS-MEFS-GC-EM; n = 3.

Compuesto	Pendiente	Ordenada	Coefficiente correlación	Límite Detección	Límite Cuantificación
Naftaleno	161.37	16.797	0.9991	1 ppb	2.5 ppb
Acenaftileno	42.029	-7.133	0.9974	1 ppb	2.5 ppb
Acenafteno	53.62	-7.57	0.9948	1 ppb	2.5 ppb
Fluoreno	23.665	-1.9965	0.9995	1 ppb	2.5 ppb
Fenantreno	9.0502	-0.0113	0.9991	1 ppb	2.5 ppb
Antraceno	10.586	0.2533	0.9981	1 ppb	2.5 ppb

Las gráficas de la curva patrón (relativa) se encuentran en el apartado 7.3 de los anexos al final de este trabajo.

De acuerdo a los resultados mostrados en las Tablas 13 y 14, a pesar de que el límite de cuantificación es 2.5 ppb, se logró cuantificar concentraciones menores en cada

una de las muestras de mezcal como es el caso del antraceno (<1 ppb); esto puede presentar un porcentaje de error en la cuantificación, pero el coeficiente de variación fue menor al 10% en el trabajo realizado (CV<10%).

Las Tablas 15 y 16 presentan los resultados de la cuantificación de los HAP's en las muestras de mezcal, se observa que hay una buena precisión del método con un coeficiente de variación bajo (CV<10%) para todas las muestras excepto para el naftaleno en el muestra del mezcal Agave Divino (10.17%) y el antraceno en la muestra del mezcal Real de Magueyes (10.13%), la desviación estándar fue baja para cada mezcal y también para cada HAP estudiado. La Tabla 15 muestra los resultados de la cuantificación de las muestras de mezcal utilizando la curva patrón (absoluta) para cada HAP (naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno y antraceno) expresadas en $\mu\text{g/L}$ (ppb), mientras que la Tabla 16 muestra los resultados de la cuantificación de las muestras de mezcal utilizando la curva patrón (relativa) usando el estándar interno (EI) para cada HAP expresadas en $\mu\text{g/L}$ (ppb).

Tabla 15. Concentración (ppb) de HAP's en mezcal analizadas por HS-MEFS-CG-EM; n =3.

Mezcales	Naftaleno	Acenaftileno	Acenafteno	Fluoreno	Fenantreno	Antraceno
El Señorío	8.70±0.02	6.83±0.04	7.94±0.06	12.27±0.20	26.54±0.77	1.01±0.03
Agave Divino	32.35±3.29	7.04±0.03	6.87±0.08	16.08±0.92	159.83±5.37	1.43±0.03
La Venencia	89.46±3.27	8.49±0.03	9.12±0.22	26.61±1.38	82.85±2.19	1.32±0.08
Alipús	70.81±0.97	8.18±0.04	6.85±0.07	8.82±0.83	45.37±1.16	1.55±0.04
Mezcal Joven	78.15±0.56	6.05±0.03	8.62±0.02	22.32±0.86	45.30±1.31	1.49±0.03
Beneva	120.10±0.66	6.23±0.02	11.34±0.35	52.25±0.79	134.70±1.15	16.09±0.21
Laguna Seca	12.31±0.42	7.66±0.02	14.36±0.11	17.51±0.26	59.67±2.71	7.14±0.26
Real Magueyes	1.58±0.05	9.37±0.03	7.30±0.06	9.4±0.07	43.18±2.13	4.45±0.45
Sanzekan	164.37±2.57	7.25±0.02	12.01±0.14	38.33±0.91	91.32±1.50	3.82±0.12
Dioseño	235.85±6.24	8.67±0.02	13.15±0.24	55.25±1.06	119.85±1.80	8.07±0.12

Tabla 16. Concentración (ppb) de HAP's en mezcal analizadas por HS-MEFS-CG-EM; n =3.

Mezcales	Naftaleno	Acenaftileno	Acenafteno	Fluoreno	Fenantreno	Antraceno
El Señorío	8.30±0.31	6.64±0.04	7.72±0.14	11.9±0.36	25.87±0.35	0.74±0.04
Agave Divino	31.82±2.57	6.88±0.09	6.72±0.02	15.79±0.64	158.27±10.70	1.18±0.06
La Venencia	89.20±4.64	8.33±0.07	8.98±0.31	26.44±1.83	82.68±3.66	1.08±0.07
Alipús	71.13±1.96	8.05±0.10	6.74±0.08	8.70±0.16	45.61±1.68	1.33±0.08
Mezcal Joven	77.16±2.05	5.89±0.03	8.44±0.07	21.96±0.68	44.77±0.42	1.24±0.07
Beneva	116.99±2.71	6.06±0.03	11.03±0.18	50.89±0.49	131.35±2.10	15.47±0.55
Laguna Seca	12.64±0.15	7.59±0.05	14.54±0.09	17.81±0.21	61.41±1.69	7.14±0.20
Real Magueyes	1.52±0.15	9.29±0.16	7.22±0.16	9.36±0.22	43.81±1.44	4.30±0.51
Sanzekan	161.06±1.25	7.07±0.02	11.73±0.26	37.5±0.32	89.55±3.00	3.50±0.16
Dioseño	235.10±10.29	8.52±0.06	12.99±0.13	54.94±0.35	119.42±1.90	7.81±0.31

Los Gráficos 3 y 4 muestran la concentración (ppb) de las diez muestras de mezcal incluyendo la desviación estándar de cada uno de los HAP's estudiados:

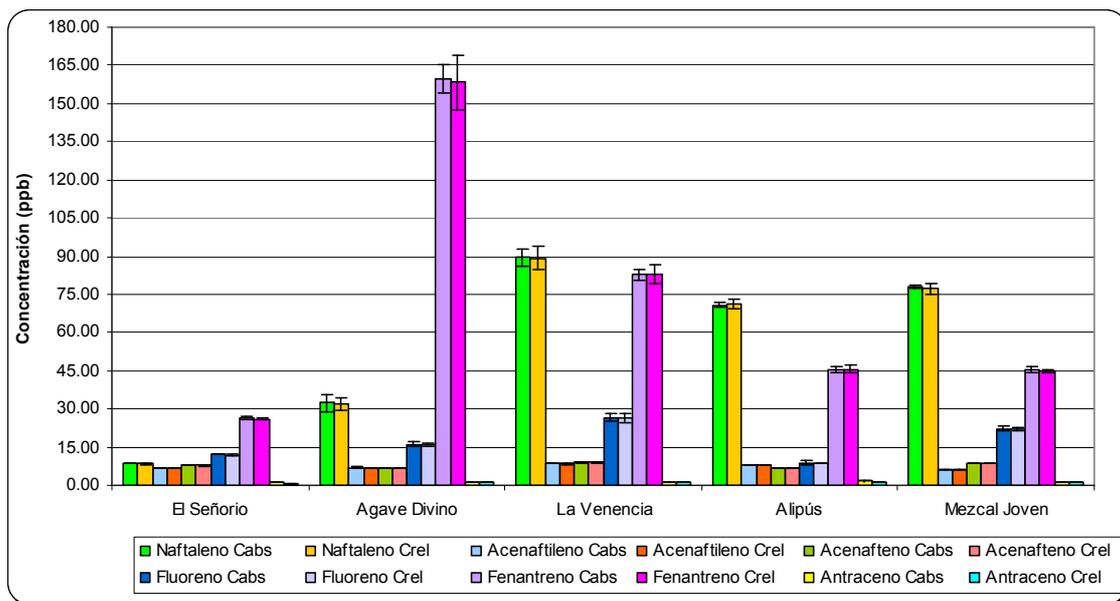


Gráfico 3. Concentración de las muestras de mezcal.

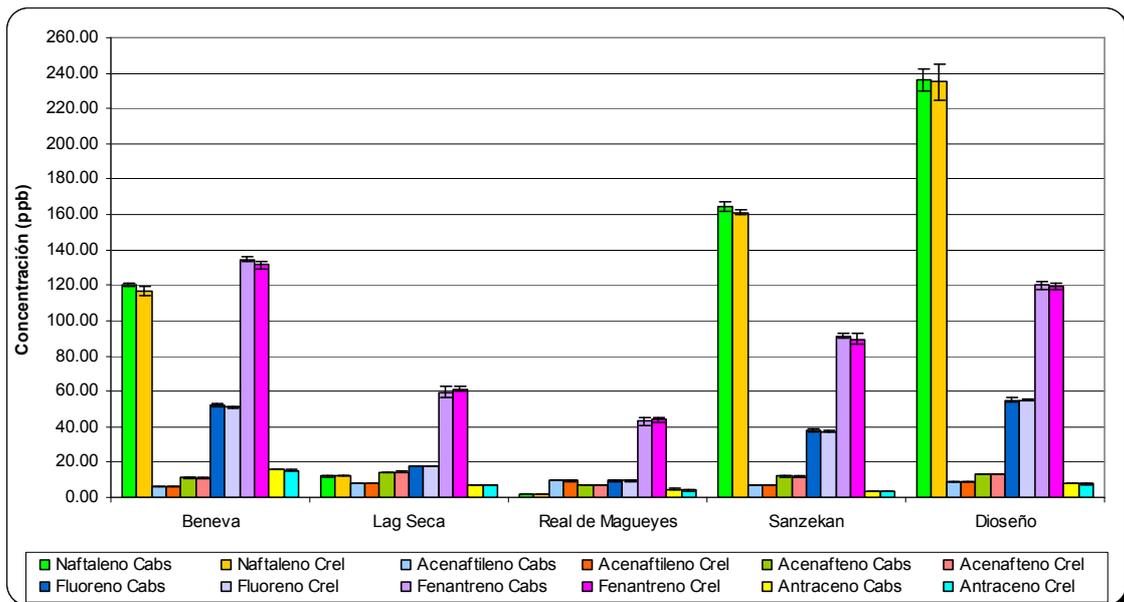


Gráfico 4. Concentración de las muestras de mezcal.

Haciendo una comparación de los Gráficos 3 y 4 se puede observar que no hay diferencia significativa con relación a las concentraciones de la curva patrón absoluta y relativa de cada HAP estudiado. También se puede decir, que al no existir una diferencia significativa en el cálculo de concentración, se podría utilizar cualquiera de las dos curvas para llevar a cabo la cuantificación de los mezcales.

Como se observa en las Tablas 15 y 16 y los Gráficos 3 y 4, los resultados de la cuantificación de las muestras de mezcal son muy similares; así que a partir de esta parte del trabajo, sólo se tomaron en cuenta los resultados de la cuantificación con la curva patrón relativa para discutir la parte final de este trabajo.

Con los resultados anteriores se obtuvieron los Gráficos 5 y 6 que permitieron analizar mejor los resultados y hacer una discusión más detallada de los HAP's identificados en cada uno de los mezcales estudiados.

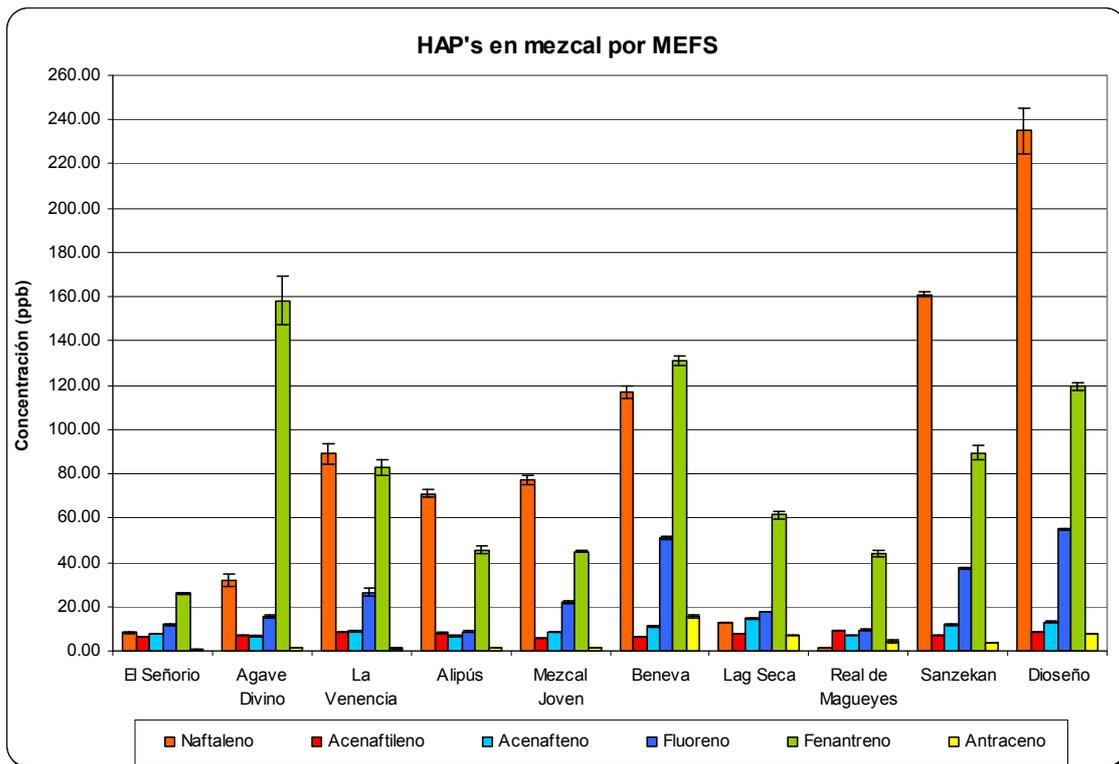


Gráfico 5. Concentración (ppb) de HAP's en mezcal analizada por HS-MEFS-CG-EM.

En el Gráfico 5 se observa que el compuesto de mayor concentración en las muestras de mezcal: La Venencia, Alipús, Mezcal Joven, Sanzekan y Dioseño es el naftaleno en concentraciones entre 10-220 ppb. Mientras que en las muestras de mezcal: El Señorío, Agave Divino, Beneva, Laguna Seca y Real de Magueyes fue el fenantreno encontrándose en un intervalo de concentración entre 20-150 ppb. seguido del fluoreno en concentraciones entre 8-50 ppb. Para el caso del acenafitileno y el acenafteno sus concentraciones son muy similares en todas las muestras de mezcal, en las que se determinaron concentraciones entre 5-15 ppb. Por último, el antraceno es el compuesto de más baja concentración en todos los mezcales (1-5 ppb) a excepción de las muestras de mezcal: Real de Magueyes y Beneva que tenían concentraciones de 8 y 16 ppb respectivamente.

Se determinó que los compuestos mayoritarios en todas las muestras de mezcal son el naftaleno, fenantreno y el fluoreno.

Otro punto muy importante que se debe mencionar es que no hay ninguna semejanza o relación entre las muestras de mezcal ya que hay una gran variación en la concentración de los HAP's entre cada muestra. La única coincidencia en todos los casos es que se encontraron los 6 HAP's estudiados en este trabajo y no se encontraron HAP's de mayor peso molecular o de mayor número de anillos de acuerdo a un estudio previamente realizado en el laboratorio¹.

El Gráfico 6 muestra la concentración total de HAP's en cada muestra de mezcal analizada.

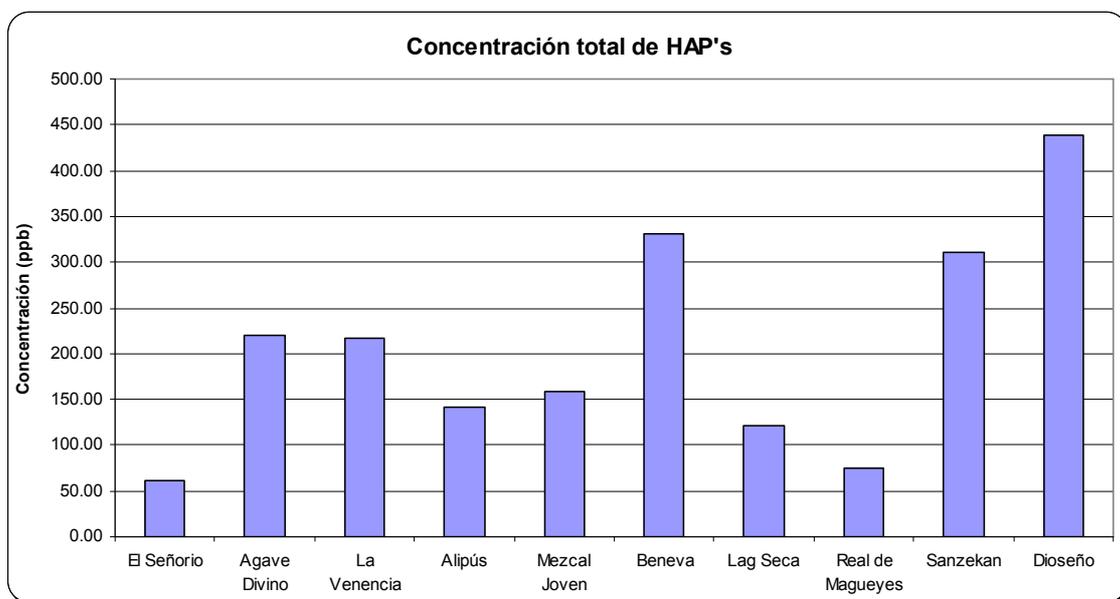


Gráfico 6. Concentración total de HAP's analizados por HS-MEFS-CG-EM.

En el Gráfico 6 se observa que la concentración total de HAP's en cada una de las muestras de mezcal tienen un intervalo amplio de concentración entre 63-440 ppb. Estos datos nos indican nuevamente que no hay una relación de acuerdo al tipo de Agave ya que las muestras provienen de diferentes regiones del país y por consecuencia, de diferentes tipos de Agave. Por ejemplo, las primeras muestras de mezcal proviene de la especie *A. angustifolia* (El Señorío, Agave Divino, La Venencia, Alipús y Beneva), el Mezcal Joven es una mezcla de agaves silvestres de la región de

Oaxaca), el mezcal Laguna Seca y Real de Magueyes provienen del *A. salmiana*, el mezcal Sanzekan proviene del *A. cupreata* y el mezcal Dioseño del *A. durangensis*.

También es importante decir, como ya se mencionó, que tampoco se puede saber si existe una relación con respecto al tiempo y temperatura de cocción de cada una de las piñas de Agave utilizadas para la elaboración del mezcal de cada región, al igual que el tipo de madera o combustible para llevar a cabo la cocción de las piñas de Agave, la forma del recipiente en el que se depositan las piñas para la cocción, ya que es trascendental recordar que la forma en que se realiza la cocción con relación al tiempo y la temperatura es posible que se generen en mayor o menor cantidad los HAP's y se conserven hasta el producto terminado.

Debido a que no existe una Norma Oficial Mexicana (NOM) para regular la concentración de HAP's en bebidas y alimentos, se consideró la legislación que existe actualmente para los HAP's tanto en agua (0.2 µg/L) como en alimentos ahumados, rostizados, horneados ó asados dictados por Normas Internacionales y la EPA tanto en Europa (1.0 µg/kg producto) y EE. UU. 0.03 (µg/kg producto) respectivamente; la concentración de los HAP's determinada en las muestras de mezcal rebasa los límites permisibles establecidos en estas normas, pero hay que tomar en cuenta que estos límites permisibles son para el grupo de HAP's de mayor masa molecular o mayor número de anillos como el benzo[a]pireno, fluoranteno, 3,4-benzofluoranteno, 11,12-benzofluoranteno, 3,4-benzopireno, 1,12-benzoperileno e indeno [1,2,3-cd]pireno, los cuales no se identificaron en este trabajo.

De acuerdo a las concentraciones totales determinadas de los HAP's en cada una de las muestras de mezcal en este trabajo se puede decir que probablemente no presentan un problema de tipo toxicológico y por lo tanto, un riesgo para la salud humana en el consumo de este producto ya que se cuantificaron los HAP's de más

baja masa molecular y los que dictan las normas internacionales son los HAP's de alta masa molecular como el benzo[a]pireno, fluoranteno, 3,4-benzofluoranteno, 11,12-benzofluoranteno, 3,4-benzopireno, 1,12-benzoperileno e indeno [1,2,3-cd]pireno, que son más difíciles de degradar por el metabolismo humano como se mencionó en los antecedentes. Adicionalmente, se recomienda que se profundice más en el tema y se hagan más estudios de los efectos toxicológicos agudos (determinación de DL₅₀), subagudos y crónicos de los HAP's (naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno y antraceno) en el organismo humano y su persistencia en diferentes concentraciones con respecto a su presencia en alimentos frescos procesados y bebidas alcohólicas y no alcohólicas.

Por último, se debe agregar que la generación de HAP's no es un problema ambiental único del proceso de elaboración del mezcal, sino que también se puede encontrar en una variedad de alimentos frescos y procesados de origen animal y vegetal que consumimos diariamente (Tabla 17) y la legislación actual en especial, México debería de poner más atención para establecer los límites permisibles ya sea en el proceso de elaboración de los mismos o incluso en los métodos de conservación y post-cosecha mediante la iniciativa de un proyecto de Norma Oficial Mexicana. En la Tabla 17 se muestra la concentración de un grupo de HAP's encontrados en alimentos (frescos y procesados) y bebidas alcohólicas y no alcohólicas¹².

Tabla 17. HAP's encontrados en un grupo de alimentos y beidas¹².

Alimento	Fla	Pyr	BaA*	Cry*	BbF*	BkF*	BaP*	DahA*	BghiP	HAP ^a	CHAP ^b
Vegetales											
Coliflor	2.45 ^c	ND ^d	0.07	0.24	0.03	ND	0.01	ND	ND	2.79	0.34
Azúcar de caña	5.41	0.69	0.25	3.66	0.92	0.14	0.10	ND	0.05	11.21	5.06
Calabaza	3.60	ND	2.39	1.65	0.42	0.10	0.45	0.29	0.01	8.91	5.30
Lechuga	0.10	0.43	0.96	0.84	0.12	0.08	0.01	0.06	0.02	2.62	2.06
Tomate	0.10	0.40	0.01	0.13	0.01	ND	ND	ND	ND	0.63	0.14
Papa	0.05	0.42	0.03	ND	0.02	0.01	ND	ND	ND	0.52	0.05
Frutas											
Manzana	2.36	3.46	0.33	ND	0.26	0.08	0.53	1.23	0.02	8.27	2.43
Cáscara de manzana	0.26	0.45	0.09	ND	0.30	0.20	0.06	0.99	ND	2.35	1.64
Cítricos	0.05	ND	ND	1.48	0.08	0.03	0.03	ND	ND	1.67	1.62
Cereales											
Pan	0.85	ND	0.31	1.88	0.04	0.02	0.02	ND	0.01	3.12	2.26
Pasta	3.95	ND	0.03	1.88	0.04	0.02	0.02	ND	ND	5.93	1.98
Arroz/Maíz	0.12	ND	0.06	0.52	0.03	0.03	0.02	0.07	ND	0.86	0.73
Pescado cocinado											
Trucha	0.43	ND	0.14	0.91	0.13	0.01	0.03	0.11	0.91	1.75	1.32
Bacalao	0.02	ND	0.12	ND	0.26	0.03	0.01	0.15	ND	0.58	0.57
Bacalao seco	0.38	ND	0.08	ND	0.03	0.02	0.03	ND	ND	0.53	0.15
Lácteos											
Leche y yogur	0.47	ND	0.68	ND	0.15	0.02	0.34	ND	ND	1.65	1.18
Queso	0.46	ND	0.15	ND	0.09	0.02	0.01	0.26	ND	0.99	0.53
Carne											
De res frita	1.00	0.01	2.22	ND	0.66	0.14	0.61	1.00	0.01	5.66	4.64
De puerco frita	0.55	5.38	0.43	ND	0.65	0.04	0.04	0.20	ND	7.27	1.35
De conejo frita	2.06	ND	0.13	1.18	0.03	0.02	0.02	ND	ND	3.43	1.37
Pollo	0.17	ND	0.18	ND	0.01	0.02	0.02	0.20	ND	0.60	0.43
Hígado de res	0.29	ND	0.14	ND	0.24	0.05	0.03	0.16	ND	0.90	0.61
Carne curada	2.68	ND	0.62	ND	0.05	0.02	0.03	ND	ND	3.41	0.72
Huevos											
Carne asada	0.10	ND	0.03	ND	0.44	0.01	0.02	ND	ND	0.59	0.49
Res	10.81	1.27	0.53	24.66	1.20	0.61	1.45	1.53	0.06	42.11	29.98
Puerco	1.85	5.29	0.50	5.36	0.40	0.08	0.12	ND	0.01	13.60	6.46
Aceites y grasas											
Aceite de oliva	0.17	ND	0.03	0.38	0.26	0.06	0.10	ND	ND	1.01	0.84
Mantequilla	0.15	1.77	0.67	ND	0.02	0.03	0.02	0.02	ND	2.67	0.75
Chocolate	8.36	ND	0.51	ND	0.48	0.11	0.33	0.73	0.01	10.53	2.15
Bebidas											
Vino	0.09	ND	ND	ND	0.04	0.01	0.01	0.06	ND	0.20	0.12
Cerveza	0.05	ND	0.11	ND	0.02	0.02	0.03	0.08	ND	0.31	0.26
Café	1.18	ND	0.10	ND	0.08	0.02	0.01	0.04	0.01	1.45	0.25
Pizza^e	0.18	0.58	9.11	3.01	0.04	0.02	0.03	0.07	0.06	13.10	12.28

^aSuma de los nueve HAP's, ^bSuma de los seis HAP's considerados como carcinógenos por la EPA (marcados con asterisco), ^cValores expresados en ng/g producto, ^dND – no detectado, ^ePizza preparada en un horno de piedra.

6. Conclusiones

- Se cumplieron los objetivos planteados en este trabajo, identificando y cuantificando los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's) presentes en el mezcal mediante HS-MEFS-CG-EM.
- Se desarrolló una metodología basada en la técnica de HS-MEFS-CG-EM para la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's) en 10 muestras de mezcal, identificando 7 de ellos y cuantificando 6 en un intervalo amplio de concentración. La reproducibilidad del método es aceptable encontrándose un $CV < 10\%$.
- El análisis de las 10 muestras de mezcal permitió identificar y cuantificar: naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno y antraceno obteniendo límites de detección y cuantificación confiables que fueron de 1 ppb y 2.5 ppb respectivamente.
- Se comprobó que la técnica de MEFS presenta ventajas muy importantes con respecto a otras técnicas de extracción 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 obtener resultados confiables.
- Se logró optimizar la técnica de MEFS de acuerdo a los parámetros de adición de NaCl, el tiempo de desorción y posteriormente, el perfil del tiempo de extracción para el análisis cromatográfico de las muestras de mezcal.

- La concentración total de HAP's en todas las muestras de mezcal tienen un intervalo amplio de concentración que va de 63-440 ppb. Con estos datos no podemos asegurar que la generación de los HAP's en el proceso de elaboración del mezcal depende de un solo factor como puede ser el tipo de Agave, el tiempo y temperatura de cocción de las piñas de Agave utilizadas, el tipo de madera o combustible para llevar a cabo la cocción de las piñas ó la forma del recipiente en el que se deposita las piñas para la cocción.
- Para la normatividad se llegó a la conclusión de que es urgente comenzar por crear una iniciativa de proyecto de Norma Oficial Mexicana para regular el procedimiento, el tiempo y la temperatura de cocción de las piñas de Agave en el proceso de elaboración del mezcal y así convertir el proceso estandarizado y por consiguiente tener un mejor control de calidad del producto terminado con relación a la generación de los HAP's.

7. Anexos

7.1 Cromatogramas

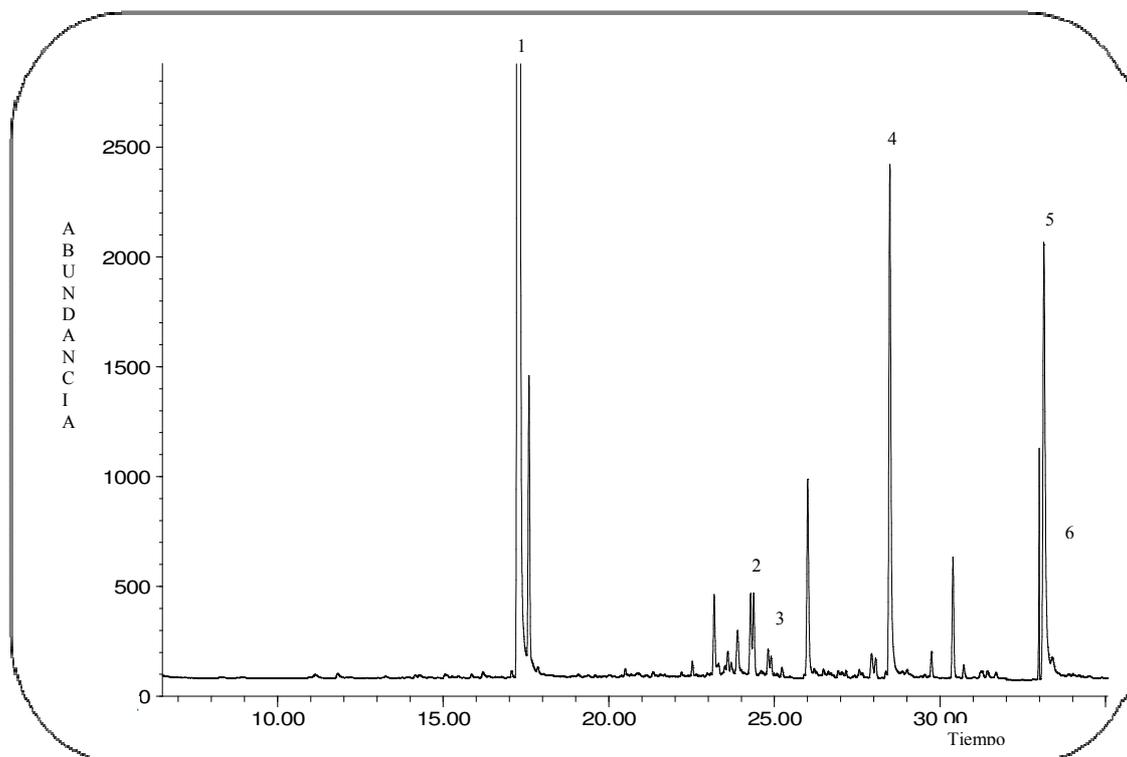


Figura I. Cromatograma Iónico Total del análisis por MEFS del mezcal "El Señorío".
Identificación: 1. Naftaleno; 2. Acenaftileno; 3. Acenafteno; 4. Fluoreno; 5. Fenantreno y 6. Antraceno.
Condiciones cromatográficas descritas en el inciso *b*) del apartado 4.3.3. Los análisis se realizaron en el modo Barrido Total del Espectro (por sus siglas en inglés, SCAN) y posteriormente en el modo Análisis Selectivo de Iones (por sus siglas en inglés, SIM).

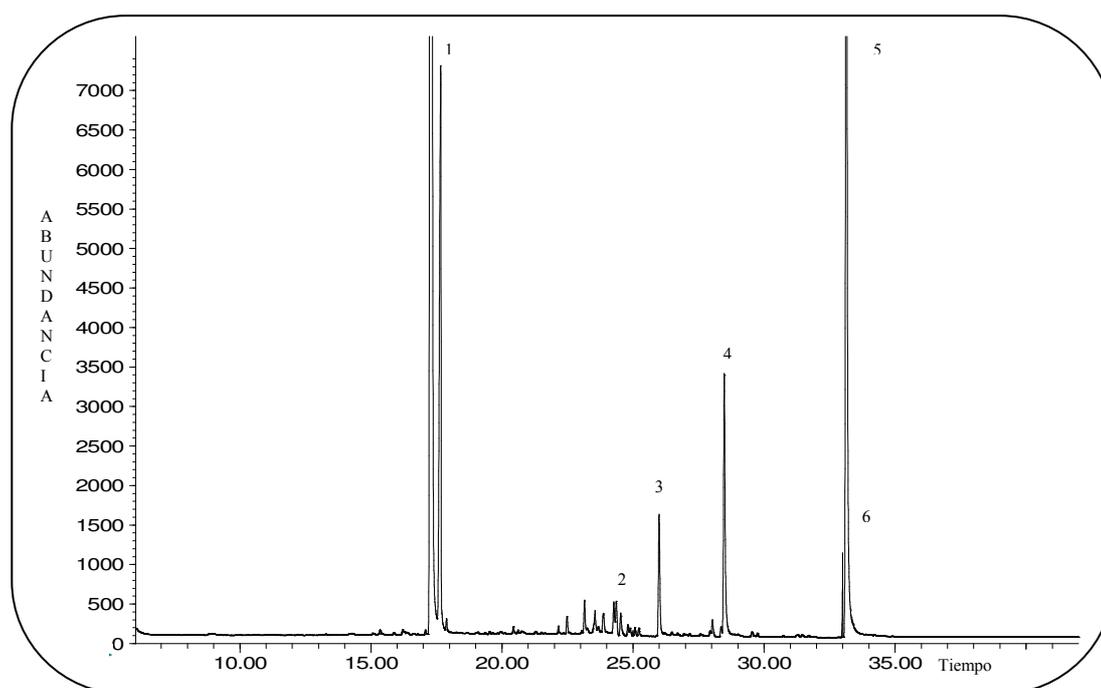


Figura II. Cromatograma Iónico Total del análisis por MEFS del mezcal "Agave Divino".
Condiciones cromatográficas e identificación se indican en la Figura I.

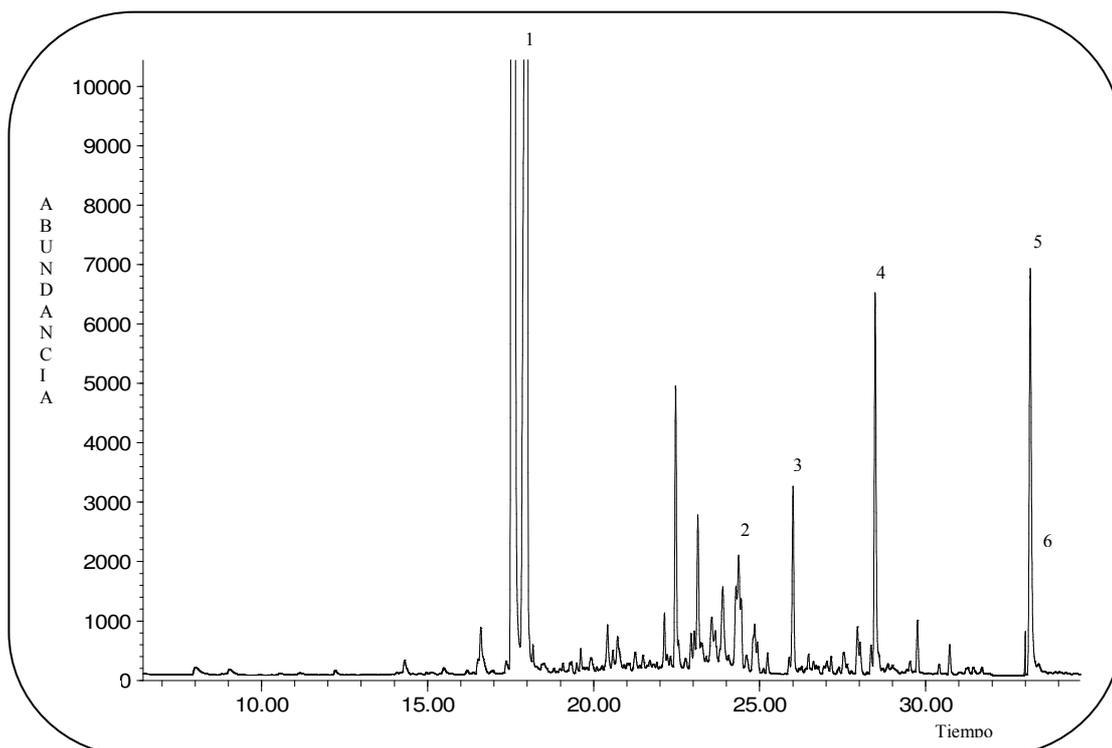


Figura III. Cromatograma Iónico Total del análisis por MEFS del mezcal "La Venencia". Condiciones cromatográficas e identificación se indican en la Figura I.

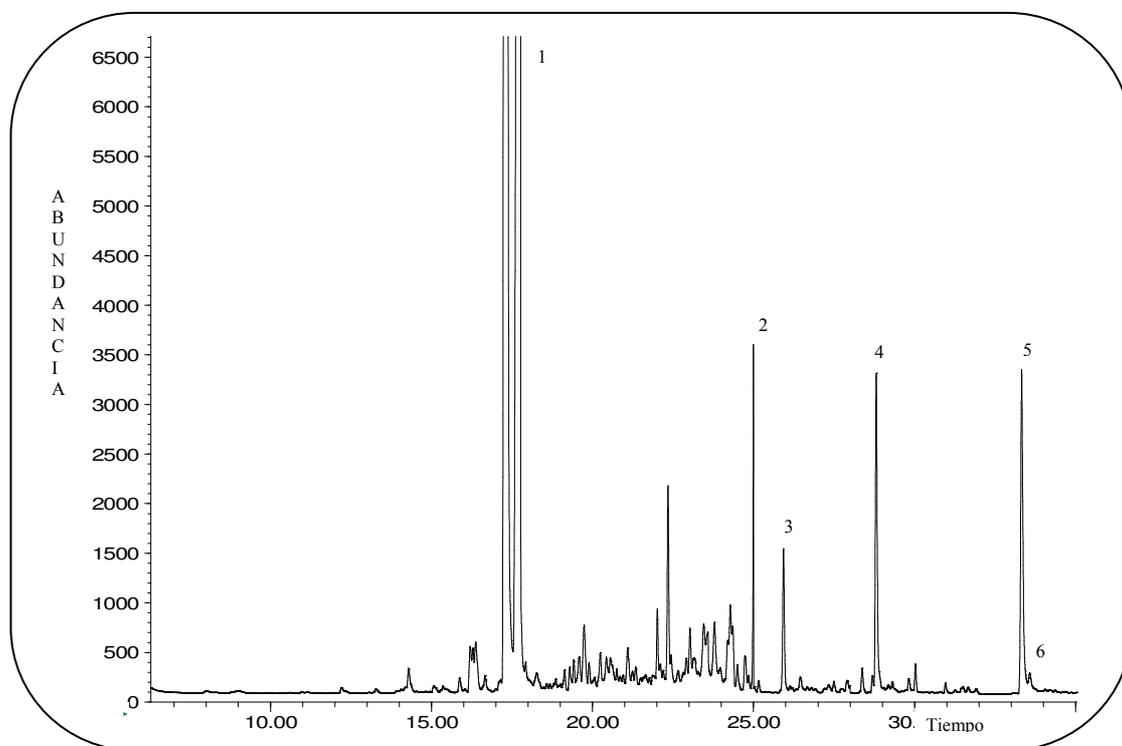


Figura IV. Cromatograma Iónico Total del análisis por MEFS del mezcal "Alipús". Condiciones cromatográficas e identificación se indican en la Figura I.

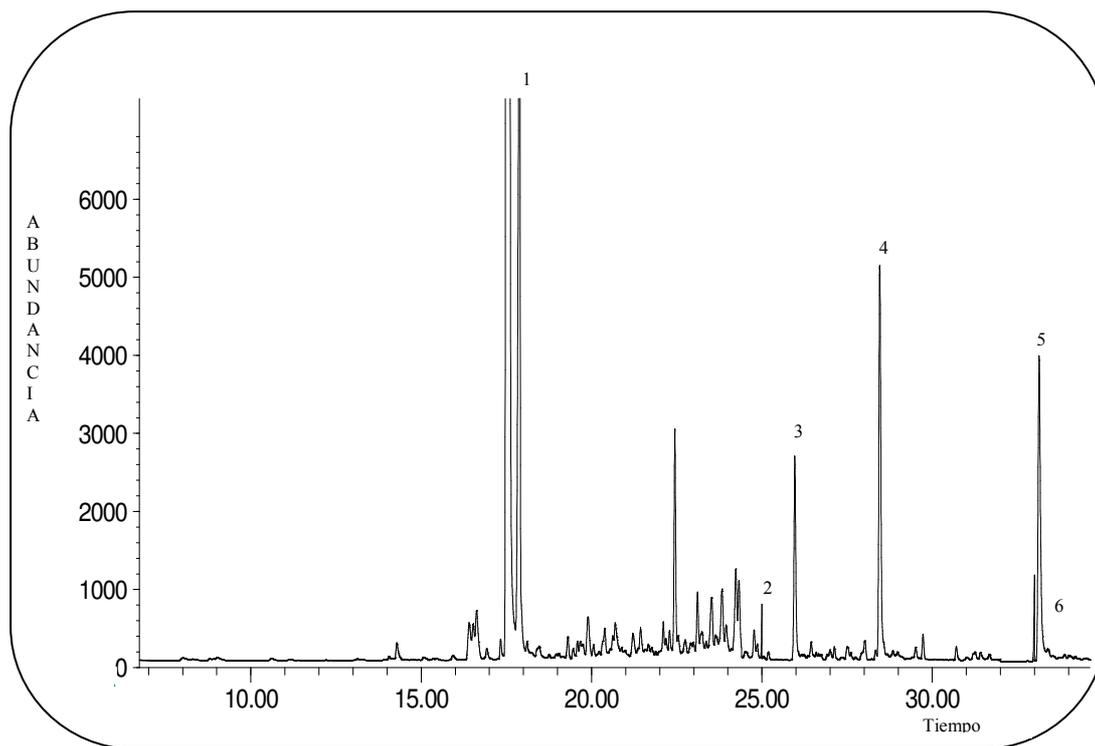


Figura V. Cromatograma Iónico Total del análisis por MEFS del mezcal "Mezcal Joven".
Condiciones cromatográficas e identificación se indican en la Figura I.

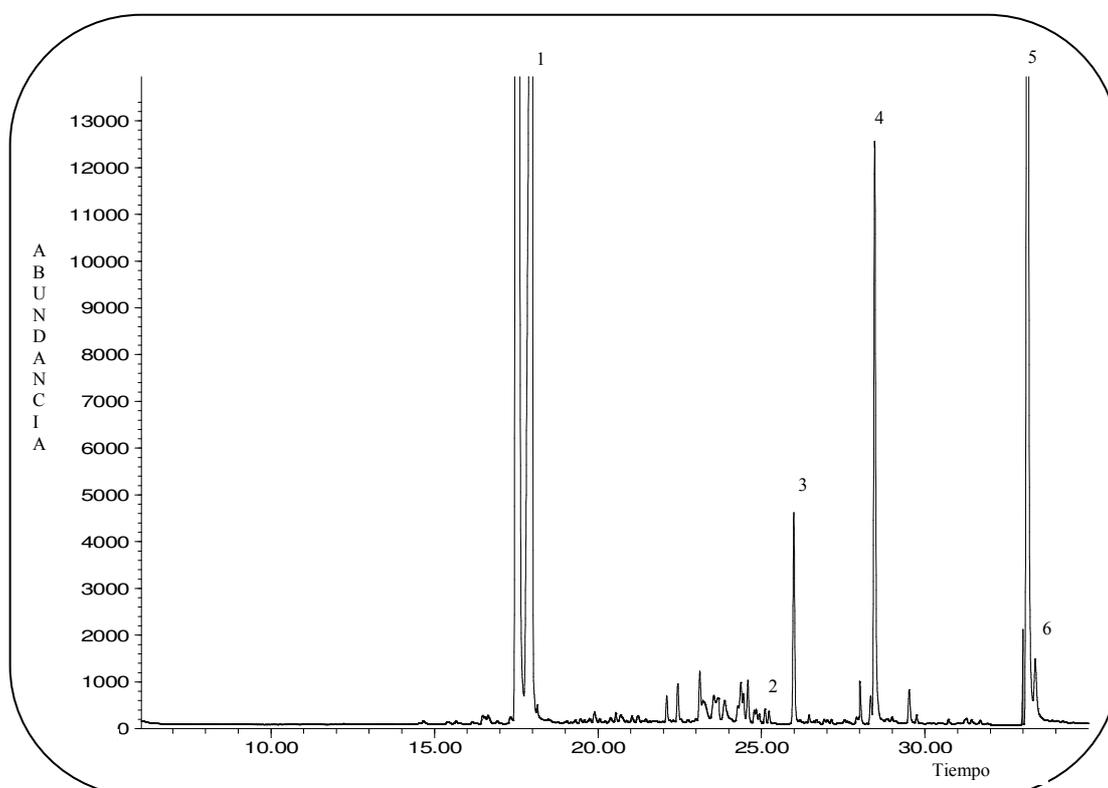


Figura VI. Cromatograma Iónico Total del análisis por MEFS del mezcal "Beneva".
Condiciones cromatográficas e identificación se indican en la Figura I.

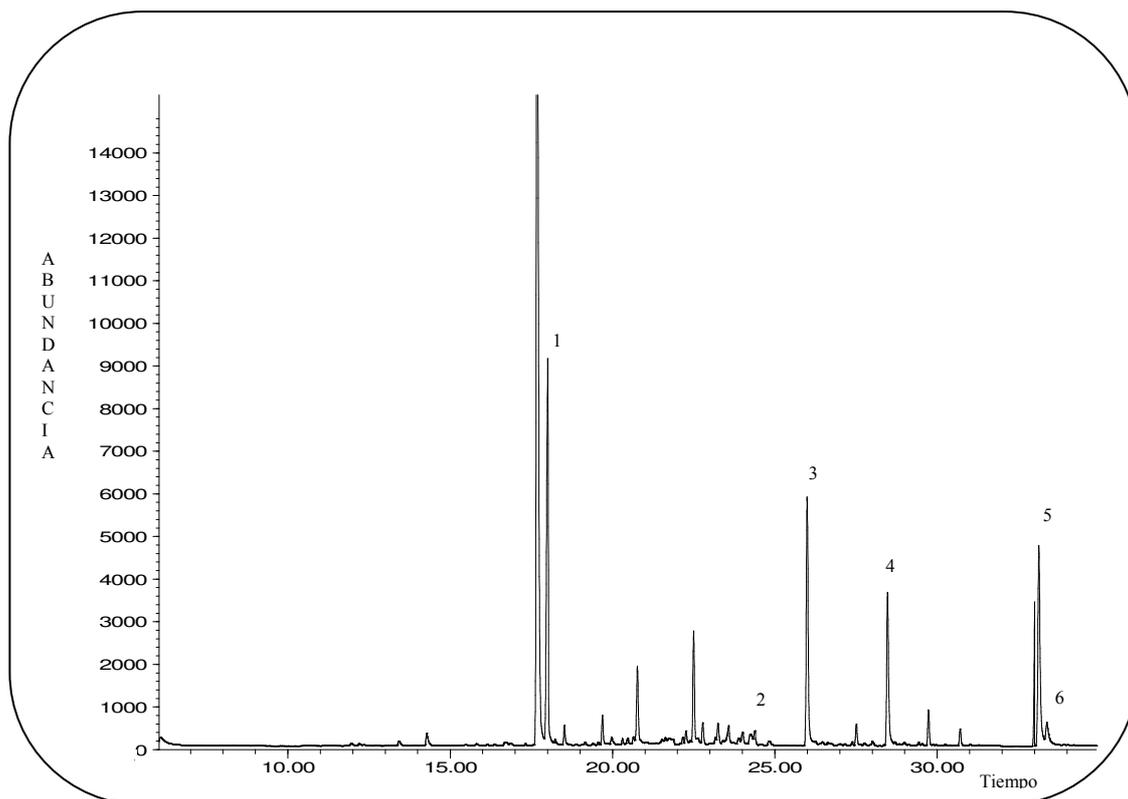


Figura VII. Cromatograma Iónico Total del análisis por MEFS del mezcal "Laguna Seca". Condiciones cromatográficas e identificación se indican en la Figura I.

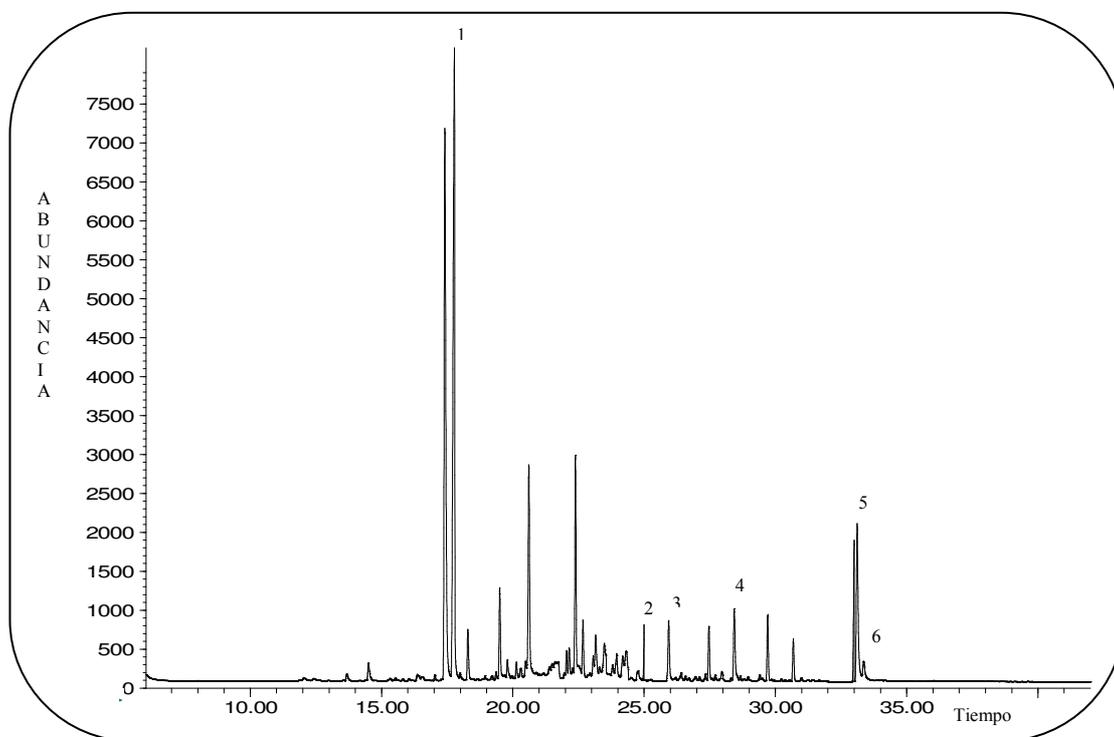


Figura VIII. Cromatograma Iónico Total del análisis por MEFS del mezcal "Real de Magueyes". Condiciones cromatográficas e identificación se indican en la Figura I.

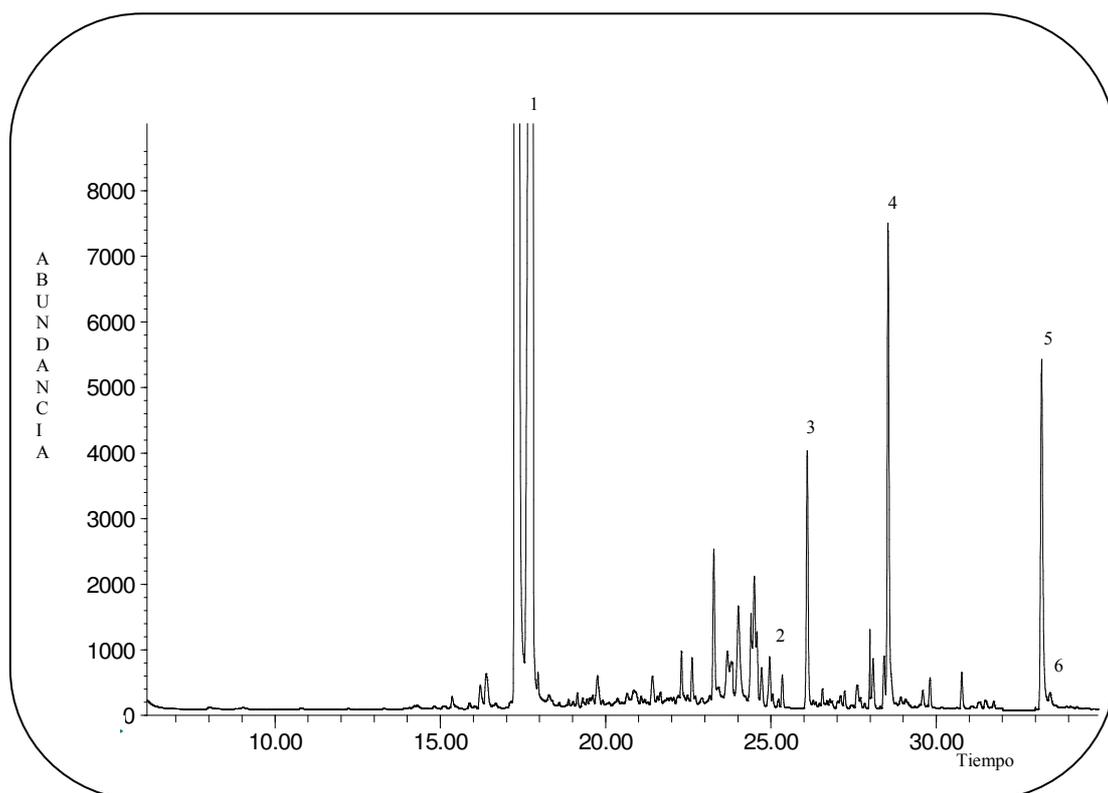
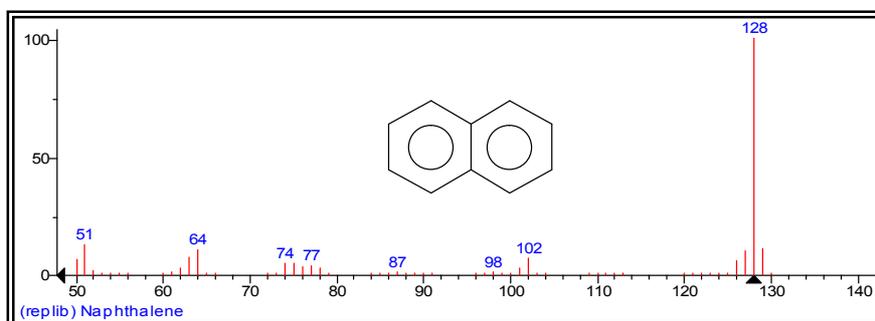


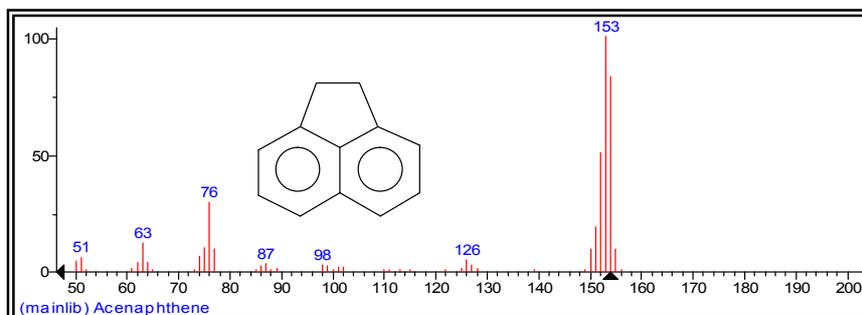
Figura IX. Cromatograma Iónico Total del análisis por MEFS del mezcal "Sanzekan". Condiciones cromatográficas e identificación se indican en la Figura I.

7.2 Espectros de Masas de los compuestos identificados: Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP's)

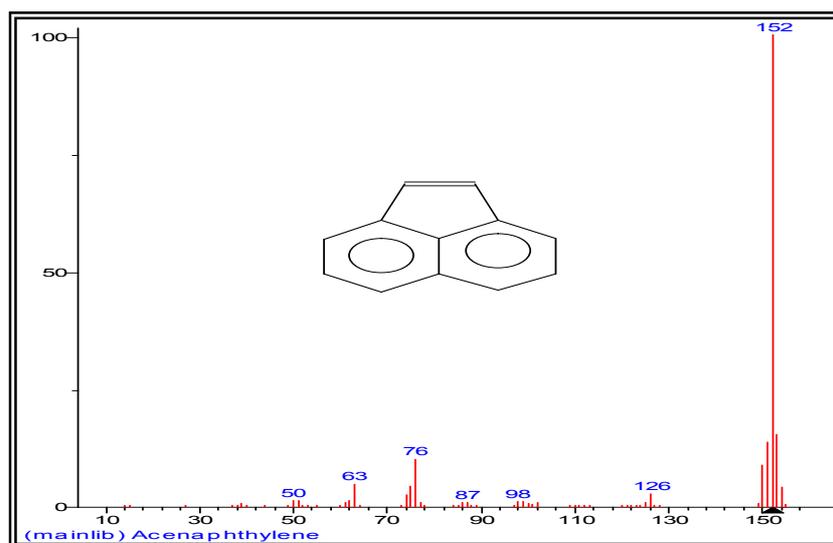
Naftaleno



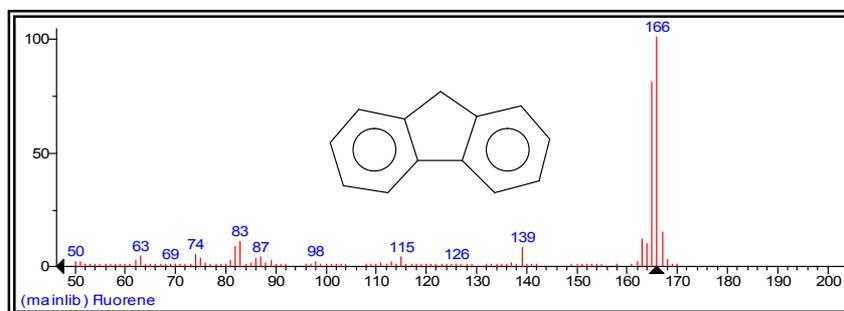
Acenafteno



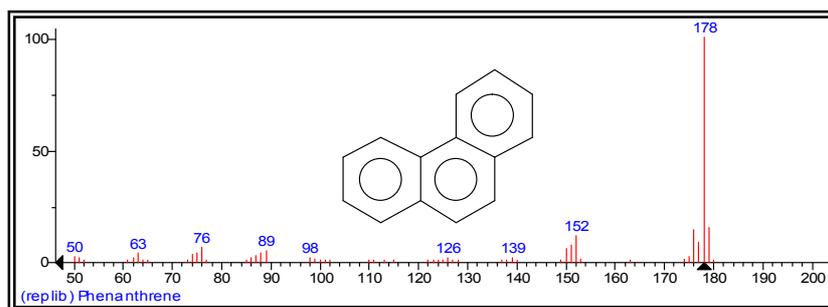
Acenaftileno



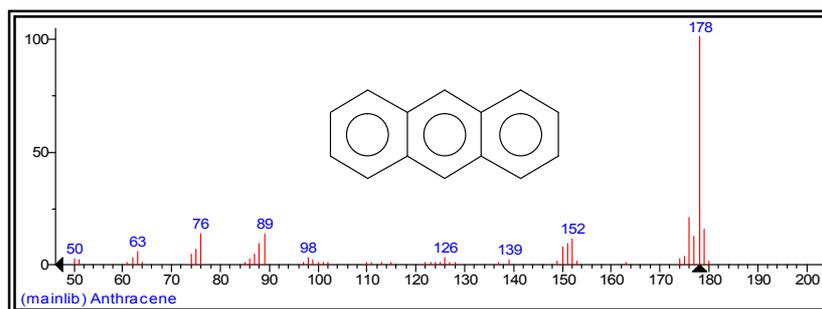
Fluoreno



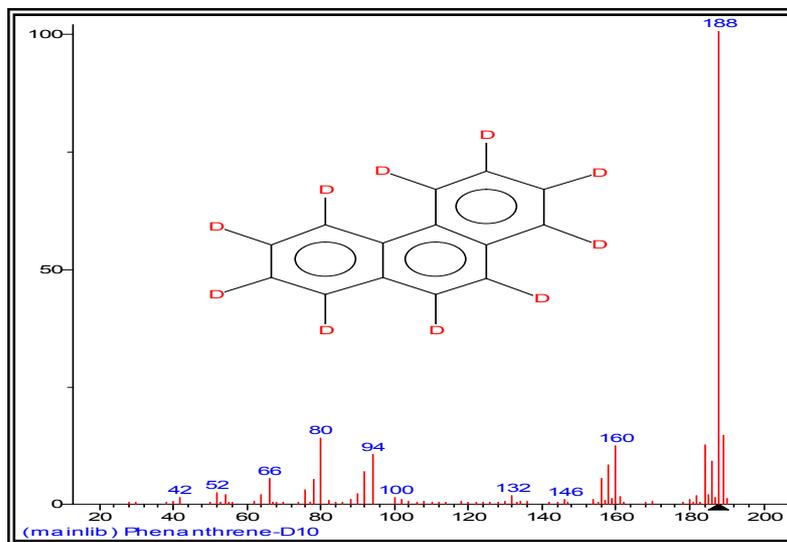
Fenantreno



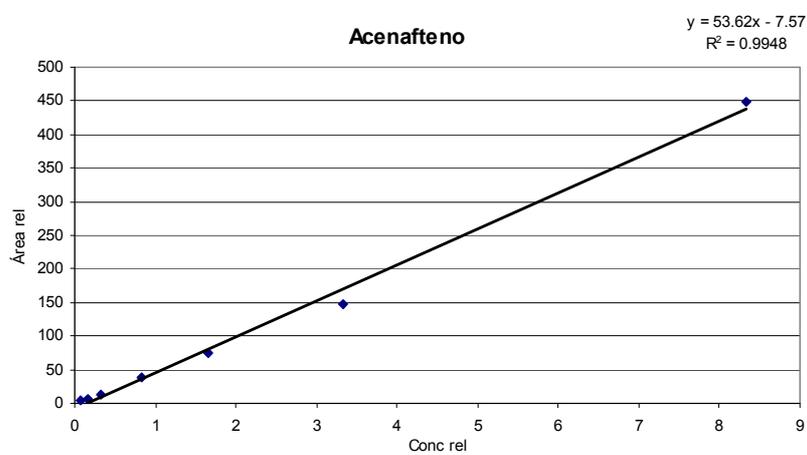
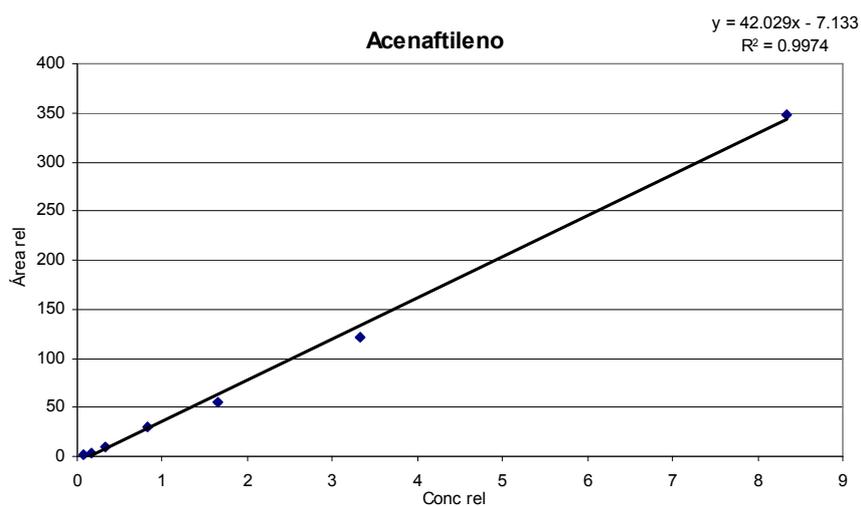
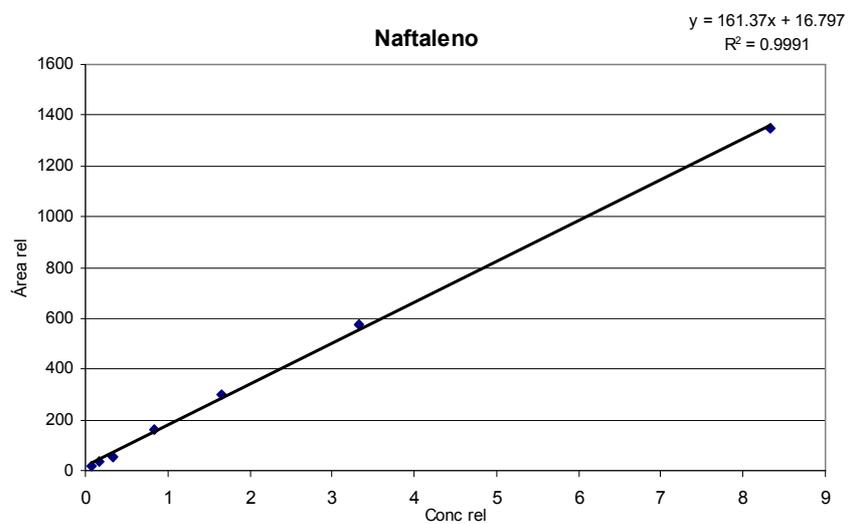
Antraceno

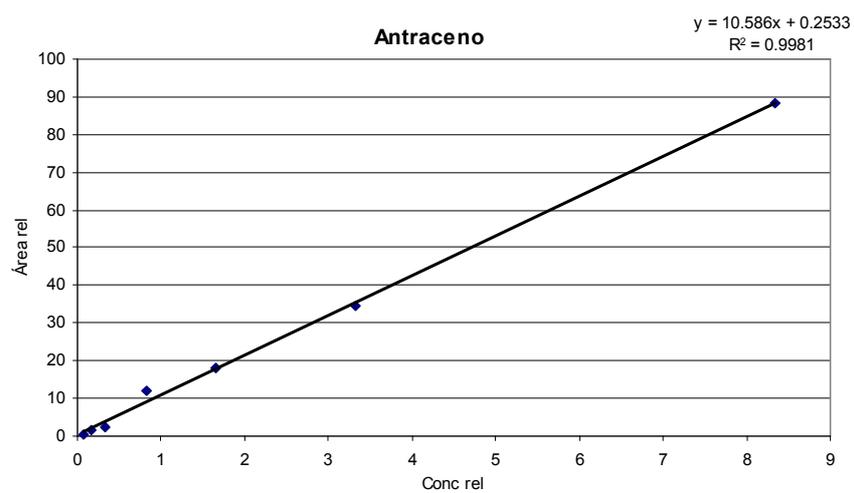
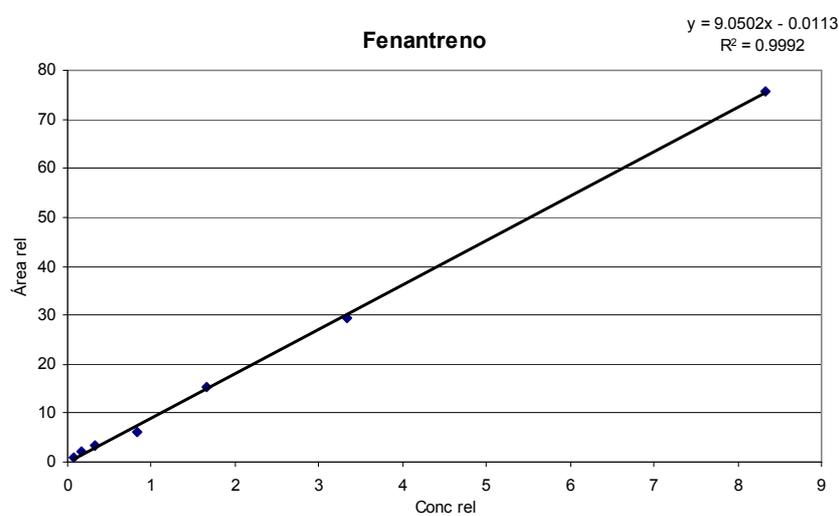
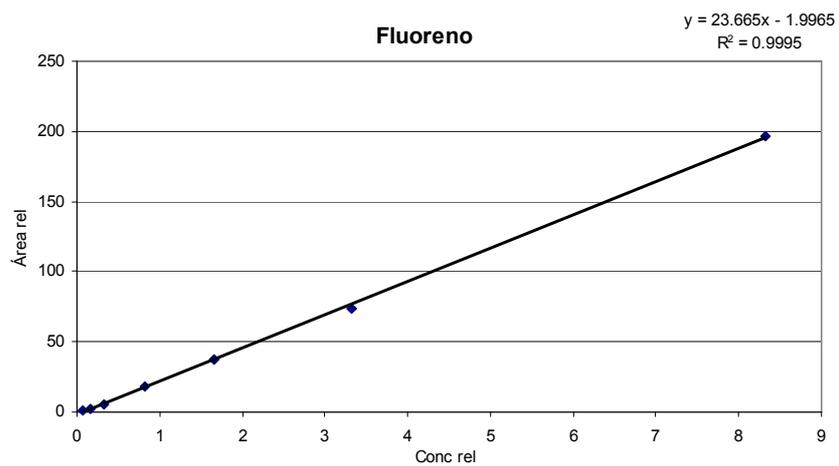


Fenantreno-d10 (Estándar Interno)



7.3 Gráficas de la curva patrón (relativa) de los seis HAP's estudiados





Bibliografía.

1. Reyes, D. D. **Determinación de los principales compuestos orgánicos del mezcal por Cromatografía de Gases Capilar – Espectrometría de Masas.** Tesis de Licenciatura en revisión, UNAM, México, D.F., 2-20, 2006.
2. Norma Oficial Mexicana. **NOM-070-SCFI-1994.** Bebidas Alcohólicas – Mezcal – Especificaciones.
3. Ramales, O. M. y Barragán, R. M. **La industria del mezcal y la economía oaxaqueña** en Observatorio de la Economía Latinoamericana [en línea, disponible en <http://www.eumed.net/cursecon/ecolat/mx/>; Internet; accesado el 9 de Agosto del 2006].
4. **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 11 de Agosto del 2006].
5. Ruey-an Doong, Sue-min Chang, Yuh-chang Sun. **Solid-phase microextraction for determining the distribution of sixteen US Environmental Protection Agency polycyclic aromatic hydrocarbons in water simple.** Journal of Chromatography A. 879:177-188, 2000.
6. A. J. King, J. W. Readman, J. L. Zhou. **Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water by solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry.** Analytica Chimica Acta. 523:259-267, 2004.
7. Rojas, G. D. **Dispersión de matriz en fase sólida un alternativa para la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's) en matrices biológicas. Aplicación jamón ahumado.** Tesis de Licenciatura, UNAM, México, D.F., 11-16, 2006.
8. Blomberg, L. **Tequila, Mezcal y Pulque.** Diana, México, D. F., 243- 244, 2001.
9. McNair, H. M. y Miller, J. M. **Basic Gas Chromatography.** A Wiley-Interscience Publication, USA, 153-166, 1998.
10. Wampler, T. P. Chapter 2: Analysis of food volatiles using headspace-gas chromatographic techniques. **Techniques for analyzing Food Aroma.** Marsili, R. editor. Marcel Dekker, Inc. NY, USA, 138-145, 1997.
11. Skoog, D. **Principios de Análisis Instrumental.** McGraw Hill, 5ª edición, España, 537-573, 759-782, 2001.

12. Deshpande, S. S. **Handbook of Food Toxicology**. Food Science and Technology (Series). Indus Therapeutics, Inc. Marcel Dekker, Inc., USA, 285-289, 295-297-, 316-320, 849-864, 2002.
13. Pawliszyn, J. **Solid Phase Microextraction. Theory and Practice**. Wiley-VCH, Inc., USA, 97-139, 1997.
14. **Normas Internacionales para el Agua Potable**. Organización Mundial para la Salud (OMS), 3ª edición, Suiza (Ginebra), 41-42, 57-58, 60-63, 1972.
15. Dietz, C., Sanz, J., Cámara, C. **Recent developments in solid-phase microextraction coatings and related techniques**. Journal of Chromatography A. 1103: 183–192, 2006.
16. Flowers, L., Rieth, S. H., Cogliano, V. J. **Health Assessment of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Mixtures: Current Practices and Future Directions**. U.S. Environmental Protection Agency (EPA). Washington, D.C., USA, Polycyclic Aromatic Compounds, 22:811–821, 2002.
17. Fähnrich, K. A., Pravda M. and Guilbault, G. G. **Immunochemical Detection of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH's)**. Mini-Review. Analytical Letters. Vol. 35, 8: 1269–1300, 2002.
18. Mancilla-Margalli, N. A. y López, M. G. **Generation of Maillard Compounds from Inulin during the Thermal Processing of *Agave tequilana* Weber Var. azul**. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 50, 806-812, 2002.
19. Morrison, R. T. **Química Orgánica**. Addison Wesley Longman, 5a edición, México, 1174-1204, 1998.
20. León, R. A, y González, H. L, **Characterization of volatile compounds of mezcal, an ethnic alcoholic beverage obtained from *Agave salmiana***. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 54: 1337-1341, 2006.