



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

**DETERMINACIÓN DE LÍPIDOS SIMPLES EN AGAVE MEZCALERO POR
CROMATOGRAFÍA DE GASES**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q. I. JUAN FRANCISCO MARTÍNEZ AGUILAR



TUTOR: Dra. Araceli Peña Álvarez

AÑO: 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio 101 del departamento de
Química Analítica de la Facultad de Química, UNAM

Parte del mismo se presentó en el XXI Congreso Nacional de Química Analítica
(Monterrey, Nuevo León)

Agradecimientos

A la Dra. Araceli Peña Álvarez por su ayuda para realizar el presente trabajo de investigación

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada (200984) para llevar a cabo de mis estudios de maestría

A la DGAPA por el apoyo económico brindado a través del proyecto PAPIIT IN207006-2, y la beca concedida para la realización de esta tesis

A mis papás

Julia Aguilar Castillo
Juan Martínez Aguas

Índice

Página

1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
2.1. El agave o maguey	3
2.1.1. Identidad botánica	5
2.2. El mezcal, producto del agave	8
2.2.1. Elaboración del mezcal	12
2.2.1.1. El agave como materia prima	12
2.2.1.2. Horneado.....	14
2.2.1.3. Molienda.....	15
2.2.1.4. Fermentación.....	15
2.2.1.5. Destilación	16
2.3. Los lípidos	16
3. Objetivos	20
3.1. Objetivo general	20
3.2. Objetivos particulares	20
4. Parte experimental	21
4.1. Material, reactivos y disolventes.....	21
4.1.1. Reactivos y disolventes	21
4.1.2. Estándares	21
4.1.3. Aparatos	22
4.2. Muestras.....	23
4.3. Preparación de la muestra	26
4.3.1. Homogeneización de la muestra	26
4.3.2. Determinación de humedad	26
4.4. Obtención del extracto lipídico	26
4.5. Determinación de la distribución general de ácidos grasos.....	28

4.5.1. Hidrólisis y esterificación de los lípidos	28
4.5.2. Identificación de los ésteres etílicos de ácidos grasos	29
4.5.3. Cuantificación de los ésteres etílicos de ácidos grasos.....	29
4.5.4. Condiciones cromatográficas	30
4.5.5. Evaluación de la formación de derivados de ácidos grasos	31
4.6. Determinación de la distribución general de lípidos simples totales.....	32
4.6.1. Derivatización del extracto lipídico	32
4.6.2. Identificación de lípidos simples	33
4.6.3. Cuantificación de lípidos simples.....	33
4.6.4. Condiciones cromatográficas	34
4.6.5. Evaluación de la formación del derivado de lípidos simples.....	34
5. Resultados y discusión	35
5.1. Obtención del extracto lipídico	35
5.2. Distribución general de ácidos grasos.....	36
5.2.1. Ácidos grasos identificados	36
5.2.2. Curvas de calibración de ésteres etílicos de ácidos grasos	40
5.2.3. Concentración de ácidos grasos en los diferentes agaves analizados....	40
5.2.4. Evaluación de la formación de derivados de ácidos grasos	48
5.2.5. Comparación de los taxa mediante análisis multivariable.....	49
5.3. Distribución general de lípidos simples	53
5.3.1. Lípidos simples identificados	53
5.3.2. Curvas de calibración de lípidos simples.....	58
5.3.3. Concentración de lípidos simples en las muestras de agave analizadas	58
5.3.4. Evaluación de la formación del derivado de lípidos simples.....	60
6. Conclusiones	62
7. Referencias	63
8. Anexos	68

Resumen

Se analizaron cinco taxa (cuatro especies distintas, dos taxa de una misma especie) de agave utilizados para producir mezcal, provenientes de varios estados de la República Mexicana incluidos en la protección a la Denominación de Origen de esta bebida: *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck ssp. *crassispina* (Trel.) Gentry (Charcas, San Luis Potosí), *A. salmiana* var. *salmiana* Otto ex Salm-Dyck (San Felipe, Guanajuato), *A. angustifolia* Haw (Santiago Matatlán, Oaxaca), *A. cupreata* Trel & A. Berger (Chilapa, Guerrero) y *A. karwinskii* Zucc. (Santa Catarina, Oaxaca). Se determinó la distribución general de ácidos grasos y lípidos simples de las cabezas maduras crudas de cada una empleando una extracción Bligh-Dyer modificada y cromatografía de gases. Se identificaron y cuantificaron 16 ácidos grasos, desde el decanoico (C10) hasta el tetracosanoico (C24). Los ácidos encontrados en mayor concentración fueron el palmítico (C16), oleico (C18), linolénico (C18:3) y particularmente linoleico (C18:2), este último en concentraciones de 137 $\mu\text{g/g}$ a 459 $\mu\text{g/g}$ de agave. Los otros ácidos presentaron concentraciones inferiores a 20 $\mu\text{g/g}$, siendo el decanoico (C10) el de menor concentración en todos los casos. En el análisis de lípidos simples en los agaves se identificó y cuantificó el contenido de ácidos libres, β -sitosterol, mono, di y triacilglicérol. Las mayores concentraciones encontradas fueron del grupo de triacilglicérol, que van desde 223 $\mu\text{g/g}$ a 565 $\mu\text{g/g}$ de agave, con excepción de *A. angustifolia*, que presentó concentraciones semejantes de tri y diacilglicérol. Las concentraciones totales de lípidos simples van de 459 $\mu\text{g/g}$ a 992 $\mu\text{g/g}$ de agave, siendo en el *A. karwinskii* donde se encontró el mayor contenido, siguiendo en orden decreciente: *A. salmiana* var. *salmiana* > *A. salmiana* ssp. *crassispina* > *A. angustifolia* > *A. cupreata*. La metodología desarrollada permitió obtener coeficientes de variación menores a 10% en todas las determinaciones; la evaluación de la formación de derivados con pruebas de recuperación a partir de un extracto lipídico presentó en la mayoría de los casos porcentajes en el intervalo de 100 ± 5 %. Las diferencias en contenido y en el perfil de ácidos en las especies

de agave pueden permitir explicar diferencias en características organolépticas de los mezcales así como la correlación del producto con la identidad de la materia prima.

1. Introducción

El mezcal es una bebida alcohólica obtenida a partir de la destilación del mosto fermentado extraído de cabezas maduras de agave. Se encuentra protegido por la declaración a la Denominación de Origen publicada en Diario Oficial de la Federación el 28 de Noviembre de 1994 para su producción exclusiva en los estados de Guerrero, Durango, Zacatecas, San Luis Potosí, Oaxaca, once municipios de Tamaulipas y uno de Guanajuato. De acuerdo a la norma oficial NOM-070-SCFI-1994, está permitido el empleo de varias especies de agave para elaborarlo y es posible también producir dos tipos del mismo: 100% agave y mixto, con adición de hasta 20 % de otros carbohidratos, además de las categorías joven, reposado y añejo.

El análisis de los componentes químicos de la bebida y de la evolución de los mismos durante el proceso de elaboración puede permitir mejorar las etapas de producción, explicar sus características organolépticas así como diferenciarla entre sus diferentes tipos y de productos similares. Uno de los eslabones en esta cadena de factores que dan a cada mezcal características propias es la materia prima. El estudio del maguey en este aspecto ha sido casi nulo, pues la investigación científica se ha centrado en el incremento de su producción y no en su caracterización química. Además, gran parte de los estudios han tenido que ver con el tequila, otra bebida obtenida a partir de agave, apareciendo sólo algunas publicaciones sobre la caracterización de mezcal (De León *et al.*, 2006), sin abordar el estudio de la planta utilizada para producirlo.

Entre los grupos de compuestos que se han identificado en bebidas como mezcal y tequila están los alcoholes, ácidos, aldehídos, ésteres, furanos, cetonas, fenoles y terpenos (Peppard y Benn, 1996; De León *et al.*, 2006). Además del proceso de producción *per se*, la aportación particular de estos compuestos por cada especie

juega también un papel en el perfil químico de los productos finales. Los lípidos simples presentes en las cabezas de agave, por ejemplo, pueden ser convertidos a ácidos durante el horneado de la planta y la fermentación del mosto, y éstos a su vez generar los ésteres etílicos correspondientes, que presentan en general aromas dulces y frutales y poseen bajos umbrales de olor (Leffingwell, 2007).

Como se ha mencionado, el mezcal se produce en varios estados de la República Mexicana en los cuales se utilizan especies de agave distintas, y cada una puede proveer de manera específica compuestos precursores de aromas. El estudio de del mezcal de las distintas regiones y de su elaboración permitiría obtener productos de mayor calidad, diferenciando además las bebidas por su origen y favoreciendo su autenticación. El trabajo en este campo ha sido poco. Por ejemplo, no existen procedimientos establecidos para diferenciar entre las diversas categorías de mezcal, ni entre sus dos tipos. El presente trabajo es una contribución a la caracterización química de varios agaves mezcaleros, concretamente sobre su contenido de lípidos simples, cuyos productos de hidrólisis se encuentran en el mezcal y que, junto con los diferentes pasos de elaboración, permitiría explicar diferencias en el contenido de ácidos grasos y ésteres etílicos en las bebidas.

2. Antecedentes

2.1. El agave o maguey

La palabra <<maguey>> tiene un origen taíno y es comúnmente empleada para referirse al agave. El nombre <<agave>>, por su parte, proviene del griego y significa “admirable”; fue utilizado por vez primera por Carlos Linneo en 1753, nombrando a la especie *Agave americana*. Estas plantas se han aprovechado desde la época prehispánica para diversos fines, estando entre los más importantes el de bebida, alimento y para la obtención de fibras. Su presencia en la dieta de los antiguos pobladores de la región mesoamericana se ha comprobado con los restos de maguey con más de 10,000 años de antigüedad consumido como alimento en el estado de Puebla (Aguirre *et al.*, 2001).

Las hojas del agave sirven para alimentar al ganado, su cocción así como la del tallo floral y de las inflorescencias también permite su aprovechamiento. De las hojas jóvenes del cogollo (parte superior y central de la planta de la que se desprenden hojas nuevas) se extrae la cutícula, que sirve para envolver y dar un sabor especial a otros alimentos en un platillo conocido como “mixiote”. La planta es frecuentemente parasitada por un gusano blanco –larva de una mariposa-, *Acentrocne me hesperiaris*, que se come frito o tostado al igual que el gusano rojo o “chinicuil”, *Hypopta agavis*, otro parásito.

A las fibras de las hojas se les ha dado usos tales como bolsas, costales, cuerdas, redes, hamacas y tapetes, empleándose en México principalmente el henequén (*A. fourcroydes*) y el *A. lechugilla*, cuyas fibras también se han estudiado para aplicarse como refuerzo para concreto (Juárez *et al.*, 2004). Otra de las utilidades del agave, hoy en día la más popular, es como materia prima en la elaboración de las bebidas destiladas mezcal, tequila y bacanora. No obstante, la utilización de la planta en esta área inició con la obtención de aguamiel (savia azucarada extraída

de las plantas maduras) y su producto fermentado, el pulque, por los indígenas mesoamericanos. Este último tuvo un uso ceremonial en los pueblos antiguos y adquirió una demanda importante durante el siglo XIX y principios del XX en México; sin embargo, al parecer su desacreditación en los años subsecuentes favoreció el consumo de cerveza, disminuyendo su producción (Aguirre *et al.*, 2001; CONACULTA, 2006).

La importancia del agave en los pueblos prehispánicos se ve reflejada en Mayahuel, diosa del maguey (Figura 1). Según la leyenda, Quetzalcóatl la convence de irse con él al mundo, donde se convierten en un árbol de dos ramas. La abuela de Mayahuel cortó la rama donde ésta se encontraba y se la dio a comer a las *tzitzimime*, entidades de la oscuridad. Al recuperar su forma, Quetzalcóatl recoge y entierra los restos de Mayahuel, de los que surgió el maguey. Así, desde el uso de su púa terminal como aguja hasta el del jugo de su tallo para la elaboración de bebidas, el agave ha mostrado ser una planta de importancia histórica y versátiles usos. José de Acosta escribió en su *Historia moral y natural de las Indias*: “El árbol de maravillas es el maguey, de que los nuevos o chapetones (como en Indias los llaman) suelen escribir milagros, de que da agua y vino, y aceite y vinagre, y miel, y arrope e hilo, y aguja, y otras cien cosas”. En la Tabla 1 se reúnen los usos comunes de esta planta (Granados, 1993; Kolendo, 1996; Nobel, 1998).



Figura 1. Mayahuel, diosa del maguey. Códice Laud.

Tabla 1. Usos del maguey

Destino	Parte/producto
Bebidas	
Aguamiel	Cabeza del maguey
Atoles	Aguamiel
Pulque	Aguamiel fermentada
Vinagre	Aguamiel fermentada
Mezcal	Cabeza del maguey
Tequila	Cabeza del maguey
Bacanora	Cabeza del maguey
Comida y condimento	
Gusanos blancos	Hojas
Gusanos rojos (chinicuiles)	Raíces
Condimento para barbacoa	Pulque
Saborizante de tamales y pan	Aguamiel y cabeza
Tortillas	Escapo floral
Barbacoa	Hojas
Tejido	
Hilos, cordeles, costales, bolsas, tapetes, hamacas	Fibras de las hojas
Construcción	
Vigas	Escapo floral seco
Tejado	Hojas
Otros	
Combustible	Hojas y cabezas secas
Forraje	Hojas frescas
Ornato	Maguey completo

2.1.1. Identidad botánica

El género *Agave* es endémico del continente americano, su clasificación botánica se indica en la Tabla 2. La familia a la que pertenece, Agavaceae, fue propuesta por Endlicher (1841) incluyendo a los géneros *Agave* y *Furcraea*. Salisbury (1866) reconoce los géneros *Yucca*, *Furcraea*, *Littaea*, *Manfreda* y *Polianthes*; Dahlgren y Clifford (1985) reconocen dos subfamilias: Yuccoideae, con los géneros *Yucca* y *Hesperaloë*, y Agavoideae, con los géneros *Agave*, *Beschorneria*, *Furcraea*, *Manfreda*, *Polianthes* y *Prochnyantes*.

Los 8 géneros se encuentran en México y se considera que el centro de origen y diversificación es México central, específicamente la zona de Tehuacán, Puebla, donde existe el mayor número de especies del género *Agave*: 15, con 8 de ellas endémicas (García-Mendoza y Galván, 1995; Eguiarte *et al.*, 2000; García-Mendoza, 2002).

Tabla 2. Clasificación botánica del género *Agave*

Reino: Plantae
División: Angiospermae
Clase: Monocotiledóneas
Orden: Asparagales
Familia: Agavaceae
Género: <i>Agave</i>

El número de especies reconocidas dentro del género *Agave* varía según las delimitaciones taxonómicas. Thiede (2001) reconoce 210 especies en los subgéneros *Littaea*, *Agave* y *Manfreda* mientras que García-Mendoza (2002) reconoce 200 especies en los subgéneros *Littaea* y *Agave*, además de 47 categorías infraespecíficas. Gentry (1982) identificó la diferencia entre los subgéneros anteriores en su inflorescencia: *Agave* con inflorescencias en panícula y flores en agregados umbelados sobre pedúnculos laterales y *Littaea* con inflorescencias espigadas y flores pares. Este último subgénero no se encuentra en Baja California ni en Yucatán y se distribuye desde Utah, Nevada y Arizona en Estados Unidos hasta Guatemala. El subgénero *Agave*, en cambio, se distribuye desde California a Texas y sur de Florida hasta Perú, Colombia y Venezuela, incluyendo Centroamérica y las Antillas (Gentry, 1982; Eguiarte *et al.*, 2000, García-Mendoza, 2002).

Los agaves se encuentran en altitudes desde el nivel del mar hasta los 3400 msnm, aunque principalmente entre 1000 y 2000 msnm; se desarrollan en ambientes de bosque tropical caducifolio, matorral xerófilo, bosque espinoso,

bosque de encino y pastizal, y en tipos de suelo que van desde los formados por rocas ácidas ígneas hasta los calizos, básicos.

De acuerdo a García-Mendoza (2002) México posee el 75% de las especies: 150 más 36 taxa infraespecíficos distribuidos a lo largo del país, siendo el valle de Tehuacán-Cuicatlán (entre Puebla y Oaxaca) y la zona limítrofe entre Sonora, Chihuahua y Sinaloa además de la de San Luis Potosí, Nuevo León y Tamaulipas las áreas de mayor variedad de especies.

Los agaves son plantas perennes principalmente acaules, suculentas, semélparas, con hojas generalmente gruesas de hasta 25 cm de ancho en la base, lanceoladas y con espinas laterales. Las hojas se arreglan en espiral formando una roseta, con un color desde verde lustroso hasta azul grisáceo opaco. Desarrollan una espectacular inflorescencia de hasta 10 m de altura entre los 7 y 12 años de edad. Las flores son protándricas, usualmente blanquecino-verdosas, amarillentas o a veces rojizas. Su reproducción puede ser sexual mediante semilla o asexual mediante bulbilos y, más comúnmente, rizomas (Granados, 1999; Eguiarte *et al.*, 2000, Irish e Irish, 2000; Aguirre *et al.*, 2001). En la Figura 2 se muestran las partes de esta planta.



Figura 2. El maguey y sus partes. Museo Nacional de Culturas Populares, 1988

2.2. El mezcal, producto del agave

La palabra <<mezcal>> proviene del náhuatl *mexcalli*, compuesto de *metl*, maguey, e *ixcalli*, cocido o hervido. Algunos autores han postulado también como palabra de origen a *Metzcallalli*, maguey que se cultiva en los alrededores de la casa. Se refiere tanto a la planta como al aguardiente de agave, que comenzó a producirse a partir de la conquista española con la introducción de la destilación en México.

Atendiendo a la norma NOM-070-SCFI-1994, el mezcal es una bebida alcohólica regional obtenida de la destilación y rectificación del mosto fermentado de cabezas maduras de agave, previamente cocidas a fin de hidrolizar los polisacáridos presentes. Los azúcares en el mosto pueden provenir totalmente del agave (mezcal 100% agave) o mezclarse con hasta 20% de otros carbohidratos. Es un líquido incoloro o amarillento cuando es abocado¹, reposado o añejado.

La misma norma señala tres categorías de mezcal:

- Joven: aquél que se envasa sin reposo o añejamiento, susceptible de ser abocado.
- Reposado: producto susceptible de ser abocado que se deja por lo menos 2 meses en recipientes de madera de roble blanco o encino.
- Añejo: producto susceptible de ser abocado, sujeto a un proceso de maduración de por lo menos un año en recipientes de madera de roble blanco o encino. En mezclas de diferentes mezcales añejos la edad para el mezcal resultante es el promedio ponderado de las edades y volúmenes de sus componentes.

El 28 de noviembre de 1994 se publicó en el Diario Oficial de la Federación la resolución mediante la cual se otorga la protección a la denominación de origen “Mezcal”, registrada el 9 de marzo de 1995 por la Organización Mundial de la Propiedad Intelectual, en Ginebra, Suiza. Además, el 27 de mayo de 1997 se firmó en Bruselas, Bélgica, el acuerdo entre México y la Comunidad Europea concerniente al reconocimiento mutuo y a la protección de las denominaciones en el sector de las bebidas espirituosas, con el objetivo de proteger en su territorio las denominaciones de origen de tequila y mezcal y garantizar a México la comercialización exclusiva de estas bebidas en territorio europeo. De acuerdo al artículo 156 de la Ley de la Propiedad Industrial, “se entiende por denominación

¹ Abocado: Procedimiento para suavizar el sabor del mezcal mediante la adición de uno o más productos naturales, saborizantes o colorantes permitidos en las disposiciones legales correspondientes

de origen, el nombre de una región geográfica del país que sirva para designar un producto originario de la misma, y cuya calidad o característica se deban exclusivamente al medio geográfico, comprendido en éste los factores naturales y los humanos”. Tal región geográfica quedó establecida originariamente como aquella formada por los estados de Guerrero, Durango, San Luis Potosí, Zacatecas y la “Región del mezcal” conformada por los municipios de Sola de Vega, Miahuatlán, Yautepec, Santiago Matatlán, Tlacolula, Ocotlán, Ejutla y Zimatlán, en Oaxaca. Posteriormente, el 19 de noviembre de 2001, se incluyó a San Felipe, en el estado de Guanajuato, y el 11 de febrero de 2003 a otros once municipios, del estado de Tamaulipas (ver Figura 3).

Las otras dos bebidas destiladas de mostos de agave con protección a la denominación de origen son el tequila y el bacanora. De hecho, el tequila fue la primera bebida en obtener la denominación de origen, en 1974; el bacanora lo hizo en el año 2000. Ambas comparten el hecho de tener el nombre del municipio del que son originarias: Tequila, en Jalisco y Bacanora, en Sonora. Además, de acuerdo a la norma NOM-006-SCFI-2005, el tequila sólo puede elaborarse a partir de un tipo de agave, el *A. tequilana* Weber var. azul, en Jalisco y varios municipios de Guanajuato, Nayarit, Tamaulipas y Michoacán; la NOM-168-SCFI-2005 establece por su parte que sólo el *A. angustifolia* Haw ha de emplearse para producir bacanora, en ciertos municipios de Sonora.

En contraste, la elaboración de mezcal no está restringida a una sola especie, sino que en cada estado pueden emplearse varias especies siempre y cuando éstas no sean utilizadas como materia prima para otras bebidas con denominación de origen dentro del mismo. Entre ellas se encuentran:

A. angustifolia Haw

A. scabra Salm-Dyck ssp. *potosiensis*

A. weberi Cels ex Poisson

- A. potatorum* Zucc.
- A. salmiana* Otto ex Salm-Dyck ssp. *crassispina* (Trel.) Gentry
- A. marmorata* Roezl
- A. karwinskii* Zucc.
- A. cupreata* Trel. & Berger
- A. duranguensis* Gentry

(Aguirre *et al.*, 2001; Espinosa *et al.*, 2002)



Figura 3. Entidades federativas incluidas en la Denominación de Origen “Mezcal”

Cada mezcal posee características de aroma y sabor singulares, que dependen de su proceso de elaboración, añejamiento y de la materia prima. Las especificaciones que deben cubrir según la norma oficial mexicana se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Especificaciones del mezcal según la norma NOM-070-SCFI-1994

Especificaciones	Mínimo	Máximo
% de alcohol en volumen a 20 C	36	55
Extracto seco g/L	0.2	10
Valores dados en mg/100 mL de alcohol anhidro:		
Acidez total (como ácido acético)		170
Alcoholes superiores	100	400
Metanol	100	300

2.2.1. Elaboración del mezcal

2.2.1.1. El agave como materia prima

Una vez que las plantas de agave han llegado a la madurez (7-12 años), el meristema floral empieza a desarrollar lo que será el escapo y la inflorescencia, como penúltimo paso hacia su muerte, antes de la floración. En el transcurso de este evento la planta emplea sus recursos energéticos en la construcción de las estructuras reproductivas, lo que consume parte de los carbohidratos necesarios para elaborar el mezcal. Con el fin de evitar esta pérdida, se interrumpe el proceso de reproducción mediante la castración, que prolonga la vida del agave así como la acumulación de carbohidratos.

El procedimiento de castración es más efectivo si se realiza en una fase temprana de desarrollo del qurote o escapo floral, como sucede en el estado de San Luis Potosí y Zacatecas, pues se aprovecha al máximo la capacidad de acumulación de carbohidratos de la planta y le permite así alcanzar un estado óptimo como materia prima para producir el mezcal. En otros estados, incluidos aquellos donde se elabora tequila, la planta se castra cuando el eje floral posee desde 1 m o más de altura, y sobresale de las hojas superiores, procedimiento conocido como desqurote. Esta segunda práctica es más sencilla pero disminuye el potencial

productivo de la planta, que canaliza parte de sus reservas en la formación del quiote (Aguirre *et al.*, 2001; Valenzuela, 2003).

En estados como San Luis Potosí la identificación de las plantas maduras con un desarrollo incipiente del escapo se basa en los cambios morfológicos de las mismas, como el adelgazamiento del cogollo y coloración negro brillante de sus espinas terminales. Con un machete se corta el cogollo a unos 20 cm de la base, quedando un orificio central que permite verificar la aptitud de la planta para ser castrada. Se cortan entonces las hojas tiernas remanentes y se remueve la yema floral, dejando un hueco o cajete sobre la parte superior del tallo (Fig. 4).



a



b

Figura 4. a) Maguey con adelgazamiento del cogollo, b) Extracción de la yema floral.

Fuente: Aguirre *et al.*, 2001

Después de 1 a 2 años del corte el agave está listo para ser recolectado. Para ello, se le remueven las hojas y se desprende el tallo a nivel del suelo quedando solamente la cabeza - tallo y base de las hojas-, cuya apariencia recuerda a la de una piña (Fig. 5).



Figura 5. a) Piña o cabeza de agave y b) sus partes.

El carbohidrato de reserva de mayor concentración en la planta es la inulina. Se trata de un polisacárido formado por cadenas de 25 a 35 unidades de fructosa unidas por enlaces glucosídicos β (1-2), con una molécula de glucosa terminal. En general, la composición química del agave se caracteriza por un alto contenido de humedad y un porcentaje de carbohidratos que puede llegar a representar hasta la tercera parte del peso total de una piña (Bautista *et al.*, 2001). En la Tabla siguiente se muestran los datos reportados en el análisis de algunas especies:

Tabla 4. Composición media de especies de agave: *A. atrovirens*, *A. potatorum*, *A. cochlearis*, *A. tequilana* (Madrigal *et al.*, 1981)

Componente	% Cabeza de agave
Agua	70-85
Carbohidratos	10-28
Celulosa	2-5.7
Lignina	3-5
Proteínas	0.2-0.5
Resinas y lípidos	0.6-0.9

2.2.1.2. Horneado

Las cabezas de agave se someten a un tratamiento térmico por al menos 72 horas con la finalidad de hidrolizar los polifruetosanos y hacerlos disponibles para las levaduras durante la fermentación. Los hornos están comúnmente contruidos en la tierra, como hoyos en forma de cono trunco donde se deposita el agave. Previamente, se coloca y enciende leña sobre la que se colocan piedras para que reciban el calor de la combustión por alrededor de 6 horas, hasta que cesa la

emanación de humo; las piedras se cubren con una capa de bagazo o palma para evitar el contacto directo con el agave, que podría provocar una caramelización de los carbohidratos. El maguey se introduce seccionado en 2 o 4 partes según su tamaño y sobre él se extiende al final otra capa de palma y tierra para aislar el horno. También es de uso común el horno de mampostería.

2.2.1.3. Molienda

El material horneado se dispone sobre la plancha circular de un molino, donde es machacado al paso de una pesada rueda de piedra movida frecuentemente por tracción animal. El mosto se conduce a las tinas de fermentación.

2.2.1.4. Fermentación

Se trata de un proceso anaeróbico efectuado principalmente por levaduras - *Saccharomyces cerevisiae* la más importante-, en el que los azúcares del mosto son transformados en etanol, CO₂ y una serie de productos secundarios como ácidos, aldehídos, ésteres y alcoholes superiores. Las dimensiones de las tinas son variables y el tiempo mínimo es de dos días, finalizando en el momento en que cesa la producción de dióxido de carbono pero guiado también por el sabor y olor que el productor percibe como óptimo (Lachance, 1995; Zuazo y Gschaedler, 1998).



Figura 6. a) Cabezas de agave apiladas para su horneado, b) Molienda, c) Fermentación

2.2.1.5. Destilación

El mosto se coloca en un alambique donde es calentado, vaporizado, enfriado y condensado en dos etapas. En la primera destilación se obtienen tres cortes: las puntas, con una graduación alcohólica de 60 °GL aproximadamente, el cuerpo, con 20-40 °GL, y las colas, con un contenido alcohólico inferior. En la segunda destilación se pueden mezclar el cuerpo y colas de la primera para tener un primer corte con 70-85 °GL. El cuerpo y colas de la redestilación finalmente se mezclan hasta conseguir una graduación entre 42 y 50 °GL. Los procedimientos, sin embargo, pueden variar en cada región y con cada productor.

Finalmente, el mezcal puede transitar por procedimientos de abocado y maduración previos a su envasado y etiquetado (SAGARPA, 2005; CNSPMM, 2007; Ortiz y Ramales, 2007). En esta bebida y en el tequila se han identificado ácidos grasos y ésteres etílicos de ácidos grasos. Dado que las plantas poseen cierto contenido de lípidos y a que están sujetas a un proceso que favorece la hidrólisis de estos compuestos, cada especie puede aportar finalmente a la bebida ácidos y ésteres de manera particular, influyendo en su sabor y aroma.

2.3. Los lípidos

Los lípidos constituyen un grupo heterogéneo de compuestos con la característica común de solubilidad en disolventes orgánicos como cloroformo, hexano, éter etílico o metanol. Se pueden subdividir en dos grandes clases: los lípidos simples y los lípidos complejos. Los primeros producen por hidrólisis uno o dos productos diferentes por mol, y los segundos generan tres o más productos por mol. Aunque los términos “neutral” y “polar” se emplean frecuentemente para identificar estas clases, son menos precisos y pueden ser ambiguos; por ejemplo, los ácidos grasos se clasifican comúnmente como neutros a pesar de la presencia del grupo carboxilo.

Los lípidos simples están comprendidos principalmente por ácidos grasos unidos a moléculas con grupos hidroxilo, generalmente glicerol, pero pueden ser también alcoholes de cadena larga o un esteroles. Los ácidos grasos y esteroides libres también se clasifican como lípidos simples. Los lípidos complejos pueden subdividirse en tres categorías: glicerofosfolípidos, que producen por hidrólisis glicerol, ácidos grasos, fosfato inorgánico y una base orgánica o una molécula polihidroxílica; glicoglicerolípidos, que generan por hidrólisis glicerol, ácidos grasos y carbohidratos; esfingolípidos, que contienen una base de cadena larga, ácidos grasos y fosfato inorgánico, carbohidratos u otro compuesto orgánico complejo (Christie, 1987).

La mayoría de los ácidos grasos en las plantas son monocarboxílicos, saturados e insaturados, con cadenas lineales de número par de átomos de carbono. Son comunes el ácido cáprico, mirístico, palmítico, y esteárico, pero aún más los insaturados oleico, linoleico y linolénico. Estos siete ácidos están usualmente presentes en los lípidos de todas las partes de las plantas, predominando los insaturados junto con el palmítico (Hitchcock, 1975). En las hojas los ácidos más abundantes son por lo general el linoleico y linolénico, y el contenido de ácidos saturados no excede el 20 % del total. En la piel de las frutas los ácidos de mayor concentración son el oleico y palmítico y en las semillas los más abundantes son el linoleico, oleico y palmítico. Con base en los contenidos relativos de estos ácidos en las semillas se ha podido agrupar algunas familias. Por ejemplo, entre las que poseen un contenido mayor de ácidos linoleico y oleico, con el linolénico ausente o en cantidades muy pequeñas están Agavaceae, Amaryllidaceae, Compositae y Loasaceae (Shorland, 1963).

El análisis del contenido de ácidos grasos con fines taxonómicos se ha aplicado con éxito en el área de la Microbiología, donde ha sustituido análisis tradicionales para determinar la identidad de las especies, como la determinación de la morfología colonial, la producción de pigmentos, velocidad de crecimiento y

reacciones bioquímicas (Paredes *et al.*, 2001; García, 2005). Se ha visto, por ejemplo, que los ácidos grasos ramificados son comunes en las bacterias Gram negativas, mientras que la mayoría de las Gram positivas presentan sólo ácidos de cadena lineal. Además, las Gram negativas poseen hidroxiácidos, ausentes en aquéllas. Existen procedimientos de análisis establecidos, como el sistema Sherlock, que identifica a los microorganismos con base en los resultados del análisis cromatográfico de ésteres metílicos de los ácidos grasos C9-C20 presentes en los mismos. Se han encontrado distribuciones generales de estos ácidos específicas de varias especies, lo que ha llevado a la construcción de bibliotecas con tal información. El sistema posee una biblioteca para la identificación de 1,500 especies de bacterias y 200 de levaduras. La metodología analítica implica la ruptura de las células y la hidrólisis de componentes lipídicos, seguida de una derivatización con HCl y CH₃OH para su posterior inyección en un cromatógrafo de gases (Sasser, 2001). En la Tabla 5 se muestra la fórmula, el nombre común y sistemático de varios ácidos, desde el decanoico hasta el tetracosanoico, que se estarán empleando a lo largo de este trabajo.

Tabla 5. Fórmula y nombre de algunos ácidos grasos

Fórmula	Nombre común	Nombre sistemático
CH ₃ (CH ₂) ₈ COOH	Cáprico	Decanoico
CH ₃ (CH ₂) ₉ COOH		Undecanoico
CH ₃ (CH ₂) ₁₀ COOH	Láurico	Dodecanoico
CH ₃ (CH ₂) ₁₁ COOH		Tridecanoico
CH ₃ (CH ₂) ₁₂ COOH	Mirístico	Tetradecanoico
CH ₃ (CH ₂) ₁₃ COOH		Pentadecanoico
CH ₃ (CH ₂) ₁₄ COOH	Palmítico	Hexadecanoico
CH ₃ (CH ₂) ₅ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH	Palmitoleico	<i>cis</i> -9-hexadecenoico
CH ₃ (CH ₂) ₁₅ COOH	Margárico	Heptadecanoico
CH ₃ (CH ₂) ₁₆ COOH	Estéarico	Octadecanoico
CH ₃ (CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH	Oleico	<i>cis</i> -9-octadecenoico
CH ₃ (CH ₂) ₃ (CH ₂ CH=CH) ₂ (CH ₂) ₇ COOH	Linoleico	<i>cis,cis</i> -9,12-octadecadienoico
CH ₃ (CH ₂ CH=CH) ₃ (CH ₂) ₇ COOH	Linolénico	<i>cis,cis,cis</i> -9,12,15-octadecatrienoico
CH ₃ (CH ₂) ₁₇ COOH		Nonadecanoico
CH ₃ (CH ₂) ₁₈ COOH	Araquídico	Eicosanoico
CH ₃ (CH ₂) ₁₉ COOH		Heneicosanoico
CH ₃ (CH ₂) ₂₀ COOH	Behénico	Docosanoico
CH ₃ (CH ₂) ₂₁ COOH		Tricosanoico
CH ₃ (CH ₂) ₂₂ COOH	Lignocérico	Tetracosanoico

Los lípidos sirven como materiales de reserva y también se encuentran formando parte de las membranas celulares de las plantas; aquéllos con insaturaciones son importantes para la fluidez de las mismas (Heldt, 2005).

Los lípidos simples se presentan principalmente como acilgliceroles, y una de sus características es la generación de ácidos grasos por hidrólisis. López y Mancilla-Margalli (2002), por ejemplo, encontraron un aumento en la concentración de ácidos grasos de cadena larga durante la cocción de agave. Estos ácidos son importantes por su participación en las propiedades organolépticas de bebidas como el mezcal, sobre todo porque con la presencia de alcohol se forman los ésteres correspondientes, que poseen aromas singulares del tipo floral, frutal, dulce y céreo. Los ésteres son de hecho los compuestos organolépticos más numerosos en las bebidas alcohólicas (Nykänen, 1986; Pinal y Gschaedler, 1998).

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

Identificar y cuantificar los lípidos simples presentes en varias especies de agave mezcalero para contribuir a la caracterización química de estas plantas.

3.2. Objetivos particulares

- Analizar varias especies y/o variedades de agave: *A. salmiana* ssp. *crassispina*, *A. salmiana* var. *salmiana*, *A. angustifolia*, *A. cupreata* y *A. karwinskii*, provenientes de estados de la República Mexicana incluidos en la Denominación de Origen “Mezcal”, empleando la metodología necesaria para la determinación de los compuestos de interés.
- Determinar el perfil de ácidos grasos y de lípidos simples totales en el agave utilizando un procedimiento de extracción de lípidos Bligh-Dyer modificado y cromatografía de gases.
- Comparar los resultados encontrados en las distintas especies de agave.

4. Parte experimental

4.1. Material, reactivos y disolventes

4.1.1. Reactivos y disolventes

Diclorometano (J. T. Baker, Xalostoc, Edo. De México)

Metanol (J. T. Baker, Xalostoc, Edo. De México)

Hexano (J. T. Baker, Xalostoc, Edo. De México)

Butanol (J. T. Baker, Xalostoc, Edo. De México)

Piridina (J. T. Baker, Xalostoc, Edo. De México)

Bis(trimetilsililtrifluoroacetamida), BSTFA (Regis, Morton Grove, IL, USA)

Hexametildisilazano, HMDS (Regis, Morton Grove, IL, USA)

Na₂SO₄ anhidro (J. T. Baker, Xalostoc, Edo. De México)

NaCl (J. T. Baker, Xalostoc, Edo. De México)

KOH (Mallinckrodt Baker, Xalostoc, Edo. De México)

HCl (J. T. Baker, Xalostoc, Edo. De México)

Agua destilada

4.1.2. Estándares

Ésteres etílicos: Octanoato de etilo EE8, Decanoato de etilo EE10, Dodecanoato de etilo EE12, Tridecanoato de etilo EE13, Tetradecanoato de etilo EE14, Pentadecanoato de etilo EE15, Hexadecanoato de etilo EE16, *cis*-9-Hexadecenoato de etilo EE16:1, Heptadecanoato de etilo EE17, Octadecanoato de etilo EE18, *cis*-9-Octadecenoato de etilo EE18:1, *cis,cis*-9,12-Octadecadienoato de etilo EE18:2, *cis,cis,cis*-9,12,15-Octadecatrienoato de etilo EE18:3, Heneicosanoato de etilo EE21, Docosanoato de etilo EE22, Tetracosanoato de etilo EE24 (NU-CHEK-PREP, Elysian, MN, USA)

Ácidos grasos: Octanoico C8, Decanoico C10, Dodecanoico C12, Tridecanoico C13, Tetradecanoico C14-OOH, Pentadecanoico C15, Hexadecanoico C16, cis 9-Hexadecenoico C16:1, Heptadecanoico C17, Octadecanoico C18, cis 9-Octadecenoico C18:1, cis 9,12-Octadecadienoico C18:2, cis 9,12,15-Octadecatrienoico C18:3, Heneicosanoico C21, Docosanoico C22, Tetracosanoico C24 (NU-CHEK-PREP, Elysian, MN, USA)

Monoacilgliceroles: Monooctanoato de glicerilo MG₈, Monotetradecanoato de glicerilo MG₁₄, Monohexadecanoato de glicerilo MG₁₆, Monooctadecanoato de glicerilo MG₁₈, Monooctadecenoato de glicerilo MG_{18:1}, Monooctadecadienoato de glicerilo MG_{18:2} (NU-CHEK-PREP, Elysian, MN, USA)

Diacilgliceroles: Dioctanoato de glicerilo DG₈, Ditetradecanoato de glicerilo DG₁₄, Dihexadecanoato de glicerilo DG₁₆, Dioctadecanoato de glicerilo DG₁₈, Dioctadecenoato de glicerilo DG_{18:1}, Dioctadecadienoato de glicerilo DG_{18:2} (NU-CHEK-PREP, Elysian, MN, USA)

Triacilgliceroles: Trioctanoato de glicerilo TG₈, Tridodecanoato de glicerilo TG₁₂, Tritetradecanoato de glicerilo TG₁₄, Trihexadecanoato de glicerilo TG₁₆, Trioctadecanoato de glicerilo TG₁₈, Trioctadecenoato de glicerilo TG_{18:1}, Trioctadecadienoato de glicerilo TG_{18:2} (NU-CHEK-PREP, Elysian, MN, USA)

β-sitosterol (Fluka, France)

4.1.3. Aparatos

Licadora Waring, procesador de alimentos Moulinex, estufa J.M. Ortíz, agitador Vortex Thermolyne, rotaevaporador Büchi, material de vidrio común de laboratorio.

4.2. Muestras

Se analizaron cinco agaves, cada uno de ellos empleado en lugares de la República Mexicana incluidos en la declaración de protección a la Denominación de Origen “Mezcal”. Su identidad se indica en la Tabla 6 junto con su origen y edad. Los datos fueron proporcionados por los productores. Se trata en todos los casos de cabezas de magueyes (una por cada agave) con aproximadamente un año de castración, listas para su horneado excepto en el caso de *A. angustifolia* y *A. salmiana* var. *salmiana*, que se colectaron en campo.

Tabla 6. Muestras de agave analizadas

Agave	Origen	Ejido/lugar	Edad
<i>A. salmiana</i> ssp. <i>crassispina</i>	Charcas, San Luis Potosí	Miguel Hidalgo	8 años
<i>A. angustifolia</i>	Santiago Matatlán, Oaxaca	Espina dorada	7 años
<i>A. cupreata</i>	Chilapa, Guerrero	Miraflor	8 años
<i>A. karwinskii</i>	Santa Catarina, Oaxaca	Santa Catarina	8 años
<i>A. salmiana</i> var. <i>salmiana</i>	San Felipe, Guanajuato	El carretón	8 años

1. *A. salmiana* Otto ex Salm-Dyck ssp. *crassispina* (Trel.) Gentry
Charcas, San Luis Potosí



Figura 7. *A. salmiana* ssp. *crassispina*
Fuente: <http://public.fotki.com/maarten/s/>

2. *A. angustifolia* Haw

Santiago Matatlán, Oaxaca



Figura 8. *A. angustifolia*

Fuente: <http://myweb.tiscali.co.uk/agavepages/>

3. *A. cupreata* Trel & A. Berger

Chilapa, Guerrero



Figura 9. *A. cupreata*

Fuente: http://www.globetrotters.ch/agavaceae/agaveinfuehrung_en.asp

4. *A. karwinskii* Zucc.

Santa Catarina, Oaxaca



Figura 10. *A. karwinskii*

Fuente: <http://myweb.tiscali.co.uk/agavepages/>

5. *A. salmiana* var. *salmiana* Otto ex Salm-Dyck

San Felipe, Guanajuato



Figura 11. *A. salmiana* var. *salmiana*

Fuente: http://www.globetrotters.ch/agavaceae/agaveinfuehrung_en.asp

4.3. Preparación de la muestra

Para extraer los lípidos del agave se utilizó el método Bligh-Dyer con CH_2Cl_2 , disolvente que en análisis anteriores había ofrecido una mayor cuantitatividad en la extracción (Peña et al., 2004). Para este fin, hubo que realizar primero la determinación del contenido de humedad en las muestras, preparadas como sigue:

4.3.1. Homogeneización de la muestra

Las fracciones de las cabezas de cada agave se cortaron en trozos pequeños con cuchillo. Luego, se juntaron y revolvieron tales trozos y se tomó una porción de ellos para picarlos en un procesador de alimentos Moulinex. Llevada a cabo la homogeneización se realizó entonces la determinación de humedad y la obtención del extracto lipídico utilizando la extracción Bligh-Dyer modificada.

4.3.2. Determinación de humedad

10 g de agave homogeneizado se sometieron a secado en estufa de vacío a 50 C por 45 horas, llevando a cabo la determinación por triplicado.

4.4. Obtención del extracto lipídico

Se analizaron 50 g de agave homogeneizado de cada especie por triplicado. Se utilizó una extracción Bligh-Dyer con los volúmenes de disolventes que se indican en la Tabla 7, calculados en función del contenido de humedad de cada agave.

Tabla 7. Extracción Bligh-Dyer: volúmenes de disolventes

Agave	Agua (g/50 g de muestra)	mL de CH ₂ Cl ₂ (1ª adición)	mL de CH ₃ OH	mL de CH ₂ Cl ₂ (2ª adición)	mL de agua
<i>A. salmiana</i> ssp. <i>crassispina</i>	33.44	42	84	42	42
<i>A. angustifolia</i>	42.62	53.5	107	53.5	53.5
<i>A. cupreata</i>	30.92	39	78	39	39
<i>A. karwinskii</i>	33.11	41	82	41	41
<i>A. salmiana</i> var. <i>salmiana</i>	36.54	46	92	46	46

El procedimiento consistió en extraer la muestra con el volumen indicado de CH₂Cl₂ (1ª adición) y CH₃OH durante 2 minutos en una licuadora Waring habiendo agregado también 500 µL de estándar interno (ác. tridecanoico, C13 16.2 mg/mL, el cual no se había detectado en ninguna de las muestras). Después, se realizó la 2ª adición de CH₂Cl₂ al sistema, se agitó por 30 s en la licuadora y se adicionó el agua, agitando por otros 30 s. El extracto se filtró a través de papel filtro Whatman N°5 sobre un embudo Büchner conectado a un matraz kitasato con succión ligera de vacío. Las fases se dejaron separar en un embudo de separación. El residuo de la extracción se lavó con 50 mL de CH₂Cl₂/CH₃OH 9:1 por 2 min; el lavado se filtró y se colocó también en el embudo de separación. Una vez separada la fase orgánica, se concentró ésta en rotaevaporador para después aforar a 10 mL con CH₂Cl₂, que constituyó el extracto lipídico (ver Fig. 12).

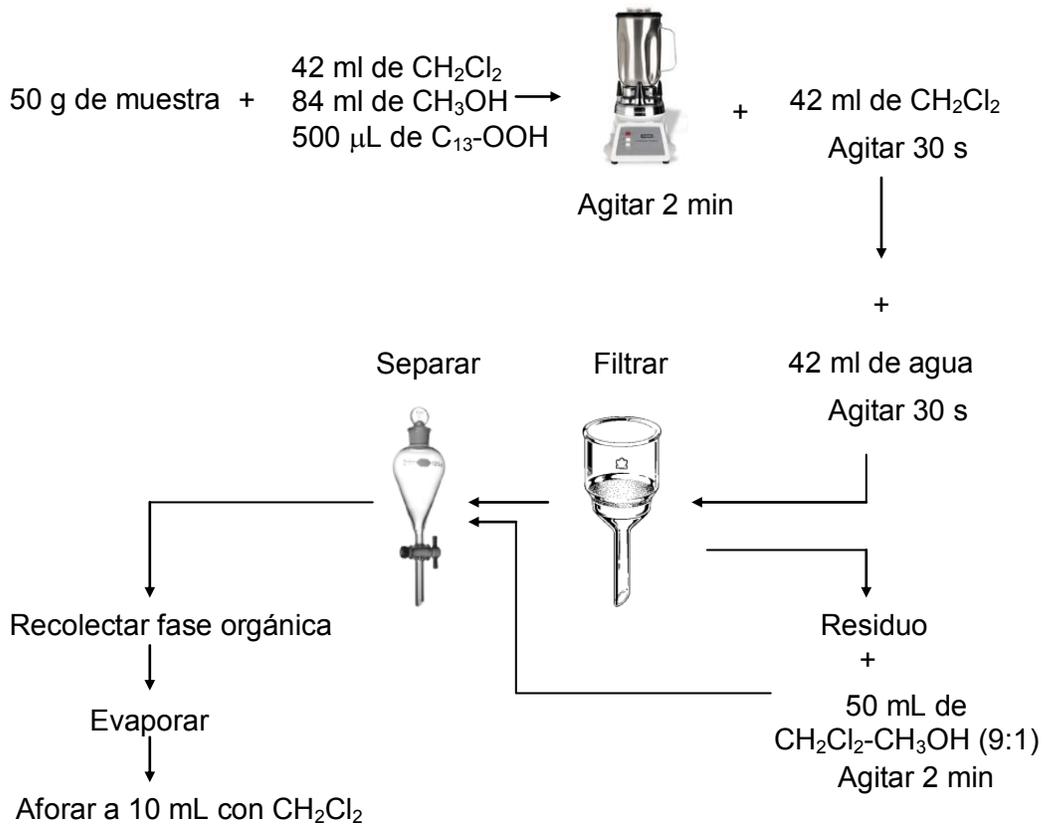


Figura 12. Obtención del extracto lipídico, caso del *A. salmiana ssp. crassispina*

4.5. Determinación de la distribución general de ácidos grasos

4.5.1. Hidrólisis y esterificación de los lípidos

Se colocaron 250 µL del extracto lipídico correspondiente en un vial con tapón de teflón y se evaporó el disolvente con corriente de N₂, se adicionaron 1.5 mL de KOH al 5% en etanol y se calentó la muestra a 80 °C por 30 min. Se agregó entonces 1.5 mL de HCl al 10% en etanol y se calentó a 80 °C durante 1 hora. Los ésteres etílicos (EE) de ácidos grasos se extrajeron dos veces con 2 mL de hexano y el extracto así obtenido se lavó con 2 mL de disolución de bicarbonato al 4%. La disolución de EE se lavó luego con 1 mL de agua destilada, se secó con

Na_2SO_4 anhidro y se concentró con flujo de N_2 para aforar finalmente a 1 mL. Se inyectó $1\ \mu\text{L}$ en el cromatógrafo de gases (ver Fig. 13).

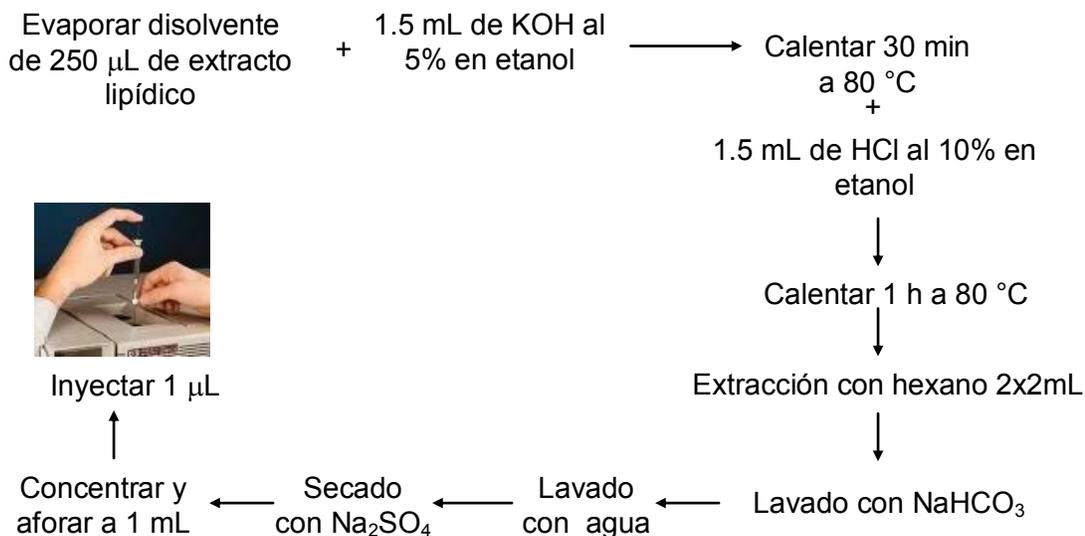


Figura 13. Derivatización del extracto lipídico para la determinación de la distribución general de ácidos grasos

4.5.2. Identificación de los ésteres etílicos de ácidos grasos

Para la identificación de los EE se empleó el tiempo de retención relativo, t_r , de los estándares correspondientes. El estándar interno fue el EE13. Se realizó una confirmación de la identidad de los analitos utilizando detección por espectrometría de masas.

4.5.3. Cuantificación de los ésteres etílicos de ácidos grasos

La cuantificación de EE se realizó mediante calibración relativa por área de pico, con el EE13 como estándar interno. Para la determinación de ésteres de ácidos grasos saturados se utilizó una calibración con EE16, y para los insaturados con EE18:2. Debido a que en el análisis de la muestras se había visto que las

concentraciones de los diferentes EE variaba en un intervalo muy amplio, se decidió preparar curvas de calibración para EE para concentraciones bajas y para concentraciones altas. Las concentraciones de los estándares de calibración en cada punto se indican en la Tabla 8. La concentración del estándar interno en todos los casos fue de 201 ppm (mg/L).

Tabla 8. Concentraciones de los estándares para las curvas de calibración de EE

Estándar	Concentración (ppm)
EE16	
Concentraciones bajas	0.043, 6.46, 12.9, 19.4, 25.9, 32.3
Concentraciones altas	108, 151, 194, 237, 280, 323
EE18:2	
Concentraciones bajas	0.038, 0.382, 7.64, 11.5, 17.2, 22.9
Concentraciones altas	23.9, 143, 262, 382, 501, 620

4.5.4. Condiciones cromatográficas

Cromatógrafo de gases HP modelo 5890 series II con sistema de inyección en columna, control electrónico de presión y detector de ionización de flama. Software HP Chemstation versión A.03.34. Columna capilar Quadrex Carbowax/BTR (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m).

Programa de temperatura: la temperatura inicial del horno fue de 50 °C por 2 min, incrementando entonces a 10 °C/min hasta 250 °C, con un tiempo final de espera de 10 min. La temperatura del detector fue de 250 °C y la zona del inyector se mantuvo 3 °C arriba de la temperatura del horno (Oven Track On). El gas acarreador fue H₂ a flujo constante de 2.44 mL/min.

Para confirmar la identidad de los EEAG se utilizó la detección por espectrometría de masas. Las condiciones fueron:

Cromatógrafo de gases HP modelo 5890 con inyector split/splitless, acoplado a un espectrómetro de masas HP 5971 (impacto electrónico, analizador cuadrupolar). Software HP G1034C versión C.03.00. Columna capilar Quadrex Carbowax/BTR (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m).

El programa de temperatura fue el mismo que en el caso de la detección por ionización de flama. La temperatura del inyector fue de 250 °C y el gas acarreador fue He a 1 mL/min. La temperatura de la línea de transferencia se mantuvo en 280 °C y la de la fuente de ionización en 175 °C. El potencial de ionización fue de 70 eV y la adquisición se realizó en modo de barrido total (SCAN).

4.5.5. Evaluación de la formación de derivados de ácidos grasos

Para probar el desempeño del tratamiento llevado a cabo al extracto lipídico (punto 4.5.1), que implica una hidrólisis, esterificación, reextracción y limpieza del extracto de ésteres etílicos de ácidos grasos, se preparó una disolución con los estándares de ácidos grasos y acilgliceroles que se indican en la Tabla siguiente:

Tabla 9. Estándares para evaluar la formación del derivado ácidos grasos

Estándar	Concentración (ppm)	Estándar	Concentración (ppm)
TG ₁₀	2.28	DG ₁₈	44.7
MG ₁₄	9.90	TG _{18:1}	475
TG ₁₄	16.3	C18:1	475
C16	202	MG _{18:2}	1021
DG ₁₆	467	DG _{18:2}	978
TG ₁₆	388	TG _{18:2}	990
C16:1	40.2	DG ₂₀	19.6
C18	52.7	C24	59.4

De esta disolución se tomaron 100 μ L y se adicionaron a 250 μ L del extracto lipídico de *A. cupreata*, que había mostrado tener el menor contenido de lípidos,

siguiendo entonces el procedimiento para la hidrólisis y esterificación descrito en el punto 4.5.1, y calculando los porcentajes de recuperación.

4.6. Determinación de la distribución general de lípidos simples totales

4.6.1. Derivatización del extracto lipídico

1 mL del extracto lipídico colocado en un vial con tapón de teflón se evaporó bajo corriente de N_2 , se adicionaron 2 mL de agua, 1 mL de disolución saturada de NaCl y 2 mL de butanol al 10% en hexano. La mezcla se agitó en vórtex durante 2 min, la fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro, se aforó a 2 mL y se adicionaron 100 μL de BSTFA, 100 μL de HMDS y 50 μL de piridina, se calentó entonces a 80 $^{\circ}C$ por una hora y se inyectó 1 μL al cromatógrafo de gases (Figura 14).

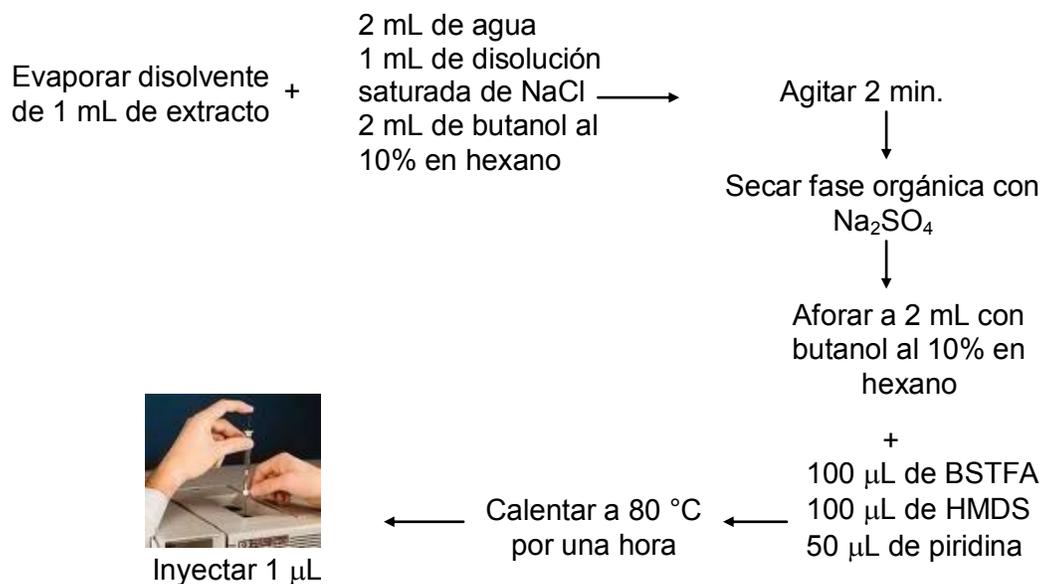


Figura 14. Derivatización del extracto lipídico para la determinación de la distribución general de lípidos simples totales

4.6.2. Identificación de lípidos simples

La identificación de los ácidos grasos libres y de los acilgliceroles en las muestras se llevó a cabo utilizando los tiempos de retención relativos al del ácido C13, obtenidos con los estándares respectivos.

4.6.3. Cuantificación de lípidos simples

Se construyeron curvas de calibración relativas por área de pico para C16; C18s (conjunto de ácidos de 18 átomos de C) con el estándar de C18:2; β -sitosterol; monoacilgliceroles con el monoctadecadienoato de glicerilo ($MG_{18:2}$); diacilgliceroles con el dioctadecadienoato de glicerilo ($DG_{18:2}$); y triacilgliceroles con el trihexadecanoato de glicerilo (TG_{16}). Se prepararon 2 mL de cada uno de estos estándares en las concentraciones señaladas en la Tabla 10. La concentración del estándar interno (C13) fue de 394 ppm. A cada disolución se le adicionó 100 μ L de BSTFA, 100 μ L de HMDS y 50 μ L de piridina, se calentó a 80 °C por una hora y se inyectó 1 μ L al cromatógrafo de gases.

Tabla 10. Concentraciones de los estándares para las curvas de calibración de lípidos simples

Estándar	Concentraciones (ppm)
C16	0.999, 20.0, 40.0, 60.0, 80.0, 100, 120
C18:2	0.941, 37.6, 75.2, 113, 150, 188, 226
β -sitosterol	1.36, 27.1, 54.3, 81.4, 109, 136
$MG_{18:2}$	1.54, 30.9, 61.8, 92.7, 124, 154
$DG_{18:2}$	118, 237, 355, 474, 592, 710
TG_{16}	10.0, 400, 601, 801, 1001, 1201, 1601, 2002

4.6.4. Condiciones cromatográficas

Cromatógrafo de gases HP modelo 5890 series II con sistema de inyección en columna, control electrónico de presión y detector de ionización de flama. Software HP Chemstation versión A.03.34. Columna capilar ZB-5HT Zebron (15 m x 0.25 mm x 0.10 μm).

Programa de temperatura: La temperatura inicial del horno fue de 45 °C por 1.5 min, aumentando entonces a 20 °C/min hasta 250 °C y de ahí a 10 °C /min hasta 380 °C, manteniéndose en esta temperatura por 10.25 min. La temperatura del detector fue de 380 °C y la zona del inyector se mantuvo 3 °C arriba de la temperatura del horno (Oven Track On). El gas acarreador fue H₂ a flujo constante de 2.2 mL/min.

4.6.5. Evaluación de la formación del derivado de lípidos simples

Para probar el desempeño del tratamiento al que se sometió el extracto lipídico para el análisis de lípidos simples totales se prepararon las siguientes disoluciones estándar: C₁₆= 4.99 mg/mL, C_{18:2}= 4.70 mg/mL, β -sitosterol= 6.78 mg/mL, monoacilglicerolés MG₁₆= 3.61 mg/mL y MG_{18:2}= 4.11 mg/mL, diacilglicerolés DG₁₆= 14.3 mg/mL y DG_{18:2}= 15.3 mg/mL, y triacilglicerolés TG₁₆= 24.8 mg/mL y TG_{18:2}= 25.3 mg/mL. Se tomó 1 mL de cada disolución y se aforó a 25 mL. De ahí se tomaron 0.25 mL y se adicionaron a 1 mL del extracto lipídico de *A. cupreata*, siguiendo entonces el procedimiento de derivatización del extracto lipídico (punto 4.6.1).

5. Resultados y discusión

5.1. Obtención del extracto lipídico

La determinación de la distribución general de ácidos grasos en los agaves, así como la de lípidos simples totales, se realizó mediante un tratamiento particular del extracto lipídico de las muestras de agave. El procedimiento para obtener este extracto está basado en el trabajo de Bligh-Dyer (1959), que consiste en someter la muestra a extracción con una mezcla de $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CHCl}_3$ empleando volúmenes tales que las proporciones de cloroformo-metanol-agua de la muestra sean 1:2:0.8. En este paso el objetivo es penetrar en la matriz mediante la formación de un sistema ternario monofásico y a la vez romper las asociaciones entre los lípidos y los componentes celulares. En una segunda adición de cloroformo se incrementa la disolución de los lípidos y finalmente, adicionando agua para que la relación de volúmenes sea 2:2:1.8, se consigue la formación de un sistema bifásico donde la fase inferior consiste en su mayor parte de cloroformo con los lípidos extraídos y la superior de agua/metanol con componentes no lipídicos. (Smedes y Thomansen, 1996). El empleo de CH_2Cl_2 mejora la cuantitatividad del procedimiento posiblemente por una mejor interacción con el tejido húmedo al aumentar un poco la polaridad de la fase extractante. La extracción Bligh-Dyer se ha utilizado con éxito en diversas matrices, incluyendo vegetales (Fishwick y Wright, 1977; Manirakiza *et al.*, 2001).

Con el fin de calcular los volúmenes necesarios de CH_2Cl_2 y CH_3OH para tener una relación inicial de diclorometano-metanol-agua de 1:2:0.8, que forman un sistema ternario monofásico, hubo que determinar la humedad en las muestras de agave. Los resultados obtenidos, junto con su desviación estándar, fueron:

A. salmiana ssp. crassispina: 66.88 % \pm 0.27 %

A. angustifolia: 85.25 % \pm 0.26 %

A. cupreata: 61.85 % \pm 0.17 %

A. karwinskii: 66.22 % \pm 0.15 %

A. salmiana var. *salmiana*: 73.09 % \pm 0.14 %

Con estos datos se calculó la cantidad de agua contenida en 50 g de agave de cada especie y a partir de los valores obtenidos (ver Tabla 7, punto 4.4) se calcularon también los volúmenes de CH₂Cl₂ y CH₃OH con los que se tendría el sistema monofásico inicial. Asimismo, se calcularon los volúmenes necesarios de CH₂Cl₂ y agua para que la relación final de diclorometano-metanol-agua fuese de 2:2:1.8.

5.2. Distribución general de ácidos grasos

5.2.1. Ácidos grasos identificados

Siguiendo el procedimiento para la determinación de la distribución general de ácidos grasos señalado en el punto 4.5, se identificaron 16 de estos ácidos – como ésteres etílicos- en los cinco agaves analizados, desde el EE10 hasta el EE24. En la Tabla 11 se indican los tiempos de retención de los ésteres, relativos al del EE13 (t_r : 12.9 min), obtenidos con estándares bajo las condiciones cromatográficas descritas en el punto 4.5.3. También se identificaron los ésteres EE20 y EE23, utilizando detección por espectrometría de masas.

Tabla 11. t_r relativos de los estándares de EE

EE	t_r relativo (min)	EE	t_r relativo (min)
EE10	-3.2	EE18:1	4.8
EE12	-1.0	EE18:2	5.2
EE14	1.0	EE18:3	5.7
EE15	1.9	EE21	6.9
EE16	2.9	EE22	7.7
EE16:1	3.1	EE24	9.1
EE17	3.7		
EE18	4.6		

El cromatograma de ésteres etílicos de ácidos grasos de *A. salmiana* ssp. *crassispina* se presenta en la Figura 15. Como se observa, el éster etílico del ácido linoleico (EE18:2) posee la mayor área, seguido por el palmítico (EE16), orden que se repite en las otras muestras de agave (Figs. 16-19). La resolución obtenida entre el EE18 y el EE18:1 es de 2.3, y este valor se mantiene en el análisis de *A. angustifolia* y *A. cupreata*, pero disminuye a 1.6 en el caso de *A. karwinskii* y *A. salmiana* var. *salmiana* por un aumento en el área de los picos, en especial del EE18:1. En el análisis de estos dos últimos agaves se presenta también la resolución mínima entre el EEC16 y EEC16:1, de 2.4; de cualquier forma la resolución es buena.

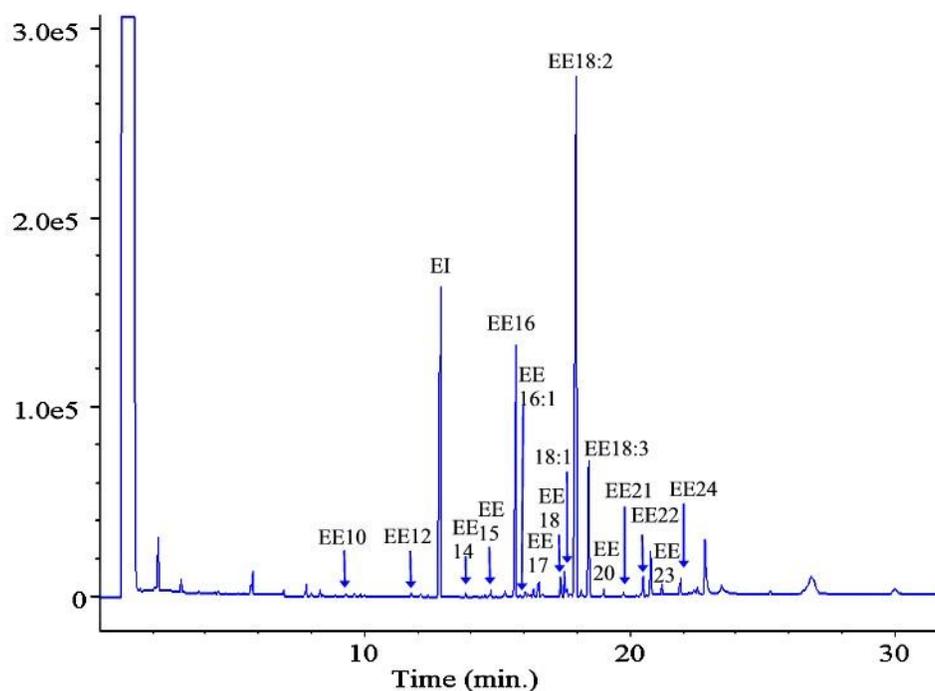


Figura 15. Cromatograma de EE de los ácidos grasos de *A. salmiana* ssp. *crassispina*

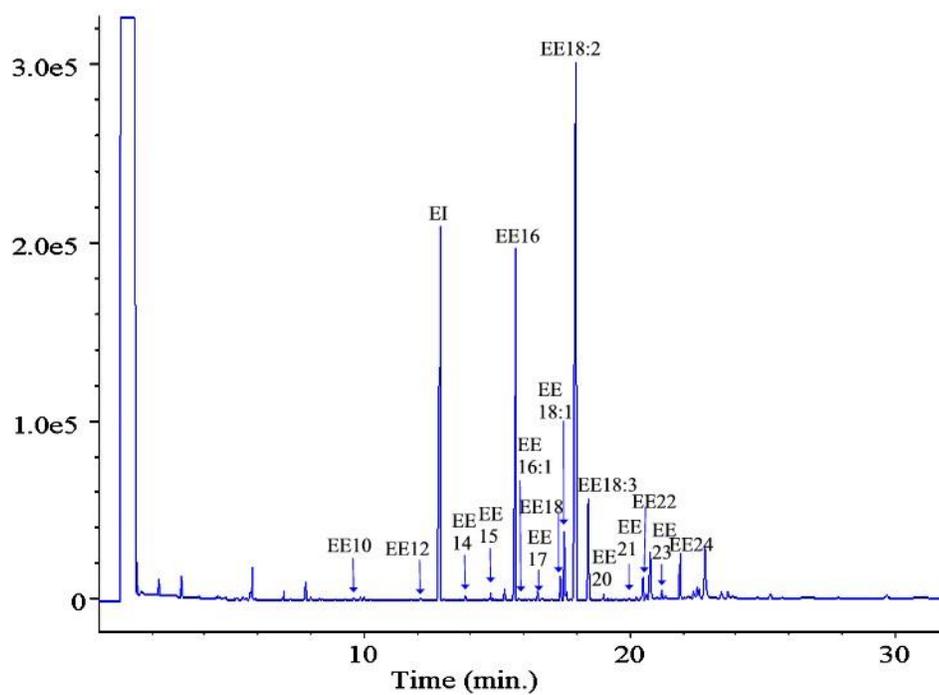


Figura 16. Cromatograma de EE de los ácidos grasos de *A. angustifolia*

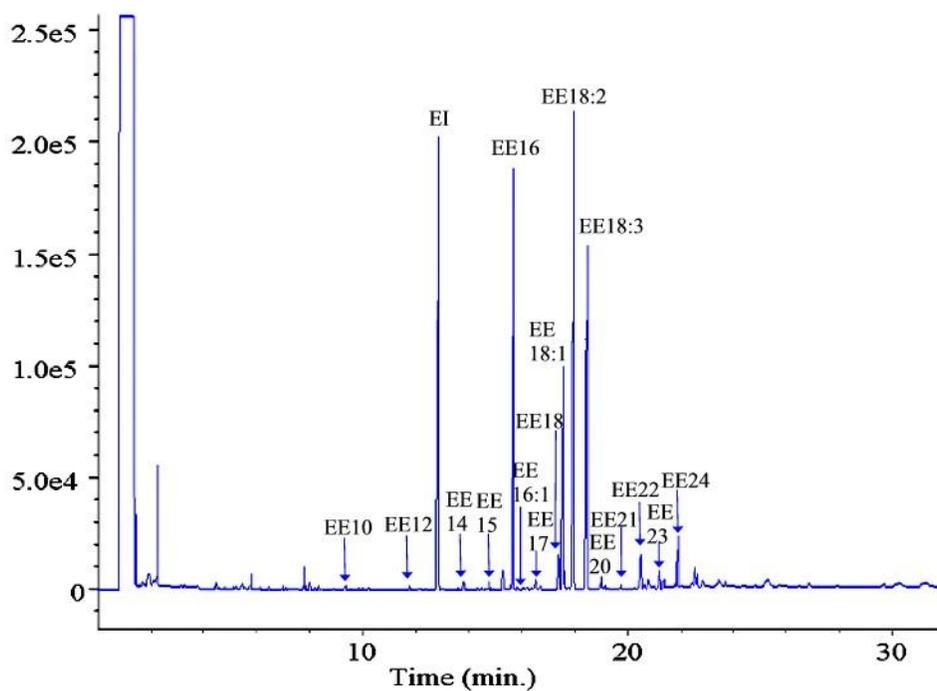


Figura 17. Cromatograma de EE de los ácidos grasos de *A. cupreata*

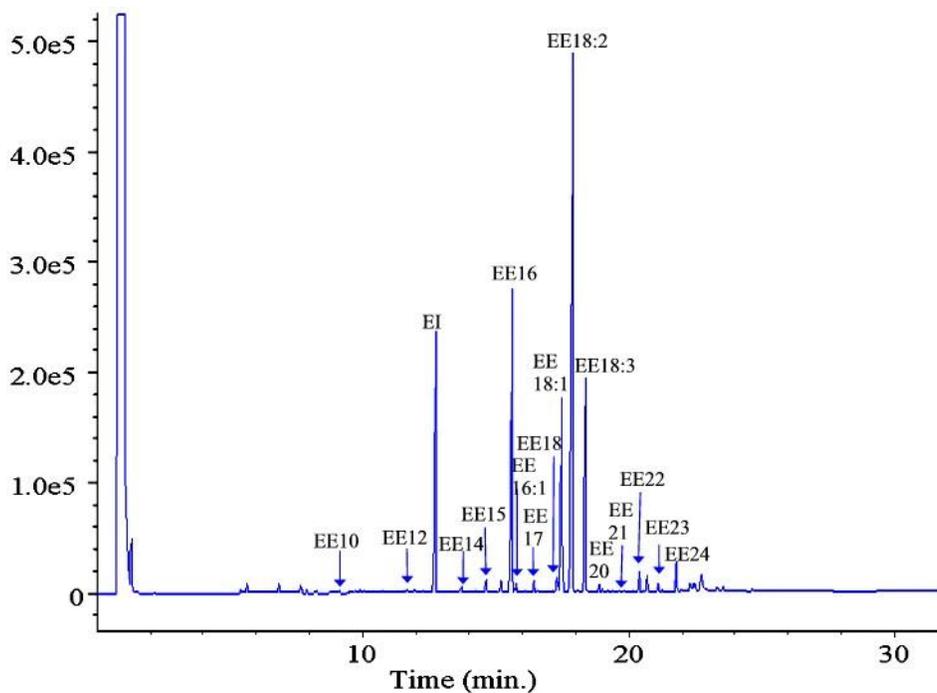


Figura 18. Cromatograma de EE de los ácidos grasos de *A. karwinskii*

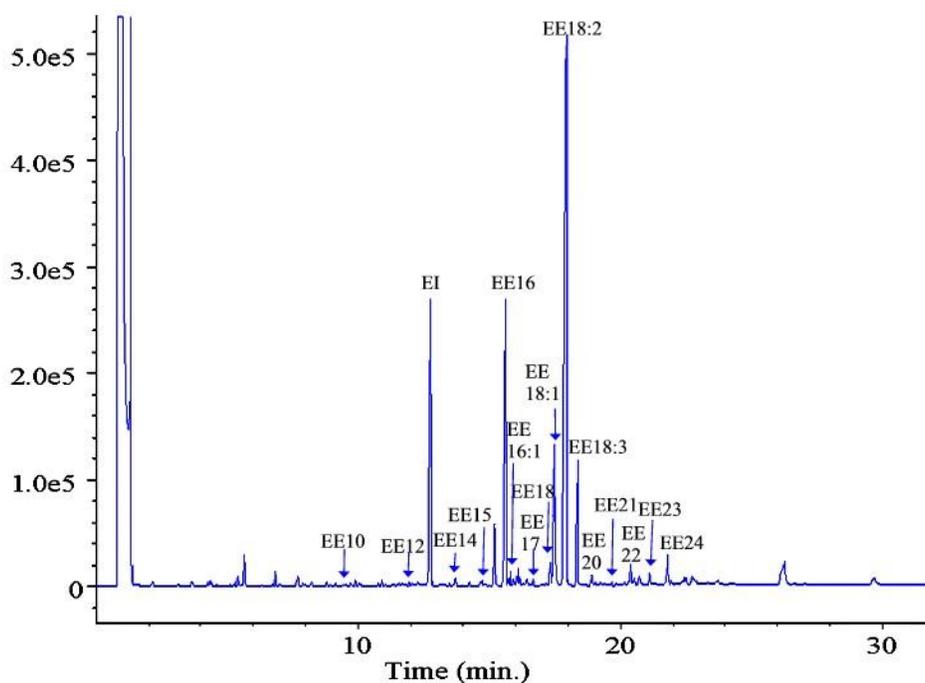


Figura19. Cromatograma de EE de los ácidos grasos de *A. salmiana var. salmiana*

5.2.2. Curvas de calibración de ésteres etílicos de ácidos grasos

En la Tabla 12 aparecen los resultados de la calibración para los EE de ácidos grasos saturados e insaturados. Ambas calibraciones se realizaron en dos intervalos de concentración y presentan una adecuada linealidad, con coeficientes de determinación $r^2 > 0.99$

Tabla 12. Resultados de la calibración de EE de ácidos grasos*

Grupo	Pendiente	Intercepto	r^2
EE de ácidos saturados			
Concentración baja	0.9986	0.0008	0.9998
Concentración alta	0.9593	-0.0251	0.9996
EE de ácidos insaturados			
Concentración baja	0.9895	0.0006	0.9998
Concentración alta	0.9459	0.0065	1

*Véase el punto 4.5.3 para conocer los estándares de calibración y sus concentraciones

5.2.3. Concentración de ácidos grasos en los diferentes agaves analizados

Los valores calculados de concentración de EE se han convertido a datos de concentración de ácidos grasos (C), y se indican en la Tabla 13 para cada una de las muestras de agave analizadas. Como se puede apreciar, la precisión del método es buena, ya que los coeficientes de variación son inferiores en todos los casos a 10% y en su mayoría incluso menores a 5%.

Tabla 13. Concentración promedio* de ácidos grasos en los agaves analizados ($\mu\text{g/g}$ de agave)

Ácido	<i>A. salmiana</i> ssp. <i>crassispina</i>		<i>A. angustifolia</i>		<i>A. cupreata</i>		<i>A. karwinskii</i>		<i>A. salmiana</i> var. <i>salmiana</i>	
	$\mu\text{g/g}$	CV (%)	$\mu\text{g/g}$	CV (%)	$\mu\text{g/g}$	CV (%)	$\mu\text{g/g}$	CV (%)	$\mu\text{g/g}$	CV (%)
C10	0.40	5.7	0.11	4.3	0.23	7.0	0.32	3.4	0.42	3.1
C12	1.20	1.5	0.65	3.6	0.73	2.8	1.35	5.8	1.28	2.8
C14	1.87	1.6	1.36	3.6	1.65	1.3	2.77	3.3	3.52	3.8
C15	3.04	2.5	2.65	2.4	1.84	0.68	6.76	0.87	2.23	6.0
C16	130	1.3	163	1.7	128	1.6	210	0.51	172	4.4
C16:1	1.63	1.6	0.96	9.8	0.85	2.2	3.82	2.4	4.96	1.8
C17	7.06	2.3	3.55	2.4	2.36	1.5	6.44	1.4	3.67	3.9
C18	10.6	1.4	9.64	1.1	9.94	0.83	13.7	1.2	17.0	4.2
C18:1	14.1	0.5	30.5	2.1	59.4	1.2	155	2.8	110	4.2
C18:2	326	2.2	287	3.2	137	1.4	459	0.42	443	2.8
C18:3	70.0	4.3	39.4	4.2	86.6	1.5	108	1.8	50.0	3.8
C20	4.16	2.3	1.75	8.3	2.88	0.36	4.29	2.9	4.69	4.3
C21	2.29	1.8	0.56	1.4	0.97	4.7	1.07	8.8	1.58	4.1
C22	10.9	1.7	9.61	3.6	8.48	2.8	12.7	3.7	10.3	1.6
C23	7.72	4.0	4.14	4.7	4.86	4.3	5.39	3.3	7.62	1.1
C24	9.57	3.8	18.8	6.5	14.8	3.3	18.2	2.9	15.4	4.8
Total	601	1.4	574	1.9	461	0.76	1008	0.57	849	2.0

*Número de réplicas, n=3

En la Figura 20 se encuentra la comparación general de los perfiles de ácidos grasos de las distintas muestras de agave. Se observa un mayor contenido del ácido palmítico (C16) y de los ácidos insaturados de 18 átomos de carbono, en especial del linoleico (C18:2). La muestra que presenta la mayor concentración de estos ácidos mayoritarios (C16, C18:1, C18:2 y C18:3) es la de *A. karwinskii* (931 $\mu\text{g/g}$), seguido en orden descendente por *A. salmiana* var. *salmiana* (776 $\mu\text{g/g}$), *A. salmiana* ssp. *crassispina* (540 $\mu\text{g/g}$), *A. angustifolia* (520 $\mu\text{g/g}$) y *A. cupreata* (411 $\mu\text{g/g}$). Este último, sin embargo, presenta mayores concentraciones de C18:1 y C18:3 que los dos anteriores. La concentración de los demás ácidos va desde 0.11 $\mu\text{g/g}$ (C10) hasta 18.8 $\mu\text{g/g}$ (C24), ambos en *A. angustifolia*. En todos los casos el ácido decanoico (C10) presentó las menores concentraciones.

Los ácidos grasos corresponden al grupo de compuestos minoritarios en las bebidas alcohólicas, cuya importancia reside en conferir características organolépticas específicas a cada bebida. Se han detectado ácidos de cadena C2-C16 en tequila (Peppard y Benn, 1996; López, 1999), que pueden proveer aromas de tipo agrio, a queso y a grasa, en tanto su concentración se encuentre por encima del umbral de olor, que para los ácidos C10-C16 se encuentra alrededor de 10 ppm y aumenta con la longitud de la cadena. Sin embargo, los ésteres etílicos correspondientes poseen no sólo aromas más agradables sino también umbrales inferiores (Tabla 14).

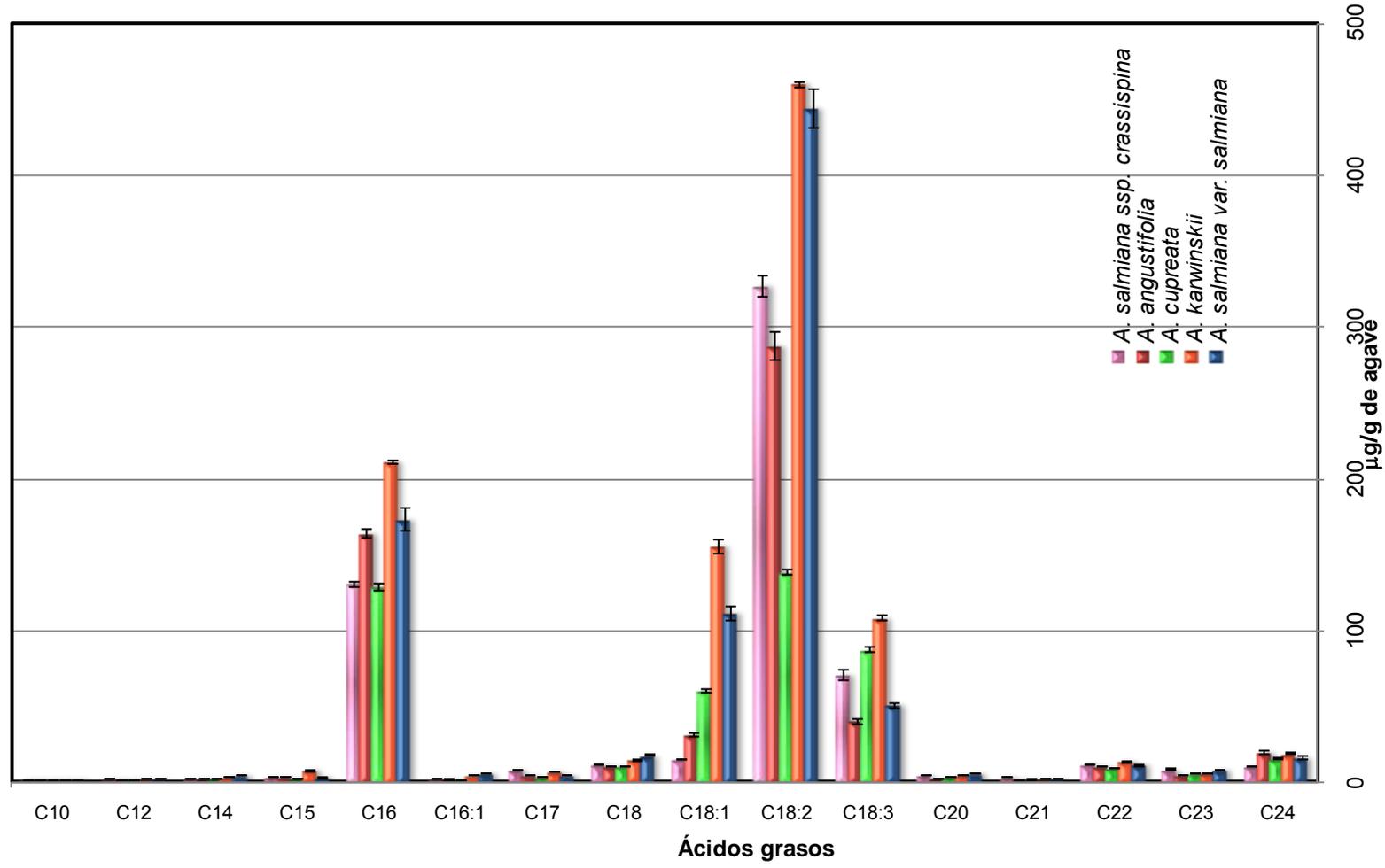


Figura 20. Distribución general de ácidos grasos de los agaves analizados

Tabla 14. Olor y sabor de los ésteres etílicos

Éster	Descripción de aroma y sabor
EEC ₁₀	Olor dulce, frutal, vino-cognac, céreo. Umbral: 0.51 ppm (en vino) Sabor dulce, frutal a manzana a 20 ppm
EEC ₁₂	Olor dulce, floral, céreo. Umbral: 2 ppm (en cerveza) Sabor frutal graso a 50 ppm
EEC ₁₄	Olor dulce, céreo. Umbral: 2 ppm (en cerveza) Sabor dulce, céreo con suave carácter graso a 60 ppm
EEC ₁₅	Olor graso-céreo
EEC ₁₆	Olor dulce, céreo. Umbral: >2 ppm (en agua) Sabor céreo, frutal con matiz vainilla
EEC ₁₈	Casi inodoro, sabor céreo
EEC _{18:1}	Suave olor dulce, aceitado
EEC _{18:2}	Olor graso, aceitado
EEC _{18:3}	Olor graso, aceitado

Fuente: Leffingwell, Flavor-Base 1989-2007

Además, en las bebidas alcohólicas los ésteres etílicos conforman el grupo más numeroso de compuestos organolépticos, probablemente por la presencia de etanol (Nykänen, 1986; Russell, 2006); se ha visto que en presencia de mayores concentraciones de este alcohol en las bebidas se producen más ésteres (Engan, 1981). A partir de estas consideraciones, es posible prever una relación entre el contenido de ácidos grasos y ésteres etílicos y la materia prima de los mezcales, pues aquéllas especies con mayor contenido de lípidos simples podrán aportar una mayor cantidad de estos grupos de compuestos en las bebidas, pudiendo incluso ser posible una diferenciación entre los tipos mixto y 100% agave con base en los contenidos de estos grupos en el mezcal, tomando en cuenta también el incremento o disminución de algunos de ellos a lo largo del proceso de producción.

Como se aprecia en la Tabla 14, el olor del decanoato de etilo es del tipo frutal, a vino-cognac, y al incrementarse el número de carbonos el olor de los ésteres tiende a ser más suave hasta ser finalmente del tipo graso o aceitado. En cuanto a

su importancia sobre las características que imparten a las bebidas alcohólicas, hay que tomar en cuenta que los compuestos minoritarios juegan un papel fundamental en la impartición de aroma y gusto específico de éstas (Nykänen y Suomalainen, 1983, De León *et al.*, 2006), y si bien son los alcoholes de fusel² los que forman cuantitativamente el grupo mayoritario en las bebidas alcohólicas, cada éster contribuye con una nota particular e influye sobre el aroma total.

La presencia de ésteres etílicos de ácidos grasos en bebidas como mezcal y tequila se encuentra documentada en varios estudios. De León *et al.* (2006) han informado sobre la detección de los ésteres EE2, EE4, EE5, EE6, EE8, EE10, EE12, EE16 y EE18 en mezcal. Asimismo, Peppard (1996), López (1999), Vallejo-Cordoba *et al.* (2004) detectaron la presencia de ésteres etílicos de ácidos grasos en tequila, incluyendo al EE16:1, EE18:1, EE18:2 y EE18:3. Capella y Covarrubias (2007) cuantificaron EE18:1 y EE18:2 hasta en 12.7 y 65.7 ppm, respectivamente.

El ácido decanoico (C10) es el compuesto minoritario entre los diversos ácidos identificados en los agaves estudiados (Figura 21). *A. angustifolia* presenta el menor contenido del mismo, mientras que los dos tipos de *A. salmiana* los mayores (0.42 µg/g en la variedad *salmiana*). La concentración de los ácidos C10 – C15 en los agaves se incrementa con la longitud de la cadena, como se ve en la Figura 21; el *A. angustifolia* muestra la menor concentración de los ácidos C10, C12 y C14, cuyos valores se encuentran incluso por debajo de los de *A. cupreata*. No obstante, la concentración total de los ácidos mayoritarios (C16, C18:1, C18:2 y C18:3) en *A. cupreata* es la menor de los cinco agaves. Los EE de este intervalo presentan el típico carácter afrutado y dulce de los ésteres, y de acuerdo a los resultados obtenidos, la mayor aportación sería presentada por el *A. salmiana* var. *salmiana* y el *A. karwinskii*. En este último el contenido de C15 es particularmente alto.

² Entre los alcoholes más importantes se encuentran: 3-metil-1-butanol, 2-metil-1-butanol, 2-metil-1-propanol, 1-butanol, 2-butanol, n-propanol y 2-feniletanol.

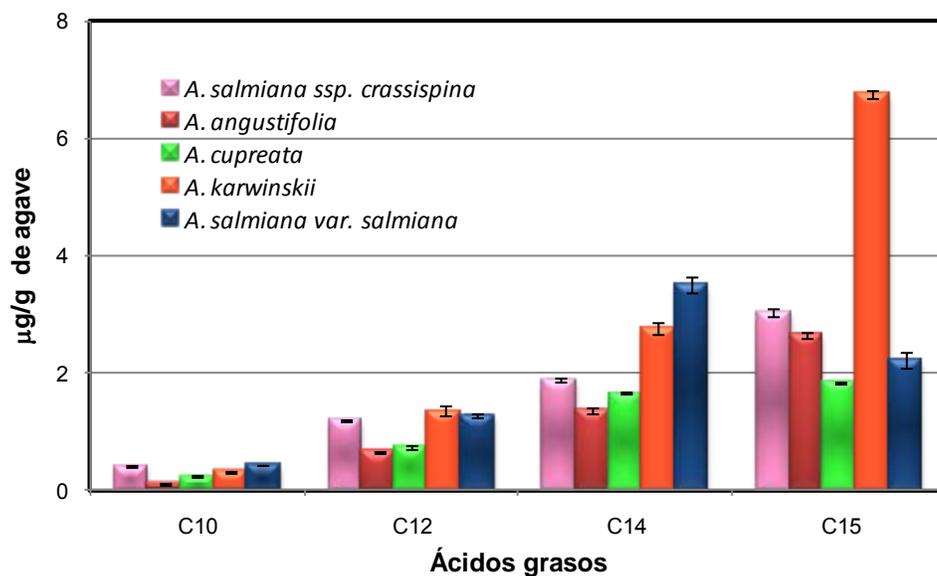


Figura 21. Perfiles de ácidos grasos C10 a C15

La comparación del contenido de ácidos C15, C16:1 y C17 (Figura 22) presenta una mayor variación relativa entre las especies. Las concentraciones de estos ácidos en *A. karwinskii* son hasta cuatro veces superiores a las de *A. cupreata*; el primero, junto con *A. salmiana var. salmiana* muestran una mayor presencia de C16:1, y junto con *A. salmiana ssp. crassispina* los valores más altos de C17. El ácido heptadecanoico (C17) es el único de todos los ácidos donde *A. salmiana ssp. crassispina* exhibe la mayor concentración: **7.06 µg/g, el doble de *A. angustifolia* y *A. salmiana var. salmiana*, y tres veces el de *A. cupreata*.**

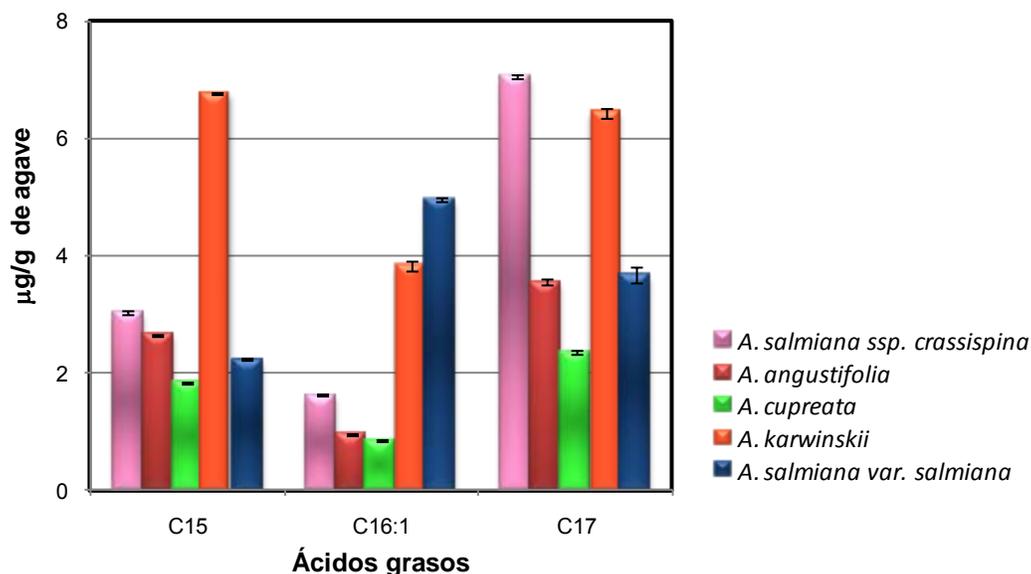


Figura 22. Perfiles de ácidos grasos C15, C16:1 y C17

La Figura 23 expone los perfiles de ácidos grasos en el intervalo C20 - C24. Excepto en el caso de C21, las concentraciones son en general superiores a las de los ácidos C10 – C15 y C16:1, C17 (Figs. 21 y 22), encontrándose hasta 18.8 $\mu\text{g/g}$ de C24 en *A. angustifolia*. Sin embargo, en los estudios publicados sobre mezcal y tequila no se ha informado sobre la detección de este grupo de ácidos, posiblemente debido a una concentración baja en las bebidas derivada de sus puntos de ebullición superiores al resto de los ácidos, que puede dificultar su paso desde el mosto fermentado al producto final durante la destilación.

Cabe mencionar que el porcentaje encontrado de ácidos grasos insaturados en los agaves es del 62-72 % del total de ácidos. Esta relación se encuentra ligeramente por debajo de lo encontrado en la materia prima de otras bebidas alcohólicas como el vino y la cerveza. En la uva se ha encontrado que el porcentaje de ácidos grasos insaturados es de 70 a 75 %, y en la cebada del 75%. Además, el contenido de ácidos grasos totales en la uva alcanza hasta 5 mg/g, valor que es cinco veces superior a la concentración de ácidos grasos de *A. karwinskii*, que es la especie de agave analizada con mayor contenido de estos ácidos. No obstante,

en estas matrices el ácido graso de mayor concentración es el C18:2, seguido del C16 (Cabanis, 2000; Rahman, 2000), y el agave presenta el mismo comportamiento.

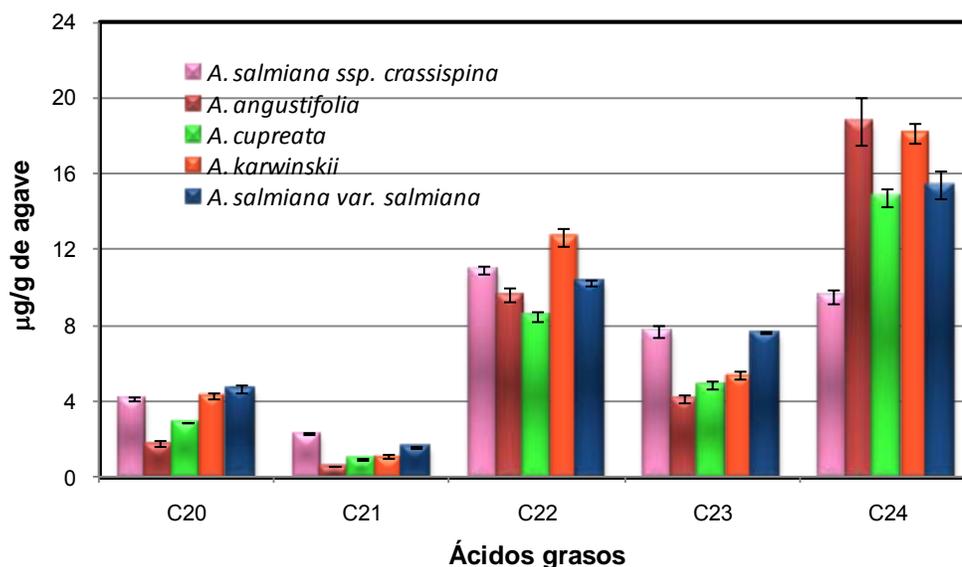


Figura 23. Perfiles de ácidos grasos C20 a C24

5.2.4. Evaluación de la formación de derivados de ácidos grasos

En la Tabla 15 se muestran los resultados de la evaluación de la formación del derivado en el análisis de la distribución general de ácidos grasos. Los porcentajes de recuperación se encuentran entre $100 \pm 5\%$, indicando un adecuado proceso de derivatización, extracción y cuantificación de los compuestos como ésteres etílicos (punto 4.5.1), con excepción de EE20 y EE24, cuyos valores pueden deberse a una diferencia en el comportamiento de extracción respecto del estándar interno.

Tabla 15. Resultados de la evaluación de la formación del derivado de ácidos grasos

Compuesto adicionado	Concentración adicionada (ppm)	Concentración equivalente de EE (ppm)	Concentración total equivalente de EE (ppm)	Concentración de EE encontrada (ppm)	Recuperación (%)	CV* (%)
TG ₁₀	0.228	0.247	0.247	0.243	98.4	2.5
MG ₁₄	0.990	0.839	2.57	2.64	103	0.12
TG ₁₄	1.63	1.74				
C16	20.2	22.4	110	112	102	0.20
DG ₁₆	46.7	46.7				
TG ₁₆	38.8	41.0				
C16:1	4.01	4.46	4.46	4.67	105	0.52
C18	5.27	5.79	10.3	10.5	102	0.28
DG ₁₈	4.47	4.47				
TG _{18:1}	47.5	50.0	102	97.9	96	0.41
C18:1	47.5	52.2				
MG _{18:2}	102	88.9	291	283	97.3	0.21
DG _{18:2}	97.8	97.8				
TG _{18:2}	99.0	104				
DG ₂₀	1.96	1.96	1.96	2.13	109	1.9
C24	5.94	6.39	6.39	6.82	107	1.2

*Número de réplicas, n=3

5.2.5. Comparación de los taxa mediante análisis multivariable

Con el fin de explorar la similitud entre los perfiles de ácidos grasos de los taxa analizados se emplearon dos técnicas de análisis multivariable: análisis de componentes principales (PCA, principal component analysis) y análisis de conglomerados o análisis clúster.

Cuando se tiene un número j de variables medidas para una cantidad m de muestras resulta imposible su representación gráfica si j es superior a 3. Sin embargo, el análisis de componentes principales ayuda a encontrar un nuevo espacio k -dimensional que mantiene la información del sistema lo más intacta posible y donde $k < j$. Geométricamente, se trata de una redefinición de los ejes, a los cuales se les llama ahora *componentes principales*. Éstos permiten el manejo de matrices de datos con muchas variables (en este caso concentraciones de

ácidos grasos) viendo el conjunto de datos en un número pequeño de dimensiones. El método permite representar la variabilidad presente en el conjunto en unos pocos componentes que son combinaciones lineales de las variables originales. El primer componente principal trata de explicar la máxima variación posible en los datos en una dirección, describiendo al máximo la distribución de los m puntos (en este caso, taxa). El segundo componente explica la variación una vez eliminada la explicada por el primer componente, y así sucesivamente.

En términos matemáticos los componentes principales son los autovectores o vectores propios de la matriz de correlación y la técnica para encontrar estos autovectores se llama análisis propio. A cada componente principal (es decir, autovector) le corresponde un autovalor que proporciona la cantidad de varianza en el conjunto de datos que se encuentra explicada por ese componente (Miller y Miller, 2002).

El análisis se llevó a cabo con el programa Statgraphics Plus 5.1. La Tabla 16 muestra los resultados al extraer los primeros componentes. Como puede verse, el primer componente explica el 53.88 % de la varianza total, el segundo el 25.69 % y el tercero el 14.09 %.

Tabla 16. Análisis de componentes principales

Componente número	Autovalor	Porcentaje de varianza	Porcentaje acumulado
1	8.621	53.88	53.88
2	4.109	25.69	79.57
3	2.254	14.09	93.66
4	1.014	6.34	100
5	7.15E-16	0	100

La representación gráfica de los datos en el plano formado por los primeros dos componentes se presenta en la Figura 24. Los taxa se distribuyen a ambos lados del eje del primer componente, ubicándose a la izquierda *A. angustifolia* y *A.*

cupreata, las dos especies con menor contenido total de ácidos grasos, y a la derecha *A. karwinskii* y los dos taxa de *A. salmiana*.

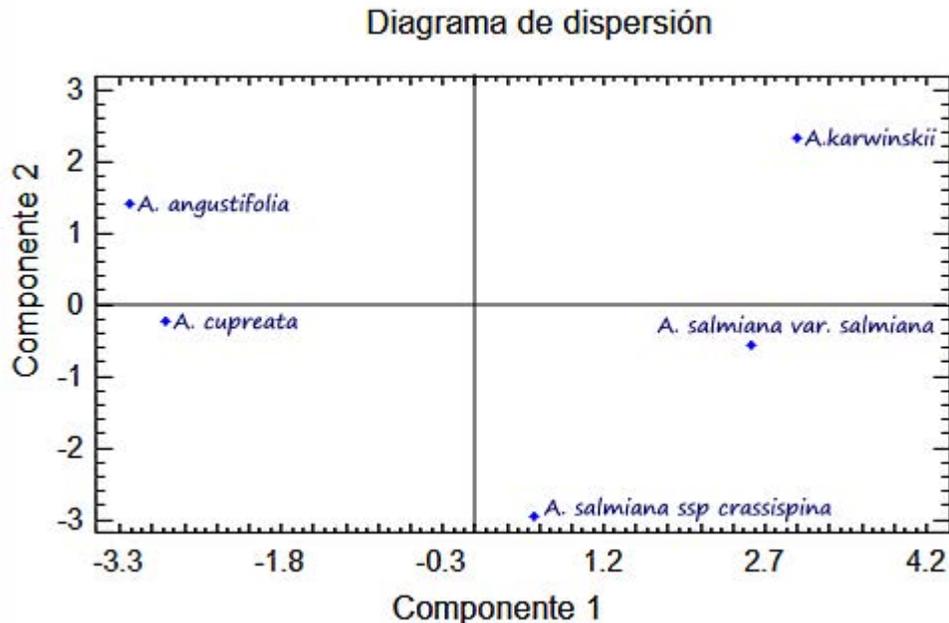


Figura 24. Diagrama de los dos primeros componentes principales para los datos de concentración de ácidos grasos de los agaves analizados

Tomando en cuenta el primer componente, que explica la mayor varianza de los datos, se puede deducir que la distribución general de ácidos grasos posee una mayor semejanza entre los taxa que conforman los grupos mencionados, a la izquierda y derecha del eje. Si se considera ahora la distribución a lo largo del segundo componente, no se observa algún subgrupo aparente dentro del grupo formado por *A. karwinskii*, *A. salmiana var. salmiana* y *A. salmiana ssp. crassispina*. Con el diagrama de dispersión de los puntos en los tres primeros componentes (Figura 25), tampoco se aprecia alguna diferenciación pero se confirma la cercana relación entre el perfil de ácidos grasos de *A. angustifolia* y *A. cupreata*.

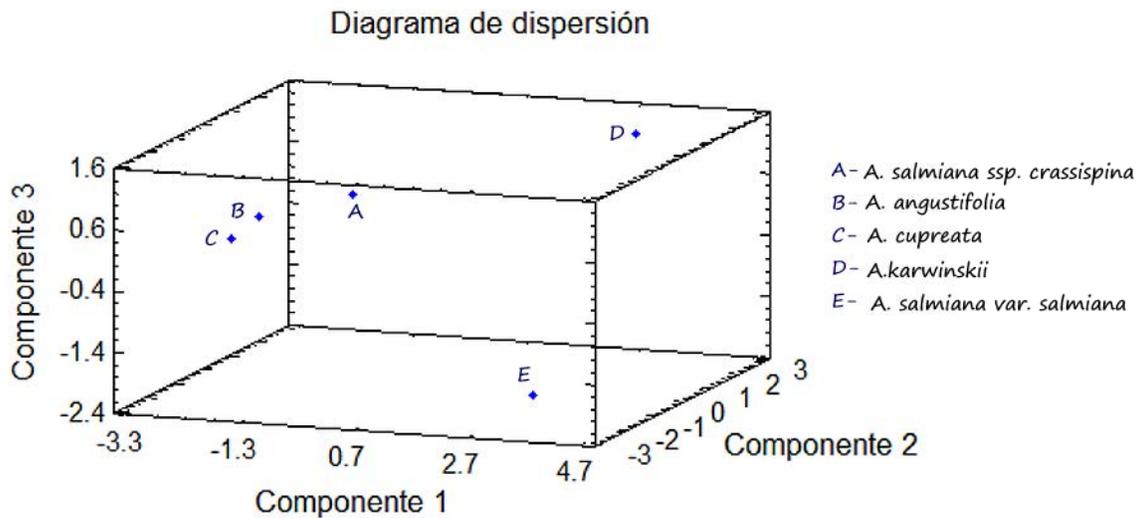


Figura 25. Diagrama de los tres primeros componentes principales para los datos de concentración de ácidos grasos de los agaves analizados

Para el análisis de conglomerados se utilizó el método de agrupamiento jerárquico del promedio entre grupos, también llamado UPGMA, *Unweighted Pair-Group Method using arithmetic Averages*. Este es un método exploratorio que permite descubrir asociaciones entre los datos que pueden no ser evidentes *a priori*, calculando el promedio de las distancias entre pares de observaciones de dos grupos, agrupando entonces los casos más similares y formando cada vez un nuevo grupo o clúster con similitud progresivamente menor hasta quedar un solo grupo. Se ha empleado la distancia euclídea al cuadrado.

El dendrograma obtenido se muestra en la Figura 26. A partir del conjunto total de datos se han formado dos grupos: el de *A. angustifolia* y *A. cupreata* y el de *A. karwinskii*, *A. salmiana var. salmiana* y *A. salmiana ssp. crassispina*, lo cual concuerda con lo obtenido mediante el análisis de componentes principales. No obstante, el análisis de conglomerados revela una mayor asociación entre el *A. karwinskii* y *A. salmiana var. salmiana* que entre cada uno de estos y el *A. salmiana ssp. crassispina*. Asimismo, se observa que el mayor nivel de similitud,

marcado por la distancia en la figura, ocurre entre las especies *A. angustifolia* y *A. cupreata*.

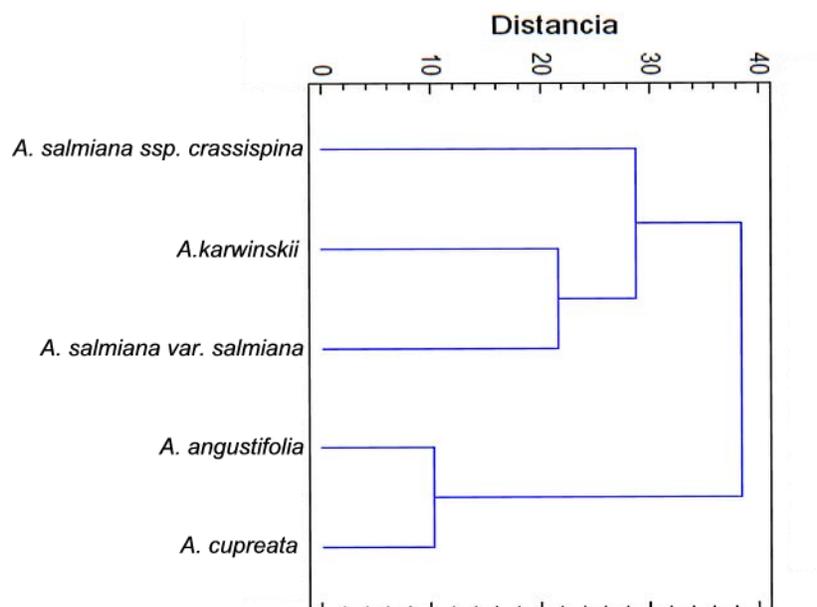


Figura 26. Dendrograma de los agaves analizados, construido a partir de las concentraciones respectivas de ácidos grasos

5.3. Distribución general de lípidos simples

5.3.1. Lípidos simples identificados

La Tabla 17 muestra los tiempos de retención relativos al ácido C13 (t_r : 7.8 min) de los ácidos, acilgliceroles y β -sitosterol, utilizados para la identificación de los lípidos simples en las cabezas de agave.

Tabla 17. t_r relativos de los estándares de lípidos simples

Compuesto	t_r relativo (min)	Compuesto	t_r relativo (min)
MG ₈	0.5	β -sitosterol	6.6
C16	1.4	TG ₁₀	7.6
C18:3	2.2	DG ₁₄	7.7
C18:2	2.2	DG ₁₆	9.5
C18:1	2.2	TG ₁₂	10.3
C18	2.2	DG _{18:2}	11.2

Tabla 17 (cont.)

Compuesto	t _r relativo (min)	Compuesto	t _r relativo (min)
DG ₈	2.9	DG _{18:1}	11.2
MG ₁₄	3.0	DG ₁₈	11.2
MG ₁₆	3.7	TG ₁₄	12.7
MG _{18:2}	4.3	TG ₁₆	15.0
MG _{18:1}	4.3	TG _{18:2}	16.8
MG ₁₈	4.4	TG _{18:1}	16.9
TG ₈	5.0	TG ₁₈	17

Mediante la comparación de los tiempos de retención relativos de los estándares señalados en la Tabla 17 con los obtenidos en las muestras se identificó el ácido C16, los ácidos C18s (en conjunto, dada su coelución), y se definieron los intervalos en los cuales aparecen los grupos de mono, di y triacilgliceroles, como se indica en la Tabla 18. Tomando en cuenta la regularidad en los t_r de los diacilgliceroles que le preceden, el pico con t_r relativo de 11.8 min se incluyó en este grupo, tratándose posiblemente del diacilgliceroles con Número de Carbono 38.

Tabla 18. Compuestos y grupos de lípidos identificados

Compuesto/Grupo	t _r relativo (min)
C16	1.4
C18s	2.2
β-sitosterol	6.6
MG	3.0 – 4.4
DG	7.7 – 11.8
TG	12.7 – 18.5

Las Figuras 27-31 presentan los cromatogramas de lípidos simples de los agaves analizados. Se observa en general en casi todos los agaves estudiados una mayor concentración de triacilgliceroles (TG) frente a los diacilgliceroles (DG), excepto en el caso del *A. angustifolia*, donde el área de los TG y DG son semejantes (Figura 28). Los picos a la izquierda del β-sitosterol no fueron identificados, pero podría tratarse de otros esteroides o bien estanoles como el estigmasterol o el campesterol, que comúnmente constituyen parte de las membranas celulares en

plantas (Heldt, 2005). Los picos contiguos al del ácido C16 que aparecen en el *A. angustifolia* se identificaron como ésteres metílicos EM16 y EM18:2 mediante espectrometría de masas. El área de pico de estos ésteres disminuye en el *A. salmiana* ssp. *crassispina* y es considerablemente menor en *A. salmiana* var. *salmiana*, *A. karwinskii* y *A. cupreata*. También se observa una variación en la distribución de acilgliceroles por Número de Carbono en cada taxón.

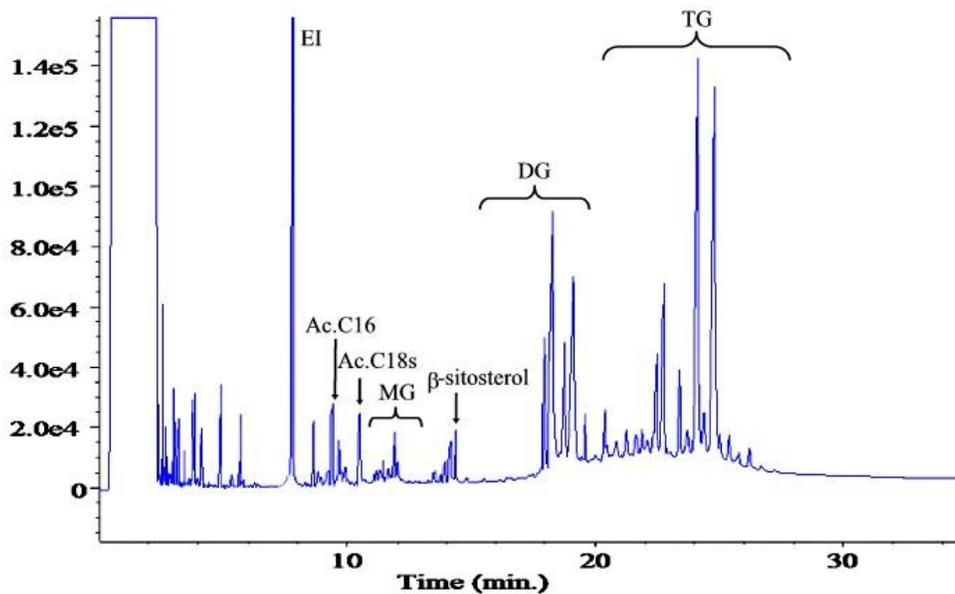


Figura 27. Cromatograma de lípidos simples en *A. salmiana* ssp. *crassispina*

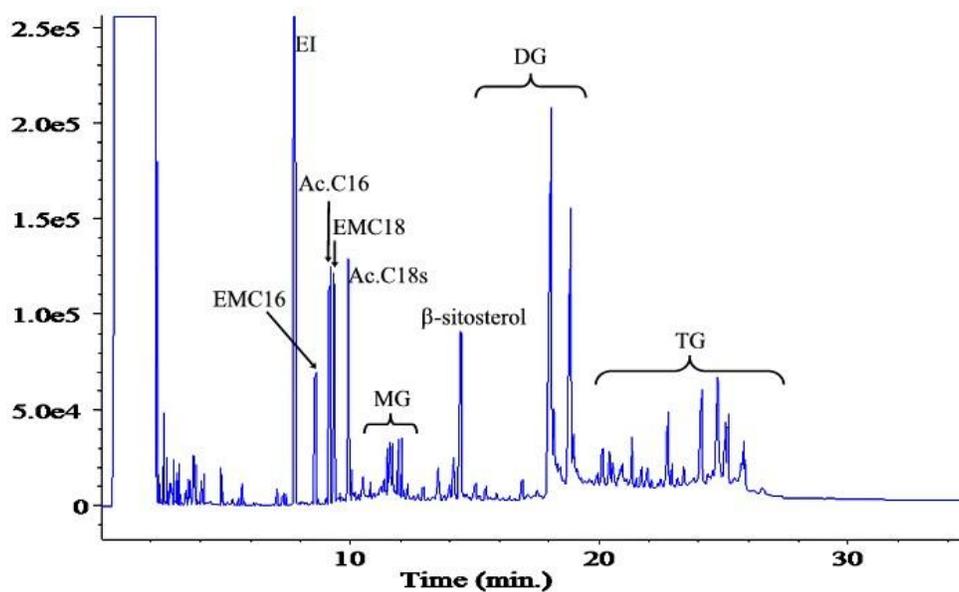


Figura 28. Cromatograma de lípidos simples en *A. angustifolia*

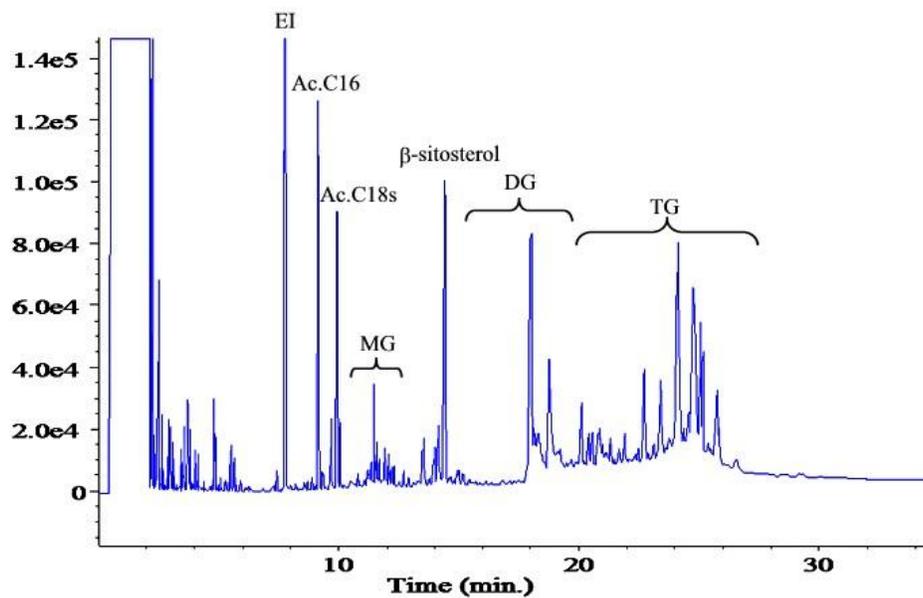


Figura 29. Cromatograma de lípidos simples en *A. cupreata*

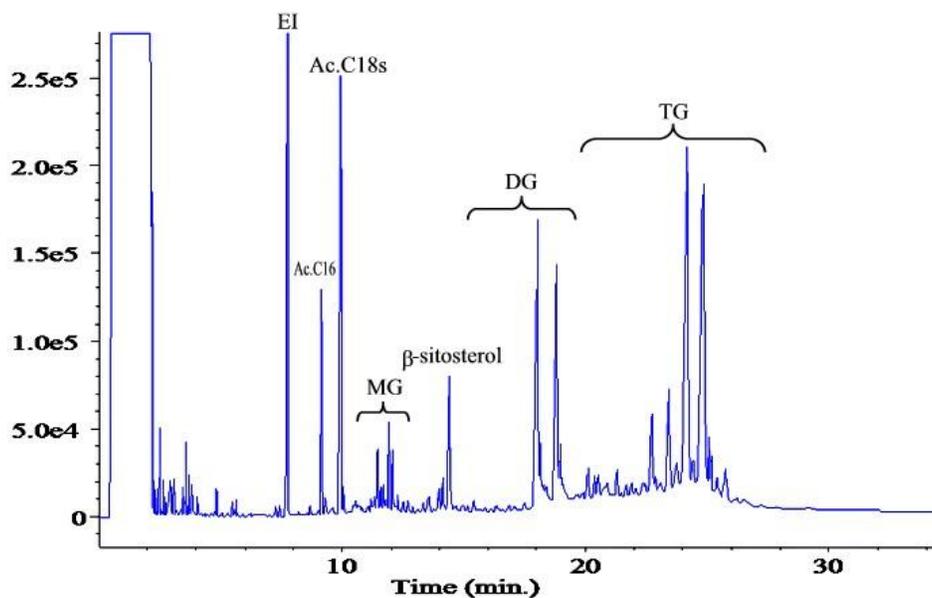


Figura 30. Cromatograma de lípidos simples en *A. karwinskii*

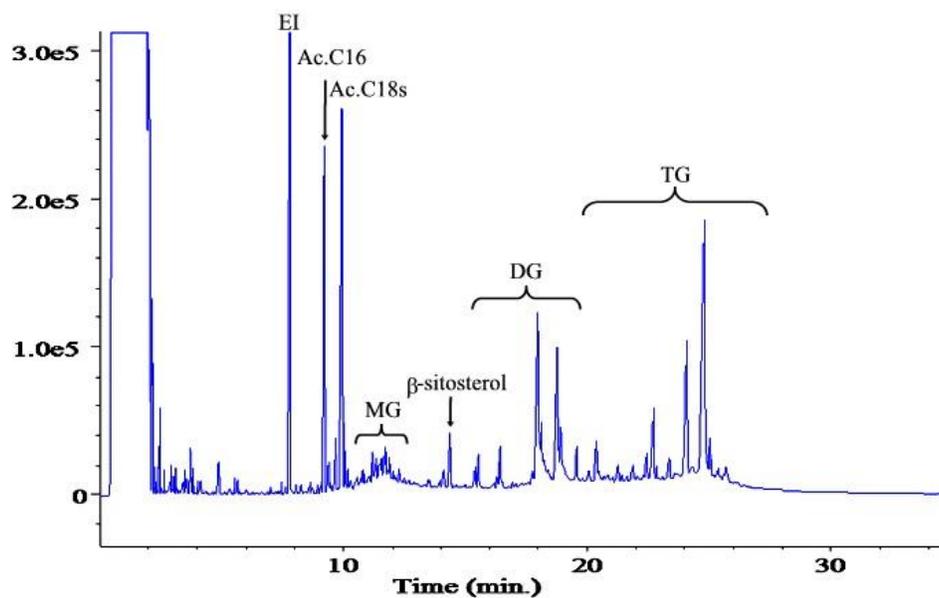


Figura 31. Cromatograma de lípidos simples en *A. salmiana* var. *salmiana*

5.3.2. Curvas de calibración de lípidos simples

Los resultados de la calibración para ácidos grasos, β -sitosterol, mono, di y triacilgliceroles se encuentran en la Tabla 19. Los coeficientes de determinación r^2 son mayores a 0.99, mostrando que en los intervalos de concentración trabajados la relación entre la respuesta y la concentración es lineal.

Tabla 19. Resultados de la calibración de lípidos simples*

Compuesto o grupo	Pendiente	Intercepto	r^2
C16	1.0307	0.0034	0.9995
C18s	0.9180	0.0054	0.9992
β -sitosterol	0.9694	0.0020	0.9995
MG	0.8804	-0.0017	0.9967
DG	0.7746	0.0225	0.9971
TG	0.8363	-0.0106	0.9996

* Véase el punto 4.6.2 para conocer los estándares de calibración y sus concentraciones

5.3.3. Concentración de lípidos simples en las muestras de agave analizadas

A partir de las funciones de calibración señaladas en la Tabla 19 se calculó la concentración de lípidos en las muestras de agave, cuyos resultados están indicados en la Tabla 20.

Tabla 20. Concentración promedio* de lípidos simples en los agaves analizados ($\mu\text{g/g}$ de agave)

Compuesto o grupo	<i>A. salmiana</i> ssp. <i>crassispina</i>		<i>A. angustifolia</i>		<i>A. cupreata</i>		<i>A. karwinskii</i>		<i>A. salmiana</i> var. <i>salmiana</i>	
	$\mu\text{g/g}$	CV (%)	$\mu\text{g/g}$	CV (%)	$\mu\text{g/g}$	CV (%)	$\mu\text{g/g}$	CV (%)	$\mu\text{g/g}$	CV (%)
C16	4.77	1.6	18.7	5.7	16.1	1.5	21.2	5.7	41.7	6.9
C18s	4.04	6.4	24.9	5.1	18.2	3.2	60.0	9.5	81.8	3.7
β -sitosterol	7.88	1.0	25.4	6.4	23.8	3.1	27.7	1.6	11.7	9.3
MG	16.8	6.5	49.6	4.4	22.9	7.6	51.1	3.3	57.5	4.5
DG	237	3.3	244	8.0	109	7.0	267	3.8	257	5.0
TG	426	4.8	223	4.6	268	4.4	565	3.4	422	1.9
Total	696	3.1	586	3.8	459	3.1	992	2.3	872	1.8

*Número de réplicas, n=3

Los coeficientes de variación en este análisis son también en todos los casos menores a 10%. El contenido total de lípidos simples determinado en las diferentes especies de agave es muy variado, va desde 459 $\mu\text{g/g}$ a 992 $\mu\text{g/g}$. La comparación gráfica de los resultados (Figura 32) muestra claramente la predominancia de contenido de TG en la mayoría de las muestras, constituyendo del 48 al 61 % del total de lípidos, aunque en el caso del *A. angustifolia*, como se había previsto a partir del cromatograma (Figura 28), la concentración de TG (38 ± 2.3 %) es similar a la de DG ($42 \pm 4\%$).

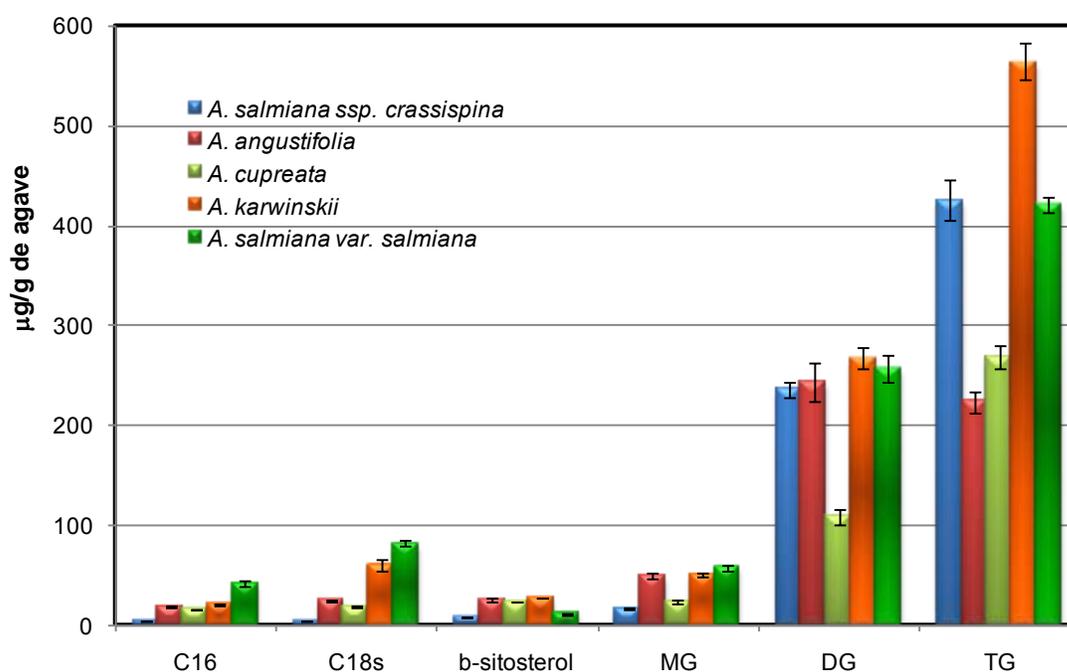


Figura 32. Perfiles de lípidos simples en los agaves analizados

En conformidad con los resultados de concentración total de ácidos grasos mayoritarios en las muestras, se observa el siguiente orden decreciente en el contenido de lípidos simples totales: *A. karwinskii* > *A. salmiana var. salmiana* > *A. salmiana ssp. crassispina* > *A. angustifolia* > *A. cupreata* (Figura 33). Este último podría en principio aportar una menor cantidad total de ácidos y ésteres, pero

como se mencionó en el punto 5.2.3, la contribución relativa individual de ácidos por cada especie varía según el ácido en cuestión.

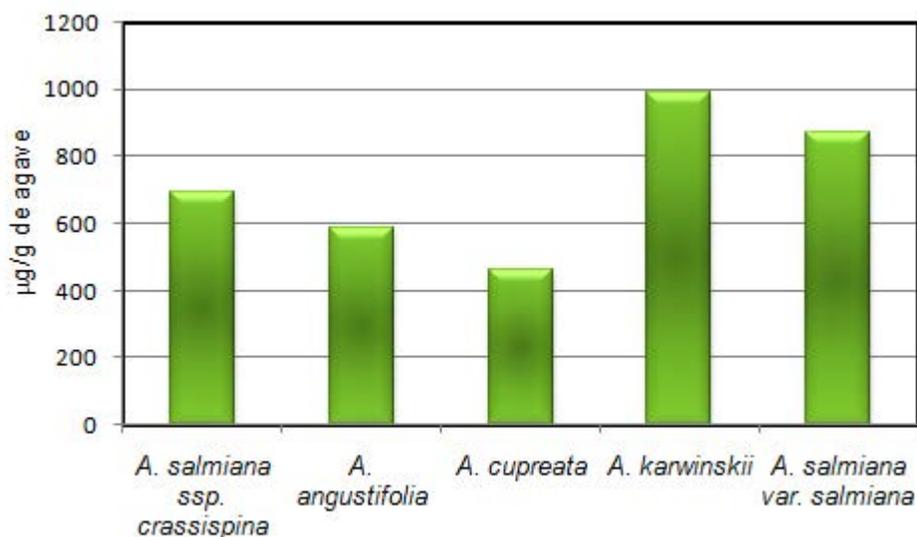


Figura 33. Comparación de la concentración total de lípidos simples en los agaves analizados

5.3.4. Evaluación de la formación del derivado de lípidos simples

Los resultados de la evaluación de la formación del derivado de lípidos simples (Tabla 21) muestran porcentajes de recuperación en el intervalo $100 \pm 5\%$, indicando un adecuado pretratamiento del extracto lipídico y de su posterior cuantificación.

Tabla 21. Resultados de la evaluación de la formación del derivado de lípidos simples

Estándar		Concentración adicionada (ppm)	Concentración adicionada total (ppm)	Concentración encontrada (ppm)	Recuperación (%)	CV* (%)
C16		25.0	25.0	25.3	101	2.5
C18s		23.5	23.5	24.4	104	2.1
β-sitosterol		33.9	33.9	34.8	103	2.7
MG	MG ₁₆	18.1	38.6	39.9	103	2.9
	MG _{18:2}	20.5				
DG	DG ₁₆	71.3	148	146	98.6	1.3
	DG _{18:2}	76.7				
TG	TG ₁₆	124	250	248	99.2	1.2
	TG _{18:2}	126				

*Número de réplicas, n=3

Cabe mencionar que la aportación de ácidos y ésteres al mezcal por parte del agave a través de la hidrólisis de los lípidos simples que éste contiene no es el único origen de estos compuestos, que también pueden generarse durante otros pasos de la elaboración de la bebida. Sería conveniente estudiar la variación de las concentraciones de lípidos simples en el mosto antes y al final de la fermentación así como la de los ácidos y ésteres etílicos respectivos identificados en este trabajo en las plantas de agave para establecer con mayor claridad su contribución al contenido de los compuestos en la bebida.

También es muy importante estudiar la variación del contenido de lípidos simples, incluyendo la distribución general de ácidos grasos, entre plantas de una misma población y entre poblaciones para determinar las diferencias existentes. La determinación de la distribución general de ácidos grasos en cada especie abre la posibilidad de utilizar esta información con fines quimiotaxonómicos, siempre y cuando los resultados sean consistentes en cada especie. También podrían utilizarse los perfiles de Número de Carbono del análisis de lípidos simples totales ya que, como se observó en los cromatogramas obtenidos, cada taxa presenta una distribución muy particular.

6. Conclusiones

1. Los agaves analizados poseen perfiles particulares de ácidos grasos y lípidos simples, por lo que pueden proveer características organolépticas distintas en cada mezcal mediante la aportación de ácidos, y a su vez de ésteres etílicos, a la bebida.

2. De los 16 ácidos grasos identificados se encontró en todas las muestras al decanoico (C10) como el de menor concentración, en tanto que el ácido palmítico (C16) así como los insaturados de 18 átomos de carbono formaron el grupo de ácidos mayoritarios, sobresaliendo entre ellos el ácido linoleico (C18:2).

3. A partir del análisis multivariable de la distribución general de ácidos grasos en cada agave se definieron dos grupos con mayor similitud en los perfiles de sus taxa: a) *A. angustifolia* y *A. cupreata* y b) *A. salmiana* ssp. *crassispina*, *A. karwinskii* y *A. salmiana* var. *salmiana*, formando estos dos últimos otro subgrupo.

4. Los ácidos grasos están presentes originalmente en las muestras como triacilgliceroles y diacilgliceroles, principalmente. En general, la abundancia de los primeros es mayor al de los diacilgliceroles, excepto en el caso de *A. angustifolia*, donde se determinaron contenidos similares de ambos grupos.

5. El mayor contenido total de lípidos simples se encontró en *A. karwinskii*, seguido en orden decreciente por *A. salmiana* var. *salmiana*, *A. salmiana* ssp. *crassispina*, *A. angustifolia* y *A. cupreata*. Los valores van desde 459 $\mu\text{g/g}$ de agave a 992 $\mu\text{g/g}$ de agave.

6. La metodología desarrollada para la determinación de lípidos simples, que involucra una extracción Bligh-Dyer modificada, presentó una buena precisión, con coeficientes de variación menores a 10%.

7. Referencias

Aguirre, J.; Charcas, H.; Flores, J. *El maguey mezcalero potosino*. Consejo Potosino de Ciencia y Tecnología, México, 2001, 87 p.

Bautista, M.; García, L.; Salcedo, R.; Parra, L. Azúcares en agaves (*Agave tequilana* Weber) cultivados en el estado de Guanajuato. *Acta Universitaria*, Universidad de Guanajuato, 11 (2001) 33-38

Bligh, E.; Dyer, W.. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37 (1959) 911-917

Capella, S.; Covarrubias, M. Correlación de compuestos volátiles del tequila con su origen. *Bebidas Mexicanas*, Diciembre 2006/Enero 2007, 10-17

Cabanis, J. *Ácidos orgánicos, sustancias minerales, vitaminas y lípidos*. En *Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos*, Flanzky, C. (ed.), Mundi-Prensa, Madrid, 2000, pp. 43-65

Christie, W. *Lipid analysis*. 2ª ed. (1ª reimpresión), Pergamon Press, Great Britain, 1987, pp. 1-16

CNSPMM (2007), Comité Nacional del Sistema Producto Maguey Mezcal. http://magueymezcal.org/?page_id=10. Consultado el 27 de julio de 2007

CONACULTA (2006). <http://www.conaculta.gob.mx/saladeprensa/index.php?indice=11&fecha=2006-09-25>. Consultado el 25 de julio de 2007

De León, A.; Escalante, P.; González, L.; Barba, A. El mezcal, una mezcla natural de alcoholes y feromonas. *Bebidas Mexicanas*, Junio/Julio 2006, 10-18

Declaración general de la protección a la denominación de origen "Mezcal". Diario Oficial de la Federación, México. D.F., 28 de Noviembre de 1994

Eguiarte, L.; Souza, V.; Silva-Montellano, A. Evolución de la familia Agavaceae. *Bol. Soc. Bot. México*, 66 (2000) 131-150

Engan, S. *Beer composition: volatile substances*. En Food Science and Technology, Vol. 2, J.R.A. Pollock (ed.), Academic Press, Great Britain , 1981, pp. 93-157

Espinosa, H.; Arredondo, C.; Cano, M; Canseco, A.; Vázquez, F. *La materia prima para producir el mezcal oaxaqueño*. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Oaxaca, 2002, 68 p.

Fishwick, M.; Wright, A. Comparison of methods for the extraction of plant lipids, *Phytochemistry*, 16 (1977) 1507-1510

García, N. *Análisis cromatográfico de los ésteres metílicos de los ácidos grasos de Anabaena spp. en un cultivo de laboratorio*. Tesis. FES Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, 2005, 44 p.

García-Mendoza, A.; Galván, R. Riqueza de las familias Agavaceae y Nolinaceae en México. *Bol. Soc. Bot. México*, 56 (1995) 7-24

García-Mendoza, A. Distribution of *Agave* (Agavaceae) in Mexico. *Cact. Succ. J. (U.S.)*, 74 (2002) 177-186

Gentry, H. *Agaves of Continental North America*. University of Arizona Press, Arizona, 1982, 670 p.

Granados, D. *Los agaves en México*. Universidad Autónoma de Chapingo, México, 1993, 252 p.

Heldt, H. *Plant Biochemistry*. 3^a ed., Elsevier Academic Press, 2005, EUA, 363-372

Hitchcock, C. *Structure and distribution of plant acyl lipids*. En Recent advances on the chemistry and biochemistry of plant lipids, Galliard (ed.), Academic Press, Great Britain, 1975, pp. 1-19

Irish, M.; Irish, G. *Agaves, Yuccas and related plants: a gardener's guide*. Timber Press, Oregon, 2000, 312 p.

Jounela, P. *The aroma composition of distilled beverages and the perceived aroma of whisky*. En *Off flavors in Foods and Beverages*, Charalambous (ed.), Elsevier, The Netherlands, 1992, pp. 339-354

Juárez, C.; Rodríguez, P.; Rivera, R.; Rechy de Von Roth, M. Uso de fibras naturales de lechuguilla como refuerzo en concreto. *Ingenierías*, 7 (2004) 7-19.

Kolendo, J (1996). <http://myweb.tiscali.co.uk/agavepages/articles/articles.html>. Consultada el 30 Julio 2007

Lachance, M. Yeast communities in a natural tequila fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek*, 68 (1995) 151-160

Leffingwell. *Flavor-Base*. Leffingwell & Associates, Canton, GA, 1989-2007

Ley de la Propiedad Industrial. Título quinto, capítulo I. Diario Oficial de la Federación, última reforma publicada 25-01-06

López, M.; Mancilla-Margalli, N. Generation of Maillard Compounds from inulin during the thermal processing of *Agave tequilana* Weber var. azul. *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 806-812

López, M. *Tequila aroma*. En *Flavor Chemistry of Ethnic Foods*, Fereidon Shahidi y Chi-Tang Ho (eds.), Kluwer Academic/Plenum Publishers, USA, 1999, pp. 211-217

Madrigal-Lugo, R.; Pineda-Estrada, F.; Rodríguez-De la O, J. *Agave*. En *Handbook of Plant Cell Culture*, Vol. 5, Ammirato, Evans, Sharp, Bajaj (eds), Mc Graw-Hill, USA, 1989, pp. 206-227

Manirakiza, P.; Covaci, A.; Schepens, P. Comparative study on total lipid determination using Soxhlet, Roese-Gottlieb, Bligh & Dyer, and modified Bligh & Dyer extraction methods, *J. Food Compos. Anal.*, 14 (2001) 93-100

Miller, J.N.; Miller, J.C. *Estadística y quimiometría para química analítica*. 4ª ed., Pearson Prentice Hall, España, 2002, pp. 224-232

Modificación a la declaración general de protección de la denominación de origen Mezcal. Diario Oficial de la Federación, 3 de Marzo de 2003

Museo Nacional de Culturas Populares. *El maguey "árbol de las maravillas"*. México, 1988, Gobierno del Estado de Hidalgo, 178 p.

Nobel, P. *Los incomparables agaves y cactus*. Trillas, México, 1998, pp. 11-58

NOM-006-SCFI-2005. Bebidas alcohólicas-Tequila-Especificaciones. Diario Oficial de la Federación, 6 de enero de 2006

NOM-070-SCFI-1994, Bebidas alcohólicas-Mezcal-Especificaciones. Diario Oficial de la Federación, 12 de junio de 1997

NOM-168-SCFI-2005. Bebidas alcohólicas-Bacanora-Especificaciones de elaboración, envasado y etiquetado, Diario Oficial de la Federación, 14 de Diciembre de 2005

Nykänen, L.; Suomalainen, H. *Aroma of beer, wine and distilled alcoholic beverages*. D. Reidel Publishing, German Democratic Republic, 1983, pp. 3-17

Nykänen, L. Formation and occurrence of flavor compounds in wine and distilled alcoholic beverages. *Am. J. Enol. Vitic.*, 37 (1986) 84-96

Ortiz, E.; Ramales, M. El proceso de elaboración del mezcal, *Bebidas Mexicanas*, Diciembre 2006/Enero 2007, 28-32

Paredes, F.; Mira, J.; Sasián, P.; García-Martos, P. La cromatografía gas-líquido con espectrometría de masas en la identificación de levaduras. *Rev. Iberoam. Micol.* 18 (2001) 33-37

Peña-Álvarez, A.; Díaz, L.; Medina, A.; Labastida, C.; Capella, S.; Vera, L. Characterization of three *Agave* species by gas chromatography and solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1027 (2004) 131-136

Peppard, T.; Benn, S. Characterization of tequila flavor by instrumental and sensory analysis. *J. Agric. Food. Chem.*, 44 (1996) 557-566

Pinal, L.; Gschaedler, A. La etapa de fermentación y la generación de compuestos organolépticos. *Bebidas Mexicanas*, Febrero/Marzo 1998, 10-13

Rahman, S. Lipid studies of *Hordeum vulgare* of the family Graminea. Ph. D. Thesis, University of the Punjab, Pakistan, 2000, 186 p.

Resolución por la que se modifica la declaración general de protección de la denominación de origen Mezcal. Diario Oficial de la Federación, 29 de Noviembre de 2001

Russell, I. *Yeast*. En Handbook of brewing, Priest y Stewart (ed.), 2ª ed., Taylor and Francis, USA, 2006, pp. 308-310

SAGARPA. Sistema Producto Maguey-Mezcal Guerrero, 2005, pp. 1-28

Sasser, M. Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. Technical note 101, MIDI, 2001

Shorland, F. *The distribution of fatty acids in plant lipids*. En Chemical plant taxonomy, Swain (ed.), Academic Press, Great Britain, 1963, pp. 253-297

Smedes, F.; Thomansen, T. Evaluation of the Bligh & Dyer lipid determination method. *Mar. Pollut. Bull.* 32 (1996) 681-688

Valenzuela, A. *El agave tequilero*. Ediciones Mundi-Prensa, 3ª ed., México, 2003, 215 p.

Vallejo-Cordoba, B.; González-Córdova, A.; Estrada-Montoya, M. Tequila volatil characterization and ethyl ester determination by Solid Phase Microextraction Gas Chromatography/Mass Spectrometry analysis. *J. Agric. Food Chem.*, 52 (2004) 5567-5571

8. Anexos

A. Curvas de calibración para ésteres etílicos de ácidos grasos

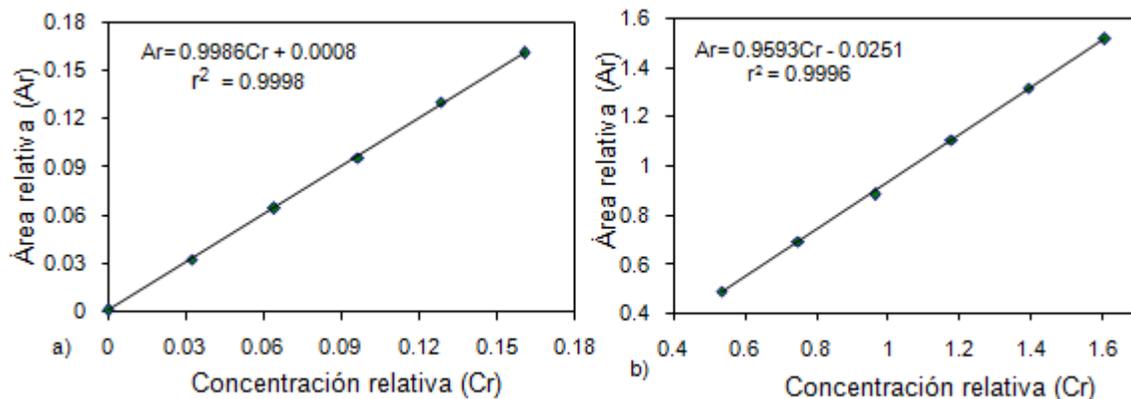


Figura A1. Curva de calibración para EE de ácidos grasos saturados: a) Concentraciones bajas, b) Concentraciones altas

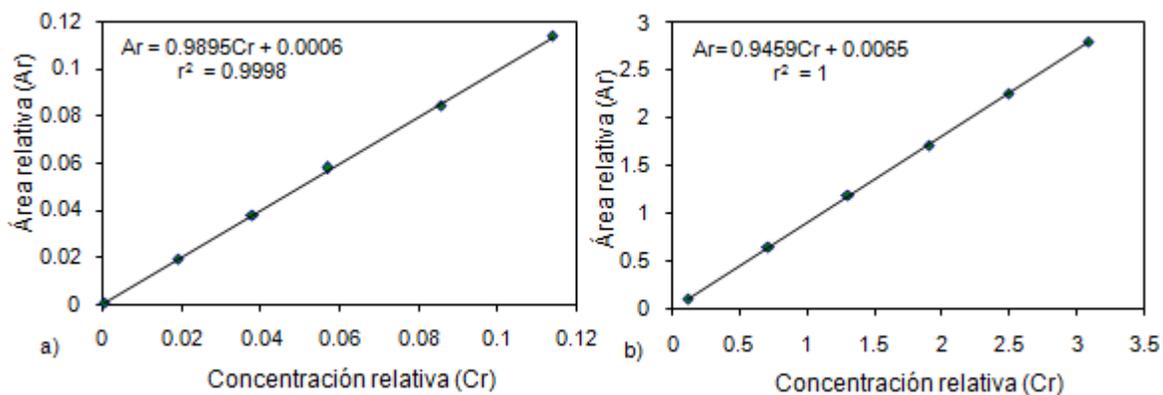


Figura A2. Curva de calibración para EE de ácidos grasos insaturados a) Concentraciones bajas, b) Concentraciones altas

B. Curvas de calibración para lípidos simples

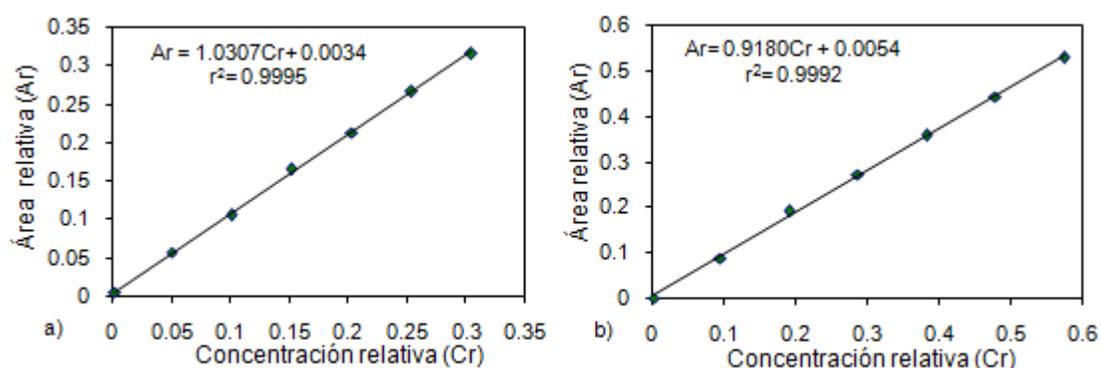


Figura B1. Curva de calibración para a) C16 y b) C18s

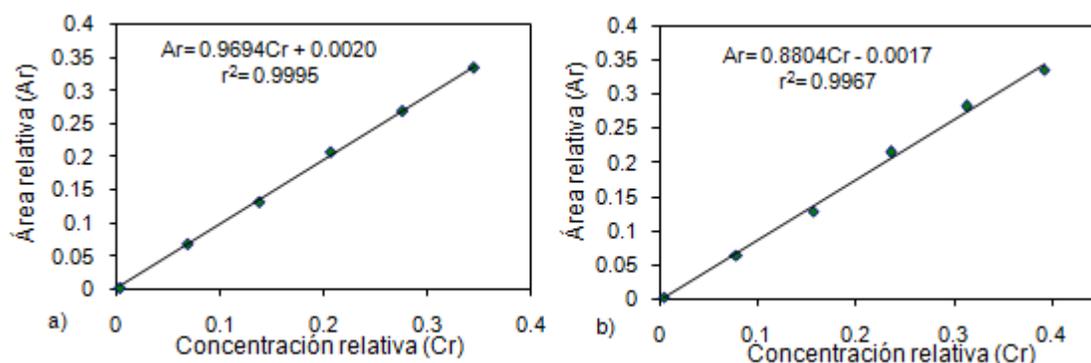
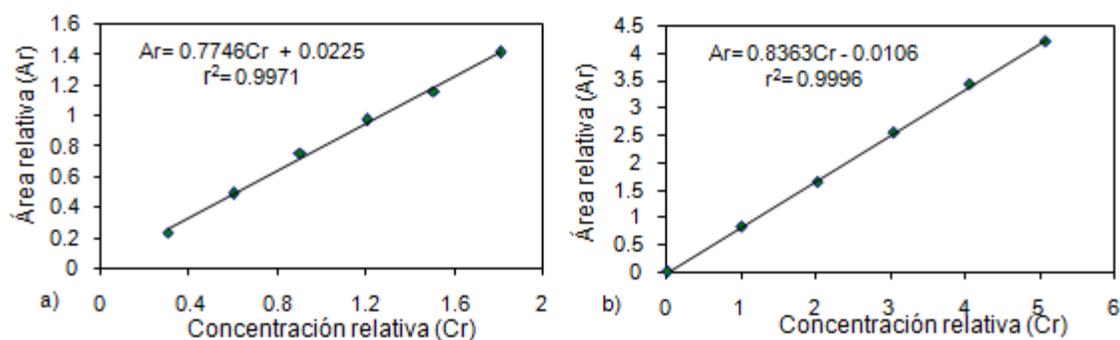
Figura B2. Curva de calibración para a) β -sitosterol y b) Monoacylglicerol

Figura B3. Curva de calibración para a) Diacylglicerol y b) Triacylglicerol