



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

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

**CARACTERIZACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LÍPIDOS SIMPLES
EN MEZCAL Y SUS PRODUCTOS INTERMEDIOS POR
CROMATOGRFÍA DE GASES CAPILAR**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.B. HIPÓCRATES NOLASCO CANCINO



TUTOR: DRA. ARACELI PEÑA ALVAREZ

AÑO: 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

A ese gran equipo de académicos de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca: Raúl Reyes Fuentes, Homero J. Pérez Cruz, Luis Alberto Hernández Osorio, Erik Martínez Torres, Leobardo Reyes Velasco, Aristeo Segura Salvador y Antonio Castellanos Martínez por su amistad y confianza, por su ejemplo de superación y de amor a nuestra Facultad, dulce estímulo para confiar que el esfuerzo que compartimos a brazo partido por la superación académica de nuestra institución pronto rendirá los frutos anhelados.

A la Dra. Araceli Peña Álvarez por su atinada dirección en el desarrollo de esta investigación, pero aun más por su amistad y por demostrarme su vocación y amor para trabajar en la mejor Universidad de México, la UNAM.

Al M. en C. Santiago Capella Vizcaino y a la M. en C. Carmen Labastida Rubio por compartir sus conocimientos y experiencias.

A la M. en C. Rocío Juárez Ciprés, por su ejemplo de superación incansable y por esas palabras de aliento que siempre ha tenido para mí.

Al M. en C. Alberto Sánchez López por su decidido apoyo para mi superación profesional.

Al Sr. Placido Hernández Hernández de *Mezcal Espina Dorada*© por su amistad, decisiva en mi incursión en el estudio del Mezcal.

*Con amor y respeto: a mis padres,
Dr. César Nolasco López
Profra. Marleny E. Cancino López
Todo cuanto soy, lo soy gracias a ustedes.
Gracias por todo.*

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 101 del Departamento de Química Analítica. División de Estudios de Posgrado, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

El presente trabajo se presentó en el 2° *Taller Internacional de Autentificación de Bebidas Alcohólicas*, realizado en Guadalajara, Jalisco, México; en el mes de Octubre de 2005.

Índice

CONTENIDO

Agradecimientos

Índice

Resumen

1. Introducción
2. Antecedentes
 - 2.1. La Planta de Agave
 - 2.1.1. Clasificación Taxonómica
 - 2.1.2. Descripción Botánica
 - 2.1.3. *Agave angustifolia* Haw
 - 2.1.4. Composición Química
 - 2.2. El Mezcal
 - 2.2.1. Origen del mezcal
 - 2.2.2. Proceso de Elaboración Tradicional del mezcal
 - 2.2.2.1. Cosecha del Agave
 - 2.2.2.2. Cocimiento
 - 2.2.2.3. Molienda
 - 2.2.2.4.1 Fermentación
 - 2.2.2.5. Destilación
 - 2.3. Lípidos
 - 2.4. NOM 070 SCFI-1994
3. Objetivos
 - 3.1. Objetivo General
 - 3.2. Objetivos Específico
4. Desarrollo Experimental
 - 4.1. Materiales y Equipo
 - 4.1.1. Reactivos
 - 4.1.2. Estándares
 - 4.1.3. Disoluciones Estándar
 - 4.1.4. Material
 - 4.1.5. Muestras
 - 4.1.5.1. Agave Cocido
 - 4.1.5.2. Mosto Muerto
 - 4.1.5.3. Mezcal 100% Agave
 - 4.2. Métodos
 - 4.2.1. Análisis Cualitativo de Lípidos Simples por CG
 - 4.2.1.1. Análisis Cromatográfico
 - 4.2.1.2. Análisis por CG-EM
 - 4.2.2. Análisis Cuantitativo
 - 4.2.2.1. Cuantificación de Lípidos Simples en Agave Cocido
 - 4.2.2.2. Cuantificación de Lípidos Simples en Mosto Muerto

- 4.2.2.3. Cuantificación de Lípidos Simples en Mezcal
 - 4.2.2.3.1. Curva de Calibración Relativa
 - 4.2.2.3.2. Determinación de Factor de Respuesta
 - 4.2.2.3.3. Determinación del Recobro (%R)
 - 4.2.2.3.4. Cuantificación por Factor de Respuesta considerando el Recobro (%R)
- 5. Resultados y Discusión de Resultados
 - 5.1. Análisis Cualitativo de Lípidos Simples por CGC
 - 5.2. Análisis Cuantitativo
 - 5.2.1. Cuantificación de Lípidos Simples en Agave cocido
 - 5.2.2. Cuantificación de Lípidos Simples en Mosto Muerto
 - 5.2.3. Cuantificación de Lípidos Simples en Mezcal
 - 5.2.3.1. Cuantificación por Curva de Calibración Relativa
 - 5.2.3.2. Determinación de Factor de Respuesta
 - 5.2.3.3. Cuantificación por Factor de Respuesta considerando el %R
 - 5.2.3.4. Cuantificación por Curva de Calibración Relativa considerando el %R
 - 5.3. Interpretación de la Evolución de Lípidos Simples en el Proceso de Producción del Mezcal
 - 5.3.1. Agave Cocido
 - 5.3.2. Mosto Muerto
 - 5.3.3. Mezcal
- 6. Conclusiones
- 7. Bibliografía

TABLAS

- Tabla 1.1 Producción de Mezcal en el estado de Oaxaca. Anexo estadístico del 2° informe de gobierno de José Murat Casab (2000)
- Tabla 2.1 Clasificación taxonómica del *A. angustifolia* Haw (Granados, 1993)
- Tabla 2.2 Composición media de especies de Agave utilizadas para la elaboración de bebidas alcohólicas: *A. atrovirens*, *A. potatorum*, *A. cochlearis* y *A. tequilana* (Madrigal et al. 1981)
- Tabla 2.3 Composición de carbohidratos de Agave utilizados en la elaboración de bebidas alcohólicas (Madrigal et al., 1981)
- Tabla 2.4 Formas de producción del Mezcal. (Blomberg, 2000)
- Tabla 2.5 Especificaciones del Mezcal, NOM 070 SCFI-1994
- Tabla 4.1 Reactivos utilizados en el desarrollo experimental
- Tabla 4.2 Estándares utilizados en el desarrollo experimental
- Tabla 4.3 Preparación de la curva de calibración para Agave Cocido
- Tabla 4.4 Preparación de la curva de calibración para Mosto Muerto
- Tabla 4.5 Preparación de la curva de calibración para Mezcal
- Tabla 4.6 Concentración en *disolución estándar de lípidos*
- Tabla 5.1 Tabla de identificación por trr
- Tabla 5.2 Concentración de lípidos simples determinada en Agave Cocido
- Tabla 5.3 Concentración de lípidos simples determinada en Mosto Muerto
- Tabla 5.4 Concentración de lípidos simples determinada en Mezcal por curva de calibración relativa

Tabla 5.5 Factores de respuesta de lípidos simples analizados

Tabla 5.6 Recobro en hexano de lípidos simples analizados en Mezcal

Tabla 5.7 Concentración de lípidos simples determinadas en Mezcal por Fr considerando el %R

Tabla 5.8 Comparación de la concentración de lípidos simples en Mezcal determinadas por curva de calibración relativa y por factor de respuesta

Tabla 5.9 Concentración determinada para Mezcal por curva de calibración relativa considerando el recobro.

Tabla 5.10 Comparación de la cuantificación de lípidos simples en Mezcal por curva de calibración considerando el recobro y por factor de respuesta considerando el recobro

Tabla 5.11 Comparación de la concentración de lípidos simples en Agave Cocido, Mosto Muerto y Mezcal

FIGURAS

Fig. 2.1 *Agave angustifolia* Haw

Fig. 2.2 Cosecha de *A. angustifolia* Haw

Fig. 2.3 Transporte del *A. angustifolia* Haw

Fig. 2.4 Corte del *A. angustifolia* Haw

Fig. 2.5 Horno tradicional para el cocimiento del Agave

Fig. 2.6 Apilando los Agaves en el horno

Fig. 2.7 Vaciado del horno

Fig. 2.8 *Agave angustifolia* Haw cocido

Fig. 2.9 Corte de Agave Cocido

Fig. 2.10 Molienda de Agave Cocido en molino chileno

Fig. 2.11 Molino de canoa

Fig. 2.12 Mosto de *A. angustifolia* Haw

Fig. 2.13 Fermentación del mosto

Fig. 2.14 Fin de la fermentación

Fig. 2.15 Mosto muerto

Fig. 2.16 Tepache

Fig. 2.17 Alambique instalado en un palenque

Fig. 2.18 Maqueta de alambique

Fig. 2.19 Mezcal

Fig. 5.1 Cromatograma de lípidos simples en Agave Cocido

Fig. 5.2 Curva de calibración para ácidos grasos en Agave Cocido

Fig. 5.3 Curva de calibración para ésteres etílicos en Agave Cocido

Fig. 5.4 Curva de calibración para acilglicéridos en Agave Cocido

Fig. 5.5 Cromatograma de lípidos simples en Mosto Muerto

Fig. 5.6 Curva de calibración para ácidos grasos en Mosto Muerto

Fig. 5.7 Curva de calibración para ésteres etílicos en Mosto Muerto

Fig. 5.8 Curva de calibración para acilglicéridos en Mosto Muerto

Fig. 5.9 Cromatograma de lípidos simples en Mezcal

Fig. 5.10 Curva de calibración para ácidos grasos en Mezcal

Fig. 5.11 Curva de calibración para ésteres etílicos en Mezcal

GRÁFICOS

Gráfico 5.1 Distribución de lípidos simples en el Agave Cocido

Gráfico 5.2 Distribución de ácidos grasos libres en Agave Cocido

Gráfico 5.3 Distribución de lípidos simples en Mosto Muerto

Gráfico 5.4 Evolución de las concentraciones de lípidos simples Agave Cocido – Mosto, % de analitos

Gráfico 5.5 Evolución de ácidos grasos y ésteres etílicos de cadena mediana, Agave Cocido – Mosto Muerto

Gráfico 5.6 Evolución de MG, DG y TG, Agave Cocido – Mosto Muerto

Gráfico 5.7 Evolución de ácidos grasos de 18 carbonos en el proceso Agave Cocido – Mosto Muerto

Gráfico 5.8 Evolución de ésteres etílicos de 18 carbonos en el proceso Agave Cocido – Mosto Muerto

Gráfico 5.9 Evolución de la distribución de lípidos simples en el proceso Agave Cocido – Mosto Muerto – Mezcal

Gráfico 5.10 Evolución de ácidos grasos en el proceso Mosto Muerto – Mezcal

Gráfico 5.11 Evolución de ésteres etílicos en el proceso Mosto Muerto – Mezcal

Gráfico 5.12 Comparación de concentración: Mosto Muerto – Mezcal

Resumen

El mezcal es una bebida alcohólica mexicana, obtenida por la fermentación y destilación artesanal de las mieles de *Agave*. Oaxaca, es el estado mayor productor de mezcal, desde la denominación de origen (1994) sus datos de producción y consumo han ido en aumento, los datos de exportación resultan aun más alentadores. Sin embargo, aun siendo un producto distintivo del país, poco se ha investigado sobre la composición química del mezcal y de sus productos intermedios; particularmente, son de interés los compuestos responsables del aroma y sabor, de entre ellos, seleccionamos a los lípidos simples: los ésteres etílicos de ácidos grasos imparten características sensoriales tales como el olor a frutas dependiendo de la longitud de su cadena hidrocarbonada, los ácidos grasos libres presentan aromas menos agradables que los ésteres, sin embargo, también contribuyen al perfil organoléptico.

En este trabajo, se desarrolló y optimizó un método para la determinación simultánea de ácidos grasos (C), ésteres etílicos de ácidos grasos (E), monoacilglicéridos (MG), diacilglicéridos (DG) y triacilglicéridos (TG) en el mezcal y en sus productos intermedios: agave cocido y mosto muerto. Todas las muestras se tomaron de un mismo lote de producción de mezcal por *Agave angustifolia* Haw. Se utilizó la extracción líquido-líquido para la extracción y concentración de los lípidos y la cromatografía de gases (CG) con inyección en columna (cold on-column) para el análisis cualitativo y cuantitativo, se utilizaron estándares para identificarlos utilizando tiempos de retención relativos y se confirmó por CG-EM; la determinación cuantitativa se realizó por curvas de calibración relativas. El 90% de las determinaciones mostraron un coeficiente de variación (CV), menor del 10% lo que demuestra la precisión del método propuesto.

Se identificaron y cuantificaron los ácidos grasos: C8, C10, C12, C14, C15, C16, C16:1, C17, C18, C18:1, C18:2, C18:3; ésteres etílicos de ácidos grasos: E8, E10, E12, E14, E15, E16, E16:1, E17, E18, E18:1, E18:2, E18:3 y MG, DG, TG.

En el agave cocido se identificaron ácidos grasos, ésteres etílicos de ácidos grasos, MG, DG, y TG; el intervalo de concentración determinado fue 0.002 – 16.500 mg/Kg para C y 0.01 – 0.35 mg/Kg para E y los MG, DG y TG en el intervalo de 9.0 a 92.0 mg/Kg.

En el mosto muerto se identificaron ácidos grasos, ésteres etílicos de ácidos grasos, MG, DG, y TG; el intervalo de concentración determinado fue 0.1 – 9.0 mg/L para C y 0.01 – 2.00 mg/L para E y los MG, DG y TG en el intervalo de 1.0 – 13.0 mg/L.

En el mezcal se identificaron ácidos grasos y ésteres etílicos de ácidos grasos, las concentraciones determinadas oscilan entre 0.10 – 19.00 mg/L y 0.01 – 6.50 mg/L respectivamente.

1. Introducción

El mezcal es una bebida popular obtenida por destilación y rectificación de mostos preparados a partir de los azúcares extraídos de cabezas maduras de *Agave*, de las especies *angustifolia* Haw (maguey espadín), *potatorum* Zucc (maguey tobalá), entre otras, previamente cocidas y sometidas a fermentación alcohólica con levaduras cultivadas o no cultivadas. Es elaborada principalmente en los estados de Oaxaca, San Luís Potosí, Guerrero, Durango, Zacatecas y Guanajuato (NOM 070 SCFI 1994; Quiroz, 2000; López, 2002).

La producción de mezcal en Oaxaca se realiza de forma artesanal, en pequeñas fábricas familiares llamadas *palenques* e involucra cuatro etapas importantes: la cocción de las piñas de agave para hidrolizar los polisacáridos presentes en azúcares fermentables; la molienda que tradicionalmente se realiza con molinos de piedra accionados por una bestia de tiro para obtener el mosto; la fermentación provocada por microorganismos nativos que se realiza en tinas de madera para transformar los azúcares en alcohol y finalmente la destilación en alambiques de cobre, para concentrar el etanol y otras sustancias deseables que imparten al mezcal sus características organolépticas distintivas (Sánchez, 1989).

La importancia de la agroindustria del mezcal en Oaxaca se manifiesta por el gran número de familias que dependen directa o indirectamente de éste producto en una amplia área geográfica en la cual se integran los distritos de Sola de Vega, Miahuatlán, Yautepec, Tlacolula, Ejutla y Zimatlán, conocida como la “región del mezcal” (Diario Oficial, 1994), en los cuales el 60% de las actividades son derivadas de ésta agroindustria.

El mezcal en los últimos años, ha pasado de ser un producto regional, a una bebida reconocida y con un creciente potencial de consumo tanto en el mercado nacional como en el internacional (*Tabla 1.1*). A nivel nacional, el estado de Oaxaca es el mayor productor de mezcal ya que representa el 70% de la producción nacional.

Tabla 1.1 Producción de mezcal en el estado de Oaxaca. Anexo estadístico del 2° informe de gobierno de José Murat Casab (2000).

Año	Producción (litros)	% Exportación	Valor de exportaciones (millones de dólares)
1994	2,875,000	22.0	1.27
1995	4,109,820	27.1	1.39
1996	5,875,000	32.0	5.58
1997	7,220,000	45.4	11.48
1998	8,500,000	47.0	16.00
1999	9,000,000	52.2	23.50
2000	8,400,000	56.0	79.90

Las exportaciones incluyen países como Estados Unidos, Francia, Alemania, Taiwán, Bélgica, Chile, Italia, Holanda, Inglaterra, Japón y Corea (ICAPET, 1999). Con las tendencias mostradas en la producción y comercialización del mezcal desde la denominación de origen otorgada en 1994, se hace pertinente una caracterización química completa para ésta bebida.

Independientemente de que el mezcal ya esté a salvo de la competencia desleal de otros países, aún existe el riesgo de fraudes debido a que dentro de la Norma Oficial Mexicana que define a éste producto (NOM-070-SCFI-1994) no se establecen análisis que permitan diferenciar el mezcal de otras bebidas similares.

Además, existen muy pocos estudios sobre su composición química, y más aún de aquellos compuestos que le imparten características organolépticas particulares. Salvo los terpenos que han sido caracterizados y cuantificados en mezcal (Medina, 2004) y agave (Peña et al., 2004). Los estudios realizados al mezcal se han quedado como estudios regionales cuya difusión no ha trascendido y se han centrado en la determinación de compuestos establecidos por normas oficiales como paramétricos de su calidad, otros han sido abordados con el fin de mejorar su rendimiento en producción (Terán, 2003; Pedro, 2002; Gallegos, 2001; Antonio, 1993).

En bebidas alcohólicas congéneres como el Tequila, se han podido identificar varios grupos de compuestos tales como: alcoholes superiores, aldehídos, cetonas, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, terpenos, heterociclos relacionados con reacciones de Maillard entre otros, quienes a pesar de estar presentes en muy pequeñas cantidades, tienen una influencia importante en el aspecto sensorial (Benn, 1996; Vallejo, 2004).

El presente trabajo se enfoca al desarrollo de procedimientos que permitan conocer la composición química del agave cocido, mosto muerto y mezcal con el fin de tener herramientas para establecer una definición no solamente textual sino química, que en un futuro pueda servir para identificar el mezcal.

El haber seleccionado los lípidos simples para esta investigación, obedece a un particular interés en los compuestos responsables de las características organolépticas de las bebidas alcohólicas, aunque cabe mencionar que los lípidos simples no son los únicos que imparten estas propiedades. A los ésteres se les atribuyen aromas frutales y a los ácidos grasos aromas no tan agradables (Benn, 1996) pero también contribuyen al aspecto sensorial, además, son de importancia no solo porque de ellos derivan los ésteres sino también porque en ellos pueden presentarse reacciones indeseables que generan compuestos que imparten características organolépticas desagradables al producto.

2. Antecedentes

2.1. La Planta de Agave

El hombre mesoamericano para cubrir sus necesidades de vida, utilizaba a los agaves como una fuente diversificada de satisfactores, y agradecía los innumerables beneficios brindados; por esta razón las antiguas culturas mexicanas rindieron culto a la deidad que representaba a esta planta, *Mayahuelt* (del náhuatl “Diosa del Maguey”). En el territorio Oaxaqueño, por sus características agroecológicas, se han desarrollado diferentes especies de agave que tradicionalmente han sido aprovechadas de forma integral para la elaboración de alimento, bebida, vestido, calzado, papel, medicina y construcción: por esta multiplicidad de usos Linneo en 1794 le dio el nombre de agave del griego *admirable* (Valenzuela y Sánchez, 1985; Sánchez, 1989).

2.1.1. Clasificación Taxonómica

La familia Agavaceae, con nueve géneros y 330 especies, es endémica de América; se distribuye desde los límites entre Canadá y Estados Unidos hasta Bolivia, incluyendo las islas del Caribe. El centro de mayor riqueza y diversidad se encuentra en México, donde se localizan 251 especies, 76% de las descritas en el mundo, de las cuales 117 son endémicas, lo que corresponde al 70%. Oaxaca, es el estado más rico en agaváceas de México con 58 especies, de éstas, 13 especies son endémicas (22%) mas dos variedades (García Mendoza, 2004).

En la elaboración del mezcal, el *Agave angustifolia* (Tabla 2.1) es la especie más utilizada principalmente en los distritos de Tlacolula y Yauatepec del estado de Oaxaca, aunque se utilizan otras especies silvestres como el *A. potatorum* en el distrito de Sola de Vega, el *A. asperrima* Jacobi, *A. weberi* Cela y *A. salmiana* Otto.

Tabla 2.1 Clasificación taxonómica del *A. angustifolia* (Granados, 1993).

Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Angiospermae</i>
Clase	<i>Monocotiledónea</i>
Orden	<i>Asparagales*</i> (Dahlgren et al., 1985)
Familia	<i>Agavaceae</i>
Subfamilia	<i>Agavoidae</i>
Género	<i>Agave</i>
Subgénero	<i>Agave</i>
Grupo	<i>Rigidae</i>
Especie	<i>A. angustifolia</i> Haw (Hawthorn)
Nombre común	<i>Maguey Espadín</i>

2.1.2. Descripción Botánica

El agave es una planta perenne, que alcanza tamaños variables, dependiendo de la especie y variedad. Son plantas monocárpicas de hojas grandes tiesas y carnosas, dispuestas en forma radial sobre el tallo formando una roseta, del tallo muy corto y grueso (piña) nacen de 30 a 40 hojas (pencas) con bordes espinosos y con una púa en la punta; su raíz es fibrosa y exuberante, puede combinarse con otras mas gruesas llamadas rizomas, las cuales crecen cerca de la superficie de la tierra, en el momento en que éstas llegan a tener contacto con el sol, desarrollan una yema formando un hijuelo (Granados, 1993; Cruz, 2001).

Las plantas de agave tienen un origen tropical seco y presentan un metabolismo fotosintético adaptado a los medios áridos denominado: metabolismo ácido de crasuláceas (CAM), Las plantas CAM están representadas en las familias como Cactáceas, Crasuláceas, Agavaceas, entre las principales. (López, 2002).

El agave florece una sola vez y muere poco después. Cuando está próximo a florecer (entre los 8 y 10 años) sale del centro de la planta el escapo floral o qurote, cuya altura puede alcanzar los 5 m. Desde el punto de vista agronómico sus necesidades de agua son moderadas y requiere exposición plena al sol, resiste bien a las sequías y durante la temporada de lluvia almacena el agua que necesita para su crecimiento (Hernández ,1997; Yoldi *et al.*, 2000).

2.1.3. *Agave angustifolia* Haw

El *Agave angustifolia* (Fig. 2.1) es la especie mas cultivada y la más utilizada en la elaboración de mezcal en el estado de Oaxaca, por su fácil propagación (propagación por bulbilos), cantidad sobresaliente de azúcares y además el tamaño de la piña. Tienen un peso aproximado entre 60 a 80 Kg, aunque pueden encontrarse piñas de más de 100 Kg. Los problemas asociados al cultivo de *A. angustifolia* son debidos a prácticas de monocultivo extensivo, plagas y enfermedades que repercuten directamente en aspectos socioeconómicos y ecológicos (Valenzuela y Sánchez, 1985).



Fig. 2.1 *Agave angustifolia* Haw; Santiago Matatlán, Oaxaca.

2.1.4. Composición Química

La piña de agave está compuesta químicamente por fibras, azúcares, agua y sales minerales (Allier y González 1999), tiene un alto contenido de saponinas y otros productos tóxicos (Madrigal *et al.*, 1981) (Tabla 2.2). Estudios realizados en piñas de agave tequilero y otros reportan un contenido de carbohidratos del 75% de los cuales se han identificado, glucosa, dextrinas, almidón y principalmente inulina (Tabla 2.3).

Tabla 2.2 Composición media de especies de agave utilizadas para la elaboración de bebidas alcohólicas: *A. atrovirens*¹, *A. potatorum*, *A. cochlearis* y *A. tequilana* (Madrigal *et al.*, 1981).

Composición	% Piña de agave	% Hojas de agave
Agua	70 – 85	75 – 95
Carbohidratos	10 – 28	3 – 15
Celulosa	2 – 5.7	15 – 23
Lignina	3 – 5	3.5 – 20
Saponinas	0.09 – 0.32	0.08 – 0.61
Proteínas	0.2 – 0.5	0.5 – 1.06
Resinas y Lípidos	0.6 – 0.9	0.7 – 1.26

La inulina es el principal carbohidrato de reserva, se encuentra en forma de polifructosanos, está compuesta de cadenas de 25 a 35 residuos de fructosa unidas por enlaces β

¹ Según Gentry, 1982; *A. atrovirens* y *A. colchearis* son sinónimos de *A. salmiana*.

2-1 y termina con una molécula de glucosa, es un polímero lineal, más pequeño que el almidón. La miel de agave cocido, también contiene vitaminas, minerales y aminoácidos que sirven como cofactores de crecimiento para las levaduras (Bautista y García, 2000).

Tabla 2.3 Composición de carbohidratos de agave utilizados en la elaboración de bebidas alcohólicas (Madrigal et al., 1981).

Carbohidratos %	<i>A. potatorum</i>	<i>A. tequilana</i>	<i>A. cochlearis</i>	<i>A. atrovirens</i>
Sacarosa	0 – 0.7	0 – 0.5	0.2 – 0.8	2 – 8
Glucosa	1.4 – 4.6	1.4 – 4.6	4.5 – 9	1.5 – 1.5
Fructosa	2.5 – 8.5	26 – 72	5 – 10	1.5 – 2.5
Polifructósidos	70 – 75	68 – 72	60 – 64	15 – 50
Poliglucósidos	4 – 6	6 – 4	8 – 11	8 – 32
Composición de glucosa y fructosa en el jugo de agave hidrolizado				
Fructosa	92	90	88	70
Glucosa	8	10	12	30

En agaves o magueyes el contenido de nitrógeno es bajo, con promedio de 0.2 – 0.3%, en el caso de *A. tequilana* Weber variedad azul (Sánchez *et al.*, 1953), y mayor de 0.37% en el caso de *A. angustifolia* (Sánchez, 1985), razón por la cual, los niveles de nitrógeno pueden ser críticos durante la fermentación.

2.2. El Mezcal

2.2.1. Origen del mezcal

La palabra “mezcal” deriva de las palabras Metl e Ixcalli que significa “agave cocido al horno”. El mezcal es una bebida regional, obtenida por destilación y rectificación de mosto preparados directa y originalmente con los azúcares extraídos de las cabezas maduras de los agaves, las cuales son previamente hidrolizadas o cocidas, trituradas y sometidas a fermentación alcohólica con levaduras cultivadas o no cultivadas, siendo susceptibles de ser enriquecidos, permitiéndose adicionar hasta el 20% de otros carbohidratos (NOM-070-SCFI-1994).

La composición de aguardiente de maguey (mezcal, Tequila, Sotol, Comiteco, Bacanora), se inició con la llegada de los españoles, ubicándose históricamente a fines del siglo XVI, sin perder los diferentes usos a que eran destinados por los antiguos pobladores del territorio mexicano (Martínez, 2003).

La producción del mezcal en el estado de Oaxaca, se inicia con los pobladores españoles situándose principalmente en la cañada Quiatoni-Narro, distritos de Yautepec, Tlacolula, Ocotlán, Miahuatlán, Ejutla y Sola de Vega; donde existían los recursos naturales (agave, agua y

leña), desde entonces la elaboración en el estado de Oaxaca ha sido una actividad realizada a través de cientos de años y generaciones, empleando para ellos técnicas artesanales desarrolladas en pequeñas fábricas denominadas “Palenques” (Sánchez, 1989).

Hoy en día, la Norma Oficial Mexicana (NOM-070-SCFI-1994, bebidas alcohólicas-mezcal-especificaciones) hace referencia a las siguientes especies de agaves como únicas materias primas para la elaboración de mezcal, siendo las dos primeras las más utilizadas:

- Agave Espadín (*Agave angustifolia* Haw)
- Agave Tobalá (*Agave potatorum* Zucc)
- *Agave asperrima* Jácobi, (Maguey de cerro, bruto ó cenizo) – *A. scabra* (Gentry, 1982) –
- *Agave weberi* Cela, (Maguey de mezcal);
- *Agave salmiana* Otto ex Salm ssp (Trel) Gentry (Maguey verde o mezcalero);
- Otras especies de agave que no estén protegidas por otra norma oficial.

2.2.2. Proceso de Elaboración Tradicional del mezcal

La producción de mezcal en muchas partes de la entidad es el resultado de conocimientos transmitidos de generación en generación. Los mezcaleros o palenqueros² han incorporado nuevos elementos para mejorar la elaboración del destilado de agave, pero conservando en esencia el sistema aprendido siglos atrás. Actualmente existen tres formas para producir el mezcal: la artesanal, la tradicional y la moderna (Tabla 2.4). Sin embargo, la mayoría de los palenques utilizan el proceso tradicional, razón por la cual la calidad del producto es muy variable (Blomberg, 2000).

Tabla 2.4 Formas de producción del mezcal (Blomberg, 2000).

Formas de Producción	PRODUCCIÓN ARTESANAL	PRODUCCIÓN TRADICIONAL	PRODUCCIÓN MODERNA
Especie de agave	Varias, sobre todo las silvestres	Una sola, preferentemente el espadín (<i>A. angustifolia</i>)	Uso exclusivo de <i>Agave angustifolia</i>
Cocimiento	En hornos de tierra	En horno de piedra o tierra	En horno de piedra o autoclaves
Molido o triturado	Con mazos de madera o de piedras	En molinos con rueda de piedra jalada por bestias de tiro	Con desgarradoras mecánicas
Fermentación	En cueros de res, ollas de barro o canoas	En tinas de madera fabricadas exprefeso	En recipientes cilíndricos de acero inoxidable
Destilación	En ollas de barro con carrizo como tubería	En alambiques de cobre con el uso de leña	En alambiques de cobre o acero de mayor capacidad con uso de leña o gas
Volumen de Producción	Pequeño, su uso se reserva para fiestas patronales, normalmente no se comercializa	Para su consumo casero y comercial	Eminentemente comercial

² A la destilería se le conoce en Oaxaca como palenque.

Aunque los fundamentos de fabricación del mezcal son similares en todas las regiones productoras, los métodos varían en las distintas regiones debido a las diferencias en la variedad de agave empleado, del clima, y de otros factores como la adición de sulfato de amonio.

2.2.2.1. Cosecha del Agave

El proceso de elaboración del mezcal comienza con la cosecha de la piña del agave cuando los agaves silvestres o cultivados llegan a su edad adulta (presencia de escapo floral, entre 8 a 10 años) se procede al *capado* (corte del escapo floral) con la finalidad de que las reservas de la planta destinadas al desarrollo del escapo floral, sean aprovechadas para la formación de azúcares; y cuando se considera maduro (1 año después del *capado* aproximadamente) se procede a cosecharlo; el procedimiento consiste en rasurar a la planta (eliminación de hojas), para liberar la piña o cabeza (tallo) (Fig. 2.2), que son transportadas al palenque o destilería por diferentes medios (Fig. 2.3) (Sánchez, 1989).

El agave debe proporcionar a las levaduras la mayor parte de los nutrimentos para su crecimiento óptimo, para esto, el agave debe cortarse en el grado de madurez que ofrezca una alta concentración de azúcares. El uso de agave inmaduro, conlleva a la obtención de bajos rendimientos, debido a que el contenido de azúcares es bajo. Según la norma NOM-070-SCFI-1994-bebidas alcohólicas-mezcal-especificaciones, el agave que se utilice como materia prima



Fig. 2.2 Cosecha de *A. angustifolia* Haw

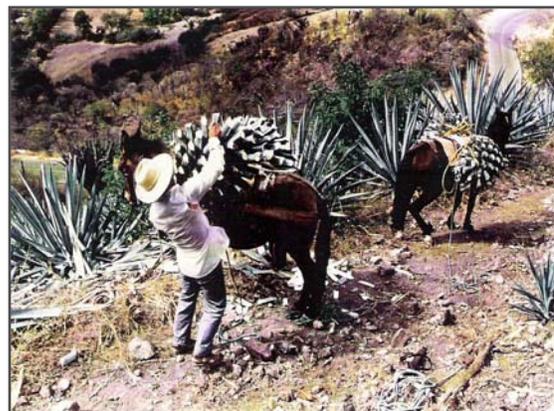


Fig. 2.3 Transporte del *A. angustifolia* Haw

para la elaboración de mezcal debe encontrarse maduro y libre de cualquier enfermedad o problema fitosanitario y debe estar inscrito en el registro de plantación de predios acreditados por un organismo de certificación.

En el estado de Oaxaca, la elaboración del mezcal de forma tradicional comprende principalmente 4 etapas que son: el cocimiento, la molienda, la fermentación y la destilación.

2.2.2.2. Cocimiento

Después de la cosecha, las piñas de agave son transportadas al *palenque* o destilería, amontonadas cerca del horno y seccionadas en 2, 4 ó más partes (*Fig. 2.4*), dependiendo de su tamaño (cada piña pesa en promedio 50 kg) antes de ser cocidas.

En Oaxaca es utilizado por la mayoría de los productores, el horno tradicional, el cual es una excavación trunco-cónica, con la base mayor en la superficie y la menor en lo profundo del agujero, revestidos en algunos casos de piedra (*Fig. 2.5*). La capacidad de estos hornos varía según el volumen de producción, pero para un horno de dimensiones regulares la base mayor mide de 4.0 a 5.0 metros y de 3.0 a 4.0 metros la base menor, mientras que la profundidad del mismo varia de 2.0 a 2.5 metros; teniendo una capacidad para hornear de 4 a 6 toneladas de agave crudo (Sánchez, 1989).



Fig. 2.4 Corte del *A. angustifolia* Haw



Fig. 2.5 Horno tradicional para el cocimiento del Agave.

Para el calentamiento del horno, primero se limpian los residuos producidos por la anterior operación de cocción. El combustible que utiliza es leña, una vez terminada la combustión de la leña se cubre con piedras especiales³ hasta que presenten un color rojo vivo (de 5 a 6 horas de exposición) y se recubre con una capa de bagazo húmedo, encima del cual se colocan los pedazos de agave en un arreglo que aproveche el calor (*Fig. 2.6*), se recubre de una capa de bagazo seco, pétalos de palma y tierra, dejándose por un mínimo de 3 días. Al terminar

³ Piedra de fuego: piedras que resisten el calentamiento y lo conservan, seleccionadas según enseñanzas ancestrales.

la cocción el horno se vacía (Fig. 2.7), el agave obtiene un color caramelo, característico de un buen cocimiento (Fig. 2.8) (Sánchez, 1989).



Fig. 2.6 Apilando los Agaves en el horno



Fig. 2.7 Vaciado del horno



Fig. 2.8 *Agave angustifolia* cocido

El cocimiento tiene por objeto hidrolizar la inulina para obtener azúcares reductores que permiten que se lleve a cabo la fermentación, con la formación de diferentes compuestos característicos que imparten ciertas propiedades sensoriales al producto final (Allier y González, 1999; Quiroz, 2000; Mancilla, 2000).

Durante el cocimiento, la temperatura es un factor primario, ya que de ella depende la hidrólisis de la inulina, al no hidrolizarse este compuesto, no podrá ser utilizada por la levadura para producir el etanol durante la fermentación. Por otra parte, si la temperatura es alta, los azúcares producidos tienden a caramelizarse y formar compuestos de Maillard y esto representa una gran pérdida de azúcares reductores y de compuestos nitrogenados disponibles. Además pueden formarse compuestos no fermentables tales como enoles, furfurales, anhídridos difructosídicos e hidroximetilfurfurales, lo cual reduce el rendimiento del proceso y puede afectar la eficiencia de la fermentación (Allier y González, 1999; Bautista y García, 2000, Mancilla, 2000). El calor también puede destruir ciertas vitaminas y otros factores de crecimiento

esenciales para la levadura (Walker, 2000; Mancilla, 2000). La pérdida de azúcares reductores y compuestos que contienen nitrógeno reducen la eficiencia y los rendimientos de fermentación debido a la disminución de la fuente de carbono y nitrógeno disponible para la levadura.

2.2.2.3. Molienda

La molienda tiene la finalidad de reducir el tamaño a la materia prima. Primero se reduce el tamaño del agave (*Fig. 2.9*), y se deposita en el molino que consiste en una piedra amonedada de cantera o cemento con un peso aproximado de media tonelada o hasta tonelada y media, accionada por una bestia de tiro, la cual gira sobre un piso de piedra o cemento en forma circular de aproximadamente 4 metros de diámetro y de 20 a 30 cm de profundidad, en el centro del círculo esta colocado un eje vertical de madera de 20 a 25 cm de diámetro, que sirve de eje a la rueda, son llamados molinos chilenos o egipcios (*Fig. 2.10*).



Fig. 2.9 Corte de Agave Cocido

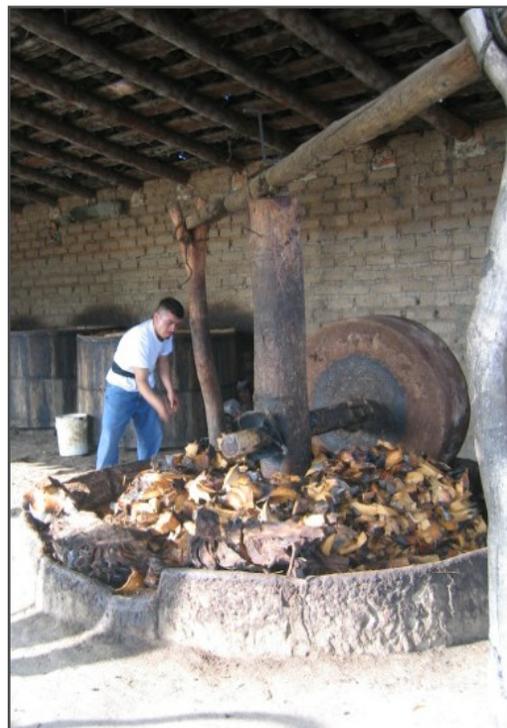


Fig. 2.10 Molienda de Agave Cocido en molino chileno

También se puede realizar de forma manual como en algunas comunidades de Sola de Vega donde la molienda se realiza sobre una canoa (Fig. 2.11) con la utilización de mazos o martillos de madera en forma de bate o marro (Sánchez, 1989; Quiroz, 2000). La utilización de molinos tradicionales, bates y canoas para la molienda, hace a este proceso muy deficiente, por la baja e inadecuada extracción del jugo del bagazo para liberar todos los compuestos nutritivos y además, pueden registrarse pérdidas de mieles de hasta un 10% (Sánchez, 1989; Cruz, 1999; Quiroz, 2000).



Fig. 2.11 Molino de canoa

2.2.2.4.1 Fermentación

La fermentación consiste en la oxidación de los hidratos de carbono (azúcares), por parte de los microorganismos. La mayoría de los compuestos que determinan las propiedades organolépticas se desarrollan durante esta parte del proceso.

En Oaxaca la fermentación del mosto se realiza con el jugo y bagazo del agave, sin la adición del inóculo; la fermentación inicia espontáneamente; las cepas que desencadenan la fermentación son nativas y se van reproduciendo a medida que el tiempo avanza (microorganismos nativos de fermentaciones anteriores y los que se encuentren en el medio ambiente), en tinas de madera de encino con una capacidad de hasta 2000 litros.

Las tinas se llenan hasta un 75% de su capacidad con el jugo y bagazo de agave (en algunos palenques es práctica común la adición de sulfato de amonio) reposa por 1 ó 2 días, después de este tiempo se le adiciona agua hasta el 90% de la capacidad máxima de la tina, después de haber agregado el agua se deja reposar nuevamente por 4 a 12 horas con la finalidad de que el agave molido se ablande, procediendo después a homogeneizar el contenido de la tina por partes con la ayuda de una pala de madera y de manera que se logre desmenuzar el agave insuficientemente molido y que el contenido se homogenice, a esta mezcla se le llama mosto (Fig. 2.12), y se deja fermentar.

El desarrollo de la fermentación se verifica por la aparición de unos agujeros en forma de cráteres en la superficie de la tina que se incrementan con el paso del tiempo, por donde se desprende dióxido de carbono (Fig. 2.13), que se recubren con pasta de agave para mantener una temperatura uniforme y una anaerobiosis necesaria para la producción de etanol (Sánchez, 1989;

Quiroz, 2000). El tiempo que dura la fermentación depende principalmente de la temperatura del ambiente, de la calidad del agave y de la adición de sulfato de amonio (Sánchez, 1989).



Fig. 2.12 Mosto de *A. angustifolia* Haw



Fig. 2.13 Fermentación del Mosto

El productor considera que la fermentación ha terminado (Fig. 2.14), por las características sensoriales que presenta el mosto, al cual en este punto se le puede llamar mosto muerto (Fig. 2.15), como la cesación del sonido de burbujeo, el sabor del mosto (sabor amargo), olor (característico a mezcal) y por la formación de burbujas grandes y aperladas al agitar el mosto; al producto líquido resultante de la fermentación se le llama *tepeache* (Sánchez, 1989).



Fig. 2.14 Fin de la fermentación



Fig. 2.15 Mosto muerto

El proceso de fermentación enfrenta ciertos problemas por el uso de métodos tradicionales, como la dilución inadecuada de los azúcares presentes en el agave, permitiéndose variaciones entre lotes, esto influye en el tiempo y la eficiencia de la fermentación. Se utilizan microorganismos nativos donde las fermentaciones pueden tomar rutas diversas formándose diferentes compuestos en menor o mayor grado que afectan el rendimiento del etanol. Según Martínez y Estrada (2001) al inicio de la fermentación de los mostos de mezcal predominan las bacterias lácticas homofermentadoras, el grupo de *Bacillus macerans* productor de dextrinas, y los géneros *Pseudomonas* y *Zymomonas*, hongos del género *Penicillium* que presenta una fuerte

actividad pectinolítica y las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* principal generadora de alcohol, y otras pertenecientes a los géneros *Debaryomyces*, *Saccharomycopsis*, *Guilliermondella*, *Kluyveromyces*, *Pichia* y *Hanseniaspora*, y al final de la fermentación predominan bacterias heterofermentadoras y del género *Acetobacter* así como levaduras del género *Brettanomyces* productoras de ácido acético. Todos estos microorganismos, influyen en éste proceso, en los rendimientos y eficiencias de las fermentaciones junto con el impacto en las características sensoriales del producto final. Además puede o no adicionarse al mosto nutrientes complementarios para las levaduras, como el sulfato de amonio que permite una fermentación rápida y evita parcialmente la presencia de azúcares residuales al final de ésta, pero su utilización se realiza sin control alguno, influyendo en el producto de fermentación. Por otro lado, la utilización de tinas abiertas permite que el polvo contamine al mosto en fermentación, con variaciones en la temperatura por las condiciones ambientales; estos factores pueden incidir en la velocidad de fermentación, la cantidad de azúcares residuales y la pérdida del etanol por evaporación cuando la temperatura es elevada, pero finalmente sobre la calidad del mezcal.

2.2.2.5. Destilación

Concluida la fase de fermentación, se procede a destilar el *tepache* (Fig.2.16), utilizando leña o gas como combustible. La destilación de las bebidas alcohólicas como el mezcal, tiene por objeto separar el contenido alcohólico de las levaduras muertas, azúcares no fermentables, minerales, etc. Los destiladores pueden ser de cobre, de ollas de barro y partes de cobre, y de barro con materiales como el carrizo, quiote, etc. Sólo en algunos palenques se utilizan equipos de acero inoxidable.



Fig. 2.16 *Tepache*

El destilador de cobre (alambique) es el más utilizado (Fig. 2.17 y 2.18), todas sus partes son desmontables y consta de una olla, un cabezote o montera, un turbante o pasa vapores, y un serpentín (Sánchez, 1989).



Fig. 2.17 Alambique instalado en un palenque



Fig. 2.18 Maqueta de alambique

La destilación involucra la separación y concentración del alcohol del mosto muerto, que contiene etanol y otros productos secundarios deseables, así como bagazo, partículas sólidas de agave consistentes principalmente de celulosa y pectina, células de levaduras, proteínas, sales minerales y ácidos orgánicos, similares a los encontrados en los mostos de tequila (Cedeño y Álvarez, 2003).

En el proceso de elaboración del mezcal, la destilación se lleva a cabo en dos fases:

Primera fase: El procedimiento de destilación se inicia al cargar la olla con tepache y algunos también con bagazo, sin llenarla completamente⁴; realizada esta actividad se arma el equipo colocando la montera, el turbante y el serpentín, sellándolos con argamasa⁵. A continuación la hornilla donde se encuentra empotrada la olla se somete a la cocción del fuego formando vapores que pasan a la montera, al turbante y finalmente al serpentín, donde se condensan los vapores obteniéndose un destilado. (Sánchez, 1989)

El destilado resultante se divide en tres partes:

- 1) Puntas o Cabeza, son las primeras fracciones de mayor grado alcohólico, de 30 a 80 °GL, conteniendo compuestos de menor punto de ebullición al etanol.
- 2) Cuerpo, está compuesto principalmente de alcohol etílico, de 20 a 40 °GL.
- 3) Colas, este contiene alcoholes de mayor punto de ebullición que el alcohol etílico, pudiendo tener un grado alcohólico de 6 °GL o mayor.

⁴ 10 o 15 cm por debajo de la boca de la olla

⁵ masilla hecha con el bagazo del agave

Las puntas, el cuerpo y las colas son depositados en recipientes por separado. Sin embargo, estas últimas se pueden regresar a la olla de destilación para ser redestiladas.

Segunda fase: Concluida la destilación del *tepache*, se procede a una segunda destilación, conocida como refinado⁶, la cual se realiza en el mismo equipo de destilación. En esta fase se utiliza el cuerpo obtenido de la primera destilación, las fracciones de destilado obtenidas reciben el mismo nombre: puntas (de resaque), cuerpo y colas de destilado. Debido a que en el refinado se presenta un cambio continuo de concentraciones de etanol y de compuestos aromáticos, es muy importante establecer los puntos en los cuales se debe hacer el corte de las fracciones. La fracción recogida después de separar las puntas en la segunda destilación es también llamada “*corazón*” que es propiamente el producto mezcal (*Fig. 2.19*). El líquido residual con un contenido mínimo de etanol y de componentes volátiles es llamado “colas” y usualmente se recicla agregándola al mosto muerto (Sánchez, 1989).



Fig. 2.19 Mezcal

⁶ Equivalente al rectificado en tequila

2.3. Lípidos

El término “lípidos” tradicionalmente ha sido usado para describir una amplia variedad de productos naturales que incluyen a los ácidos grasos y sus derivados, esteroides, terpenos, carotenoides y ácidos biliares, que tienen en común su solubilidad en disolventes orgánicos tales como el éter dietílico, hexano, benceno, cloroformo o metanol. Es preferible una definición más específica pero todavía no hay un acuerdo internacional y hoy en día, el término frecuentemente se restringe a los ácidos grasos y sus derivados naturales (ésteres o amidas) y a los compuestos relacionados biosintéticamente a los ácidos grasos (Christie, 1987).

La principal clase de lípidos consiste en los ácidos grasos (ácido monocarboxílico con cadena alifática larga) unidos por un enlace éster a un alcohol, principalmente a un tri-alcohol, glicerol, o por enlaces amida a bases de cadena larga (esfingoides). También, pueden contener ácido fosfórico, bases orgánicas, azúcares y componentes más complejos que pueden liberarse por diferentes procedimientos hidrolíticos. Los lípidos se pueden subdividir en dos amplias clases:

- *Lípidos Simples*: pueden hidrolizarse para dar uno o dos tipos diferentes de productos por mol.
- *Lípidos Complejos*: por hidrólisis producen tres o más productos diferentes por mol.

Los términos “neutral” y “polar” son utilizados para describir las clases descritas anteriormente, pero son menos precisos y pueden interpretarse ambiguamente, por ejemplo, los ácidos grasos sin esterificar son normalmente clasificados como lípidos neutrales a pesar de la presencia de un grupo carboxílico libre (Christie, 1987).

Los ácidos grasos comunes en plantas y animales tienen longitudes de 4 a 24 átomos de carbono en cadena lineal con un grupo carboxílico terminal y puede estar completamente saturado o tener uno, dos o más (hasta 6) dobles enlaces, generalmente tienen una configuración *cis* (Christie, 1987).

En las bebidas alcohólicas se han reportado un gran número de ácidos orgánicos, poco volátiles y no volátiles: los ácidos grasos de cadena media son compuestos importantes del sabor y precursores de ésteres. Las levaduras contienen ácidos grasos de 2 a 18 carbonos (Pollock, 1981). En el whisky se encontró que el ácido acético es cuantitativamente el más importante en donde comprende entre el 50-90% del total de los ácidos, el resto se encuentra dividido en ácido propiónico (1.5%), isobutírico (4.9%), butírico (1.5%), isovalérico (5.9%), hexanoico (4.2%), octanoico (26.7%), decanoico (31.6%), dodecanoico (16.2%), tetradecanoico (2.2%) y hexadecanoico (2.0%) (Berry, 1984).

Los ésteres constituyen un grupo importante entre los compuestos de bebidas alcohólicas destiladas y no destiladas (whisky, coñac, ron, tequila, mezcal y cerveza) por su fuerte y penetrante sabor a frutas (Benn y Peppard, 1996). Se ha encontrado que la mayoría de estos compuestos son originados del metabolismo de las levaduras durante la fermentación (Pollock, 1981; Vallejo, 1999) y algunos durante la destilación. El acetato de etilo es el que se encuentra en mayor cantidad, otros ésteres comunes son ésteres etílicos de ácidos grasos de cadena mediana y larga o acetatos de alcoholes superiores. En el Whisky, se han detectado ésteres de ácidos grasos saturados no ramificados que permanecen enlazados a la célula de la levadura; no son fácilmente excretados al medio durante la fermentación y son liberados durante la destilación (Berry, 1984).

2.4. NOM 070 SCFI-1994

La Secretaría de Comercio y Fomento Industrial (SCFI) de los Estados Unidos Mexicanos, con el fin de contar con una regulación técnica que establezca los fundamentos para garantizar la calidad de la bebida alcohólica denominada mezcal, así como proteger el buen uso de la denominación de origen correspondiente al mezcal publicada el 28 de noviembre de 1994 en el Diario Oficial de la Federación, publicó el 4 de junio de 1997 la Norma Oficial Mexicana NOM 070 SCFI-1994, Bebidas alcohólicas-mezcal-Especificaciones.

Esta Norma hace referencia a las especies de agave permisibles⁷ para la elaboración de mezcal, presenta una clasificación del tipo de mezcal de acuerdo al origen de los carbohidratos:

- Mezcal Tipo I: Mezcal 100% agave;
- Mezcal Tipo II: 80% carbohidratos de agave y 20% de otros carbohidratos permitidos.

Define además 3 categorías de mezcal de acuerdo a las características adquiridas en procesos posteriores a la destilación y rectificación: mezcal joven, mezcal reposado y mezcal añejo o añejado. También hace las siguientes especificaciones del producto en sus tipos I y II (Tabla 2.5).

Tabla 2.5 Especificaciones del mezcal, NOM 070 SCFI-1994.

Especificaciones	Mínimo	Máximo
% de alcohol en volumen a 20°C	36.0	55.0
Extracto seco g/L	0.2	10.0
Miligramos por 100 cm ³ referidos a alcohol anhidrido		
Acidez total (como ácido acético)		170.0
Alcoholes superiores mg/100 mL	100.0	400.0
Metanol mg/100 mL	100.0	300.0

⁷ Ver página 14.

Cabe destacar que las especificaciones del mezcal no incluyen evaluaciones de ésteres, aldehídos y furfural como en el caso del tequila, quizá debido a la poca información científica disponible para el caso del mezcal.

Es importante que los parámetros evaluados para la observancia de la calidad y denominación de origen sean más amplios y se consideren mas compuestos químicos descriptores de las características organolépticas.

3. Objetivos

3.1. Objetivo General

Caracterizar y cuantificar los lípidos simples (ácidos grasos, ésteres etílicos de ácidos grasos y acilglicéridos) en el mezcal y productos intermedios (agave cocido y mosto muerto).

3.2. Objetivos Específicos

Desarrollar una metodología apropiada para la extracción, concentración y limpieza de lípidos simples (ácidos grasos, ésteres etílicos de ácidos grasos y acilglicéridos) para la preparación de cada una de las diferentes matrices estudiadas: agave cocido, mosto muerto y mezcal, para su posterior análisis por cromatografía de gases capilar.

Establecer una metodología de análisis por cromatografía de gases con inyección en frío en columna (cold on-column) para la identificación y cuantificación simultánea de lípidos simples (ácidos grasos, ésteres etílicos de ácidos grasos y acilglicéridos).

Cuantificar los ácidos grasos, ésteres etílicos de ácidos grasos y acilglicéridos que se encuentran en las diferentes matrices estudiadas.

4. Desarrollo Experimental

4.1. Materiales y Equipo

4.1.1. Reactivos

Tabla 4.1 Reactivos utilizados en el desarrollo experimental

Reactivo	Fórmula	Marca
Cloruro de Sodio 99.5%	NaCl	J.T. Baker, Edo. de México, México
Diclorometano 99.8%	CH ₂ Cl ₂	J.T. Baker, Edo. de México, México
Etanol 99.9%	C ₂ H ₅ OH	J.T. Baker, Edo. de México, México
Hexametildisilazano, HMDS	((CH ₃) ₃ Si) ₂ NH	ReGIS, Morton Grove, Illinois, USA.
Hexanos 100.0%	C ₆ H ₁₄	J.T. Baker, Edo. de México, México
Metanol 99.9%	CH ₃ OH	J.T. Baker, Edo. de México, México
N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida, BSTFA	F ₃ CC(OSi(CH ₃) ₃)NSi(CH ₃) ₃	ReGIS, Morton Grove, Illinois, USA.
Piridina 99.9%	C ₅ H ₅ N	J.T. Baker, Edo. de México, México
Sulfato de Sodio anhidro 99.4%	Na ₂ SO ₄	J.T. Baker, Edo. de México, México

4.1.2. Estándares

Tabla 4.2 Estándares utilizados en el desarrollo experimental

Nombre		Fórmula	Abreviación	Marca
Sistemático	Trivial			
Ácidos Grasos				
Octanoico 99%	Caprílico	CH ₃ (CH ₂) ₆ COOH	C8	NU-CHEK-PREP, Elysian, Minnesota. USA.
Decanoico 99%	Cáprico	CH ₃ (CH ₂) ₈ COOH	C10	NU-CHEK-PREP, Elysian, Minnesota. USA.
Dodecanoico 99%	Laúrico	CH ₃ (CH ₂) ₁₀ COOH	C12	NU-CHEK-PREP, Elysian, Minnesota. USA.
Tridecanoico 99%	-	CH ₃ (CH ₂) ₁₁ COOH	C13	NU-CHEK-PREP, Elysian, Minnesota. USA.
Tetradecanoico 99%	Mirístico	CH ₃ (CH ₂) ₁₂ COOH	C14	NU-CHEK-PREP, Elysian, Minnesota. USA.
Pentadecanoico 99%	-	CH ₃ (CH ₂) ₁₃ COOH	C15	NU-CHEK-PREP, Elysian, Minnesota. USA.
Hexadecanoico 99%	Palmítico	CH ₃ (CH ₂) ₁₄ COOH	C16	NU-CHEK-PREP, Elysian, Minnesota. USA.
<i>Cis</i> 9-hexadecenoico 99%	Palmitoleico	CH ₃ (CH ₂) ₅ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH	C16:1	NU-CHEK-PREP, Elysian, Minnesota. USA.
Heptadecanoico 99%	Margárico	CH ₃ (CH ₂) ₁₅ COOH	C17	NU-CHEK-PREP, Elysian, Minnesota. USA.
Octadecanoico 99%	Esteárico	CH ₃ (CH ₂) ₁₆ COOH	C18	NU-CHEK-PREP, Elysian, Minnesota. USA.
<i>Cis</i> 9-octadecenoico 99%	Oleico	CH ₃ (CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH	C18:1	NU-CHEK-PREP, Elysian, Minnesota. USA.
<i>Cis</i> 9,12-octadecadienoico 99%	Linoleico	CH ₃ (CH ₂) ₄ (CH=CHCH ₂) ₂ (CH ₂) ₆ CO ₂ H	C18:2	NU-CHEK-PREP, Elysian, Minnesota. USA.
<i>Cis</i> 6,9,12-octadecatrienoico 99%	Linolénico	CH ₃ (CH ₂) ₄ (CH=CHCH ₂) ₃ (CH ₂) ₃ CO ₂ H	C18:3	NU-CHEK-PREP, Elysian, Minnesota. USA.
Eneicosanoico 99%	-	CH ₃ (CH ₂) ₁₉ COOH	C21	NU-CHEK-PREP, Elysian, Minnesota. USA.

Nombre		Fórmula	Abreviación	Marca
Sistemático	Trivial			
Ésteres Etlícos				
Octanoato 99%	Caprilato	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{COOC}_2\text{H}_5$	E8	NU-CHEK-PREP, Elysian, Minnesota. USA.
Decanoato 99%	Caprato	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{COOC}_2\text{H}_5$	E10	NU-CHEK-PREP, Elysian, Minnesota. USA.
Dodecanoato 99%	Laurato	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOC}_2\text{H}_5$	E12	NU-CHEK-PREP, Elysian, Minnesota. USA.
Tridecanoato 99%	-	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{COOC}_2\text{H}_5$	E13	NU-CHEK-PREP, Elysian, Minnesota. USA.
Tetradecanoato 99%	Miristato	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOC}_2\text{H}_5$	E14	NU-CHEK-PREP, Elysian, Minnesota. USA.
Pentadecanoato 99%	-	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}\text{COOC}_2\text{H}_5$	E15	NU-CHEK-PREP, Elysian, Minnesota. USA.
Hexadecanoato 99%	Palmitato	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOC}_2\text{H}_5$	E16	NU-CHEK-PREP, Elysian, Minnesota. USA.
<i>Cis</i> 9-hexadecenoato 99%	Palmitoleato	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOC}_2\text{H}_5$	E16:1	NU-CHEK-PREP, Elysian, Minnesota. USA.
Heptadecanoato 99%	Margarato	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{COOC}_2\text{H}_5$	E17	NU-CHEK-PREP, Elysian, Minnesota. USA.
Octadecanoato 99%	Estearato	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOC}_2\text{H}_5$	E18	NU-CHEK-PREP, Elysian, Minnesota. USA.
<i>Cis</i> 9-octadecenoato 99%	Oleato	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_9\text{COOC}_2\text{H}_5$	E18:1	NU-CHEK-PREP, Elysian, Minnesota. USA.
<i>Cis</i> 9,12-octadecadienoato 99%	Linoleato	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_2(\text{CH}_2)_6\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$	E18:2	NU-CHEK-PREP, Elysian, Minnesota. USA.
<i>Cis</i> 6,9,12-octadecatrienoato 99%	Linolenato	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_3(\text{CH}_2)_3\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$	E18:3	NU-CHEK-PREP, Elysian, Minnesota. USA.
Eneicosanoato 99%	-	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{19}\text{COOC}_2\text{H}_5$	E21	NU-CHEK-PREP, Elysian, Minnesota. USA.
Triacilglicéridos				
Tri-octanoína 99%	Tricaprilina	$\text{C}_3\text{H}_5(\text{O}_2\text{C}(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3)_3$	TG8	SIGMA, St. Louis, Missouri. USA.
Tri-hexadecanoína 99%	Tripalmitina	$\text{C}_3\text{H}_5(\text{O}_2\text{C}(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_3)_3$	TG16	SIGMA, St. Louis, Missouri. USA.
Tri-octadecanoína 99%	Triestearina	$\text{C}_3\text{H}_5(\text{O}_2\text{C}(\text{CH}_2)_{16}\text{CH}_3)_3$	TG18	SIGMA, St. Louis, Missouri. USA.
Diacilglicéridos				
Di-octanoína 99%	Dicaprilina	$\text{C}_3\text{H}_5\text{OH}(\text{O}_2\text{C}(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3)_2$	DG8	SIGMA, St. Louis, Missouri. USA.
Di-octadecanoína 99%	Diestearina	$\text{C}_3\text{H}_5\text{OH}(\text{O}_2\text{C}(\text{CH}_2)_{16}\text{CH}_3)_2$	DG18	SIGMA, St. Louis, Missouri. USA.
Monoacilglicéridos				
Mono-octanoína 99%	Monocaprilina	$\text{C}_3\text{H}_5(\text{OH})_2\text{O}_2\text{C}(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$	MG8	SIGMA, St. Louis, Missouri. USA.
Mono-octadecanoína 99%	Monoestearina	$\text{C}_3\text{H}_5\text{OH}((\text{O}_2\text{C}(\text{CH}_2)_{16}\text{CH}_3)_2$	MG18	SIGMA, St. Louis, Missouri. USA.

4.1.3. Disoluciones Estándar

Se preparó una disolución de 2000 mg/L de cada estándar, se pesaron alrededor de 20 mg de cada uno y se disolvieron en hexano, cuando la solubilidad en hexano no fue completa se adicionaron gotas de diclorometano para posteriormente llevar la disolución al aforo de 10 ml con hexano. Se almacenaron en viales de vidrio ambar con capacidad de 14 mL, sellados con teflón y con tapa de rosca y se mantuvieron a una temperatura de -10 °C.

4.1.4. Material

- Rotavapor marca Büchi, modelo KRvr 65/45.
- Agitador Vortex marca Thermolyne, modelo Maxi Mix II, tipo 37600.
- Parrilla con Agitador Magnético marca Cole Parmer, modelo 04644.
- Extractor de Jugos marca Turmix, modelo 100537.

4.1.5. Muestras

Se realizó un muestreo en diferentes puntos del proceso de elaboración del mezcal 100% agave. Para ello, se contactó con un grupo de productores de mezcal de la población Santiago Matatlán ubicada en el distrito de Tlacolula del estado de Oaxaca, quienes elaboran mezcal bajo la marca *Espina Dorada*®. El agave cocido, mosto muerto y mezcal 100% agave correspondieron a un mismo lote de *Agave angustifolia* procesado en agosto de 2004; las características de ese lote son: agaves de al menos 8 años de edad y de peso promedio de 50 kg, cultivados en la población de Soledad Salinas, La Reforma, Yautepec, Oaxaca.

4.1.5.1. Agave Cocido

Posterior a la cocción (que duró 5 días), las piñas de agave permanecieron 3 días expuestas al ambiente, de éstas se muestrearon 5 piñas hasta obtener 3 kg de muestra aleatoria, la muestra en conjunto fue identificada, acondicionada y transportada al laboratorio donde se almacenó en congelación a -10 °C envueltas en papel aluminio y bolsas de plástico negras.

4.1.5.2. Mosto Muerto

Una vez que, de acuerdo al criterio de los productores (cata cada 8 horas), el mosto se encontraba listo para destilarse (4 días), se procedió a tomar la muestra del mosto muerto en la tina de fermentación, el muestreo se realizó en 3 puntos de la tina a diferentes alturas hasta completar 4 litros, los cuales fueron identificados y acondicionados para su transporte al laboratorio en donde se almacenaron en congelación a -10 °C en frascos de vidrio envueltos en aluminio y bolsas de plástico negras.

4.1.5.3. Mezcal 100% Agave

Concluida la producción del mezcal de acuerdo al proceso ejercido por los productores: doble destilación, partiendo de 6 “puestas” de aproximadamente 140 L, en cada puesta se recupera 1 L de cabeza y 60 L de cuerpo, el cuerpo de las 6 puestas (360 L) se redestiló y se desechó 1 L de cabeza y se obtuvo 80 L de mezcal que posteriormente se ajustó a 50° GL, se

dispuso de 2 litros de mezcal en un recipiente de vidrio previamente lavado, tapado e identificado para su transporte al laboratorio, donde se almacenó a temperatura ambiente.

4.2. Métodos

Los métodos descritos a continuación se basaron en los resultados obtenidos en trabajos previos desarrollados en el laboratorio (Peña et al., 2004), y modificados de acuerdo a las características de las matrices de las muestras y a los objetivos particulares de este trabajo.

Para la identificación y cuantificación, se dispuso de un panel de ácidos grasos: C8, C10, C12, C13, C14, C15, C16, C16:1, C17, C18, C18:1, C18:2, C18:3, C21; un panel de ésteres etílicos: E8, E10, E12, E13, E14, E15, E16, E16:1, E17, E18, E18:1, E18:2, E18:3, E21 y un panel de acilglicéridos: MG8, MG18, DG8, DG18, TG8, TG16, TG18.

4.2.1. Análisis Cualitativo de Lípidos Simples por CG

Para identificar los analitos de interés, se determinaron los tr relativos (trr) al estándar interno (EI) C13⁸ para los ácidos grasos y E13 para los ésteres etílicos y acilglicéridos.

Se prepararon diferentes disoluciones estándar en hexano a una concentración de 20 mg/L de cada analito para determinar su trr. Para los ácidos grasos se prepararon 4 disoluciones estándar de ácidos (DEA):

- DEA1: C8, C10, C12, C13, C14, C15, C16, C16:1, C17, C18, C18:1, C18:2, C18:3, C21.
- DEA2: C8, C12, C13, C15, C16:1, C17, C18:2 y C21.
- DEA3: C10, C13, C14, C16, C18:1, C18, C21.
- DEA4: C13, C18:1, C18:3.

Para ésteres etílicos se prepararon disoluciones de la misma concentración bajo la denominación: disolución estándar de ésteres, (DEE).

- DEE1: E8, E10, E12, E13, E14, E15, E16, E16:1, E17, E18, E18:1, E18:2, E18:3, E21.
- DEE2: E8, E12, E13, E15, E16:1, E17, E18:2 y E21.
- DEE3: E10, E13, E14, E16, E18:1, E18, E21.
- DEE4: E13, E18:1, E18:3.

Para acilglicéridos se prepararon 3 disoluciones estándar: disolución estándar de monoacilglicéridos (DEM), disolución estándar de diacilglicéridos (DED), disolución estándar de triacilglicéridos (DET).

- DEM: E13, MG8, MG18.

⁸ En análisis preeliminares se demostró que el C13 y el E13 se encuentran ausentes en el Mezcal y en Agave

- DED: E13, DG8, DG18.
- DET: E13, TG8, TG16, TG18.

Los acilglicéridos, se determinaron como monoacilglicéridos (MG), diacilglicéridos (DG) y triacilglicéridos (TG), sin considerar su composición individual. Para MG, se utilizó como referencia el MG de 8 y 18 carbonos y las áreas de los picos comprendidos entre este intervalo de tiempo se sumaron y reportaron como MG totales; el mismo procedimiento fue realizado para DG y TG. Cabe recalcar que esta decisión se sustentó en determinaciones preliminares en las que demostramos que el intervalo abarcaba solo los compuestos agrupados.

Para realizar la determinación simultánea de los lípidos simples, las disoluciones estándar que contenían C, MG y DG se silanizaron⁹ antes de su análisis cromatográfico para evitar una retención excesiva y coleo de los picos¹⁰. Se tomaron 2 mL de la disolución estándar correspondiente y se silanizaron adicionando 100 µL de HMDS, 100 µL de BSTFA y 50 µL de piridina, calentando a 80 °C durante 1 hora. Enfriada ésta disolución, se inyectó 1 µL de cada disolución en el cromatógrafo de gases.

Para ácidos grasos y ésteres etílicos, la identificación se confirmó utilizando CG-EM. Se compararon los patrones de fragmentación de las muestras con los patrones de fragmentación de las disoluciones estándar y con los espectros de la base de datos del equipo (biblioteca del *National Institute of Standard and Technology*, NIST-MS-2.0).

4.2.1.1. Análisis Cromatográfico

El análisis cromatográfico comprendió un programa de temperatura simultáneo a un programa de presión para reducir el tiempo de análisis y disminuir la temperatura de elución de los acilglicéridos principalmente.

Se utilizó un Cromatógrafo de Gases *Hewlett Packard (HP)* modelo *5890 series II Plus*, equipado con inyección en frío en columna (cold on-column), detector de ionización de flama (FID) y control electrónico de presión. El CG se manejó a través de una PC con el software *HP 3365 series II ChemStation*, versión A.03.34 con las siguientes condiciones cromatográficas:

- Columna capilar: ZB-5, Zebrón, 5% fenilpolisiloxano, 30 m de longitud (L), 0.25 mm de diámetro interno (D.I.), 0.25 µm de espesor de película.
- Inyector: 3 °C arriba de la temperatura del horno (Oven Track on)

⁹ Reacción de derivatización de una molécula, en este caso se cambian los grupos OH por SILANO

¹⁰ Término cromatográfico utilizado para describir la deformación de los picos cromatográficos hacia la derecha en el cromatograma.

- Detector: 370 °C
- Programa de temperatura:
 - Temperatura inicial: 50 °C durante 1 min
 - Rampa 1: 50 – 270 °C a 10 °C/min
 - Rampa 2: 270 – 360 °C a 20 °C/min
 - Isotherma: 360 °C durante 17.5 min
 - Rampa 3: 360 – 370 °C a 10 °C/min
- Programa de presión:
 - Presión inicial: 12 Psi durante 1 min
 - Rampa1: 12 – 22.4 Psi a 0.50 Psi/min
 - Rampa2: 22.4 – 50 Psi a 10 Psi/min
 - Isóbara: 50 Psi urante 21.44 min

4.2.1.2. Análisis por CG-EM

Se utilizó un Cromatógrafo de Gases *HP 5890* equipado con inyector split/splitless acoplado a un Espectrómetro de Masas *HP 5971*, por Impacto Electrónico y analizador cuadrupolar. El CG-EM se manejó a través de una PC con el software *HP G1034C*, versión C.03.00. bajo las siguientes condiciones de operación:

- Columna capilar: DB-5, J&W Scientific, 5% fenilpolisiloxano, 30 m L, 0.25 mm D.I., 0.25 µm de espesor de película.
- Inyector: 250 °C, modo splitless (1 min)
- Gas acarreador: Helio 1 mL/min
- Programa de temperatura:
 - Temperatura inicial: 60 °C durante 1 min
 - Rampa: 60 – 300 °C a 10 °C/min
 - Isotherma: 300 °C durante 15 min
- Línea de transferencia: 280 °C.
- Fuente de ionización: 175 °C.
- Impacto electrónico 70 eV.
- Analizador: 150 °C.
- Detector (EM): 75 °C,
- Modo SCAN (50-550 m/z) a 1.5 scan.s⁻¹.

4.2.2. Análisis Cuantitativo

Se desarrolló una metodología para la extracción, concentración y limpieza de los lípidos simples en cada muestra. Los métodos se basan en la extracción líquido-líquido con hexano, la identificación por trr y la cuantificación por curvas de calibración relativas; utilizando las curvas de calibración del C21 y E21 para cuantificar los ácidos grasos y ésteres etílicos respectivamente y la curva de calibración del TG16 para cuantificar los MG, DG y TG.

4.2.2.1. Cuantificación de Lípidos Simples en Agave Cocido

Para la cuantificación de los lípidos simples en agave cocido, se prepararon las curvas de calibración relativas del C21, E21 y TG16¹¹, cada una con 7 puntos de concentración, para las curvas de calibración del C21 y E21 las disoluciones contenían concentración de 0.5, 1, 5, 10, 20, 30 y 60 mg/L. Para la curva de calibración del TG16 las disoluciones contenían concentración de 1.5, 3, 15, 30, 60, 90 y 180 mg/L. Se prepararon las siguientes disoluciones:

- *Estándar Stock* que por dilución en hexano de las disoluciones estándar¹² contenía 200 mg/L de C21 y E21 y 600 mg/L de TG16.
- *Estándar Interno* que por dilución en hexano de las disoluciones estándar contenía 200 mg/L de C13 y E13.
- *Disolución Metanólica*: Metanol : Agua (1:1)

Muestra de agave cocido:

1. Se pesaron 50 g de agave cocido homogenizado y se extrajo el jugo en el extractor de jugos, se recuperó el bagazo y se repitió la extracción dos veces mas con el mismo bagazo. El bagazo se lavó con 100 mL de disolución metanólica. El extracto y la disolución metanólica de lavado se juntaron y se filtraron en un matraz Erlen Meyer de 250 mL.

Con éste mismo procedimiento se prepararon 7 puntos de la curva adicionando la disolución estándar stock y el hexano como se indica en la *Tabla 4.3*:

Tabla 4.3 Preparación de la curva de calibración para agave cocido

	<i>Disol. 1</i>	<i>Disol. 2</i>	<i>Disol. 3</i>	<i>Disol. 4</i>	<i>Disol. 5</i>	<i>Disol. 6</i>	<i>Disol. 7</i>
Agave Cocido ¹³	50 g						
Estándar stock	5 µL	10 µL	50 µL	100 µL	200 µL	300 µL	600 µL
Hexano	20 mL x 3						

¹¹ En análisis preeliminares se demostró que el C21, E21 y TG16 no están presentes en el Mezcal y en el Agave.

¹² Ver página 28

¹³ Preparado como se indica en el punto 1

2. Cada disolución ya preparada, con el matraz tapado, se pusieron en agitación (1 200 rpm) durante 30 minutos, a 20 °C.
3. Transcurridos los 30 minutos, la disolución se equilibró por 2 minutos antes de destapar el matraz, se vertió a un embudo de separación de 250 mL, se recuperó la fase hexánica y se centrifugó para la separación completa.
4. Se repitieron los puntos 2 y 3 para 2 adiciones más de 20 mL de hexano, la fase hexánica obtenida de las 3 extracciones se recombinó y se evaporó en rotavapor a 40 °C, 65 rpm y 320 mbar hasta un volumen menor o igual a 2 mL.
5. Se ajustó el volumen del extracto a 2 mL, se le adicionó Na₂SO₄ anhidro y se transfirió a un vial de 4 mL, se añadieron 300 µL de EI a cada vial y se silanizó cada extracto agregando 100 µL de HMDS, 100 µL de BSTFA y 50 µL de piridina, calentando a 80 °C durante 1 hora.
6. Se inyectó 1 µL de cada disolución en el cromatógrafo de gases bajo las condiciones de operación descritas en *Análisis Cromatográfico*¹⁴.
7. La identificación de los analitos se determinó por trr y la cuantificación utilizando la curva de calibración. Graficándose el área relativa contra la concentración del estándar en cada punto. Para el cálculo de la concentración en agave cocido se utilizó la ecuación de la recta de la curva y los correspondientes factores de dilución.

4.2.2.2. Cuantificación de Lípidos Simples en Mosto Muerto

Para la cuantificación de los lípidos simples en mosto muerto, se prepararon las curvas de calibración relativas del C21, E21 y TG16, cada una con 5 puntos de concentración, para las curvas de calibración del C21 y E21 las disoluciones contenían concentración de 1, 5, 10, 20 y 30 mg/L. Para la curva de calibración del TG16 las disoluciones contenían concentración de 3, 15, 30, 60 y 90 mg/L. Se prepararon las siguientes disoluciones:

- *Estándar Stock* que por dilución en hexano de las disoluciones estándar¹⁵, contenía 200 mg/L de C21 y E21 y 600 mg/L de TG16.
- *Estándar Interno* que por dilución en hexano de las disoluciones estándar contenía 200 mg/L de C13 y E13.

Muestra de mosto muerto:

¹⁴ Ver página 31

¹⁵ Ver página 28

1. El mosto muerto se homogenizó y filtró previo al análisis, se vertieron alícuotas de 100 mL en matraces Erlen Meyer de 250 mL, a cada uno se le adicionó 20 mL de hexano y disolución estándar stock de acuerdo a la *Tabla 4.4*:

Tabla 4.4 Preparación de la curva de calibración para mosto muerto

	<i>Disol. 1</i>	<i>Disol. 2</i>	<i>Disol. 3</i>	<i>Disol. 4</i>	<i>Disol. 5</i>
Mosto muerto	100 mL				
Estándar stock	10 µL	50 µL	100 µL	200 µL	300 µL
Hexano	20 mL x 3				

2. Cada disolución ya preparada, con el matraz tapado, se puso en agitación (1 200 rpm) durante 30 minutos, a 20 °C.
3. Transcurridos los 30 minutos, la disolución se equilibró por 2 minutos antes de destapar el matraz, se vertió a un embudo de separación de 250 mL, se recuperó la fase hexánica y se centrifugó para la separación completa.
4. Se repitieron los puntos 2 y 3 para 2 adiciones más de 20 mL de hexano, la fase hexánica obtenida de las 3 extracciones se recombino y se evaporó en rotavapor a 40 °C, 65 rpm y 320 mbar hasta un volumen menor o igual a 2 mL.
5. Se ajustó el volumen del extracto a 2 mL, se le adicionó Na₂SO₄ anhidro y se transfirió a un vial de 4 mL, se añadieron 300 µL de EI a cada vial y se silanizó cada extracto agregando 100 µL de HMDS, 100 µL de BSTFA y 50 µL de piridina, calentando a 80 °C durante 1 hora.
6. Se inyectó 1 µL de cada disolución en el cromatógrafo de gases bajo las condiciones de operación descritas en *Análisis Cromatográfico*¹⁶.
7. La identificación de los analitos se determinó por trr y la cuantificación utilizando la curva de calibración. Grificándose el área relativa contra la concentración del estándar en cada punto. La concentración en mosto muerto se obtuvo utilizando la ecuación de la recta de la curva y los correspondientes factores de dilución.

¹⁶ Ver página 31

4.2.2.3. Cuantificación de Lípidos Simples en Mezcal

Para la cuantificación de los lípidos simples en mezcal, se prepararon las curvas de calibración relativas del C21 y E21, cada una con 5 puntos de concentración, para las curvas de calibración del C21 y E21 las disoluciones contenían concentración de 1, 5, 10, 20 y 30 mg/L. Se prepararon las siguientes disoluciones:

- *Estándar Stock* que contenía 200 mg/L de C21 y E21 por dilución 1:10 en hexano de las disoluciones estándar¹⁷.
- *Estándar Interno* que contenía 200 mg/L de C13 y E13 por dilución 1:10 en hexano de las disoluciones estándar.
- Disolución saturada de NaCl.

Como una alternativa para la cuantificación de lípidos simples en mezcal, se determinaron los factores de respuesta (Fr) a las concentraciones determinadas por curva de calibración relativa con el fin de eliminar el uso de curvas de calibración relativas y basar la determinación en un solo punto generado por una disolución estándar. Consecuentemente fue necesario determinar también el recobro (%R) de los analitos en la fase extractante.

4.2.2.3.1. Curva de Calibración Relativa

1. Se tomaron 5 alícuotas de 10 mL de mezcal y se vertieron en matraces volumétricos de 25 mL, a cada uno de los matraces se le adicionaron 10 mL de disolución saturada de NaCl, 2 mL de hexano y disolución estándar stock de acuerdo a la *Tabla 4.5*:

Tabla 4.5 Preparación de la curva de calibración para mezcal

	<i>Disol. 1</i>	<i>Disol. 2</i>	<i>Disol. 3</i>	<i>Disol. 4</i>	<i>Disol. 5</i>
Mezcal	10 mL				
Disolución saturada de NaCl	10 mL				
Disolución estándar stock	10 µL	50 µL	100 µL	200 µL	300 µL
Hexano	2 mL				

2. Cada disolución, una vez preparada, se agitó durante 2 min en vortex y posteriormente se agregó disolución saturada de NaCl suficiente para observar el menisco de la fase hexánica y facilitar su recuperación.
3. Una vez recuperada la fase hexánica, se ajustó el volumen del extracto a 2 mL, se le adicionó Na₂SO₄ anhidro y se transfirió a un vial de 4 mL, se añadieron 300 µL de EI a cada vial y se

¹⁷ Ver página 28

silanizó cada extracto agregando 100 µL de HMDS, 100 µL de BSTFA y 50 µL de piridina, calentando a 80 °C durante 1 hora.

4. Se inyectó 1 µL de cada disolución en el cromatógrafo de gases bajo las condiciones de operación descritas en *Análisis Cromatográfico*¹⁸ pero se eliminó el programa de presión (manteniendo el flujo constante: 2 mL/min) y se modificó el programa de temperatura ya que durante el análisis cualitativo se comprobó que el mezcal no contenía acilglicéridos, por lo que se modificaron algunas condiciones cromatográficas:
 - Temperatura inicial: 50 °C durante 1 min
 - Rampa 1: 50 – 300 °C a 10 °C/min
 - Rampa 2: 300 – 360 °C a 20 °C/min
 - Isotherma: 360 °C durante 1 min
5. La identificación de los analitos se determinó por trr y la cuantificación utilizando la curva de calibración graficándose el área relativa contra la concentración del estándar en cada punto. La concentración en mezcal se obtuvo utilizando la ecuación de la recta de la curva y los correspondientes factores de dilución.

4.2.2.3.2. Determinación de Factor de Respuesta

Con las concentraciones (determinadas por el método de curva de calibración relativa), de los analitos en la disolución final de hexano, se preparó una *disolución estándar de lípidos* en hexano, que contenía concentraciones semejantes a las determinadas para cada analito (*Tabla 4.6*):

Tabla 4.6 Concentración en *disolución estándar de lípidos*

Analito	mg/L	Analito	mg/L
E8	17.0	C8	13.0
E10	31.0	C10	17.0
E12	19.0	C12	10.0
E14	5.0	C14	5.0
E15	1.0	C15	2.0
E16:1	1.0	C16:1	2.0
E16	11.0	C16	23.0
E17	2.0	C17	2.0
E18:2+18:1	15.0	C18:2	11.0
E18:3	4.0	C18:3+18:1	7.0
E18	1.0	C18	3.0

¹⁸ Ver página 31

De esta disolución se tomó una alícuota de 2 mL, se silanizó¹⁹ y se inyectó al cromatógrafo de gases²⁰. El análisis se repitió para dos alícuotas más. Los cálculos del factor de respuesta (Fr) para cada analito, se hicieron a partir de las áreas relativas (Ar), y la concentración del estándar interno.

4.2.2.3.3. Determinación del Recobro (%R)

Para determinar el recobro de cada analito, se preparó un “*símil del mezcal*” esta disolución consistió en una disolución etanólica al 50%²¹. De ésta disolución se tomó una alícuota de 10 mL y se vertió en un matraz volumétrico de 25 mL, se adicionaron 10 mL de disolución saturada de NaCl y 2 mL de la *disolución estándar de lípidos (Tabla 4.6)*; ésta disolución se preparó por triplicado. A continuación estas disoluciones son tratadas como se indica en los puntos 2, 3 y 4 de la “*Cuantificación de Lípidos Simples en el Mezcal.- Curva de Calibración Relativa*”²², y se determina el %R por diferencia de las áreas relativas generadas por la disolución estándar de lípidos antes y después de la *retroextracción*²³

4.2.2.3.4. Cuantificación por Factor de Respuesta considerando el Recobro (%R)

Con los factores de respuesta y el recobro determinados a través de la metodología descrita en los dos incisos anteriores, se cuantificaron los lípidos simples en mezcal, para ello, las muestras de mezcal (n = 3) se prepararon como se indica en los puntos 1 a 4 de *Cuantificación de Lípidos Simples en Mezcal.- Curva de Calibración Relativa*²⁴ sin adicionar disolución estándar stock.

Posterior al análisis cromatográfico, la identificación de los analitos se determinó por trr y la cuantificación se realizó utilizando directamente los factores de respuesta y considerando el recobro.

¹⁹ Punto 3 de “*Curva de Calibración Relativa*” página 36

²⁰ Punto 4 de “*Curva de Calibración Relativa*” página 37

²¹ El mezcal objeto de estudio tenía esa graduación alcohólica determinada en el laboratorio

²² Página 36

²³ llamada así porque el analito migra hacia la fase etanólica (símil del mezcal) a partir de la fase hexano (disol. estándar de lípidos)

²⁴ Página 36

5. Resultados y Discusión de Resultados

5.1. Análisis Cualitativo de Lípidos Simples por CGC

Se determinaron los tiempos de retención relativos (trr) de los compuestos de interés utilizando una serie de disoluciones estándar²⁵. La *Tabla 5.1* resume estos resultados.

En color azul se muestran los compuestos que sirvieron como estándar interno: C13 para los ácidos grasos y E13 para los ésteres etílicos y acilglicéridos. En color rojo los compuestos que sirvieron como estándares para las curvas de calibración relativas: C21 para los ácidos grasos, E21 para los ésteres etílicos y TG16 para los acilglicéridos.

Los compuestos C18:1 y C18:3 coeluyen, razón por la cual se decidió determinarlos en conjunto para el análisis cuantitativo, de igual manera se procedió con el E18:1 y E18:2 ya que presentaron el mismo problema, los casos de coelusión se resaltan en color verde.

Tabla 5.1 Tabla de identificación por trr

Ácidos	tr	trr	Ésteres	tr	trr
C8	9.3527	0.6141	E8	8.3703	0.5739
C10	11.8702	0.7794	E10	11.0525	0.7578
C12	14.1608	0.9298	E12	13.4648	0.9232
C13	15.2300	1.0000	E13	14.5850	1.0000
C14	16.2504	1.0670	E14	15.6497	1.0730
C15	17.2236	1.1309	E15	16.6677	1.1428
C16:1	17.9744	1.1802	E16:1	17.4465	1.1962
C16	18.1648	1.1927	E16	17.6493	1.2101
C17	19.0633	1.2517	E17	18.5769	1.2737
C18:2	19.6604	1.2909	E18:2	19.1982	1.3163
C18:1	19.7076	1.2940	E18:1	19.1996	1.3164
C18:3	19.7213	1.2949	E18:3	19.2624	1.3207
C18	19.9269	1.3084	E18	19.4753	1.3353
C21	22.3089	1.4648	E21	21.9635	1.5059
			MG	22.4000 – 25.0424	1.5358 – 1.7170
			DG	27.5000 – 28.5282	1.8855 – 1.9560
			TG16	34.8776	2.3913
			TG	33.7317 – 43.0257	2.3127 - 2.9500

²⁵ Ver página 30

5.2. Análisis Cuantitativo

5.2.1. Cuantificación de Lípidos Simples en Agave cocido

Para extraer el jugo del agave cocido, se probaron diferentes formas

- Mortero
- Licuadora
- Extractor de Jugos

Para recuperar el jugo se empleó la técnica de filtración asistida por vacío, finalmente se decidió que el empleo del extractor de jugos era lo más adecuado por la menor manipulación de la muestra.

Para la extracción líquido-líquido de lípidos simples se probaron: hexano, hexano-diclorometano (1:1), hexano-butanol (1:1), la extracción con menos interferencias (picos cromatográficos de interés) se logró con hexano.

El jugo del agave cocido, utilizado directamente como matriz acuosa para la extracción líquido-líquido con hexano, forma una emulsión que no se logró romper, se modificó la matriz diluyendo el jugo con diferentes volúmenes de agua destilada, ninguna dilución produjo una satisfactoria separación de las fases, ni aun sometiendo la emulsión a centrifugación; finalmente se probó una dilución con metanol-agua (1:1), la cual en un principio forma una emulsión como las demás pero al romper mecánicamente la emulsión y centrifugar se logró una separación satisfactoria.

Se probaron diversas cantidades de muestra, 20, 50 y 100 g de agave cocido. Con 20 g de muestra los ésteres no eran detectables por lo que se decidió trabajar con 50 g porque contenía cantidades detectables de los analitos a analizar.

También se probaron diferentes volúmenes de fase orgánica (20 y 40 mL), en principio solo se realizaba una extracción pero ninguno de los dos volúmenes de extracción demostró ser reproducible, siempre se recuperaron volúmenes diferentes de fase orgánica, por esto se decidió controlar la temperatura de extracción y hacer 3 extracciones sucesivas con 20 mL de hexano cada una. Esta última forma demostró ser reproducible.

La extracción así establecida recupera un volumen cercano a 60 mL de hexano, para la concentración de esta solución se comparó la evaporación por flujo de nitrógeno y por rotavapor. La evaporación por rotavapor fue preferida sobre la realizada por el flujo de nitrógeno que como

consecuencia del proceso perdía los ésteres etílicos de longitud de cadena mediana, además de que involucra el gasto del gas y tiempo.

La metodología finalmente establecida se describe en el *desarrollo experimental*²⁶. La separación cromatográfica obtenida se muestra en la *Figura 5.1*

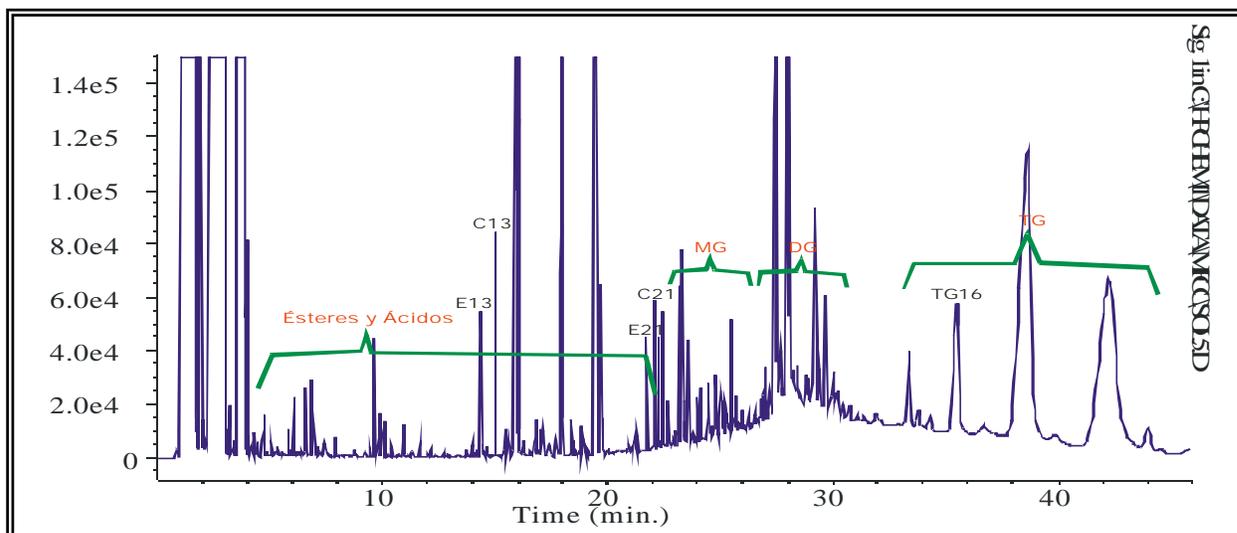


Fig. 5.1 Cromatograma de lípidos simples en agave cocido.

Los coeficientes de correlación de las curvas de calibración fueron mayores a 0.999, como se muestra en la *Figuras 5.2, 5.3 y 5.4*

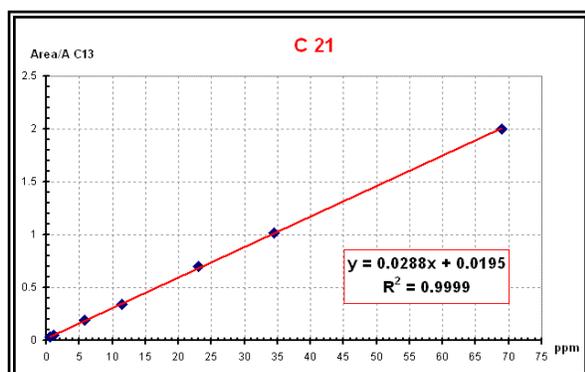


Fig. 5.2 Curva de calibración para ácidos grasos en Agave Cocido

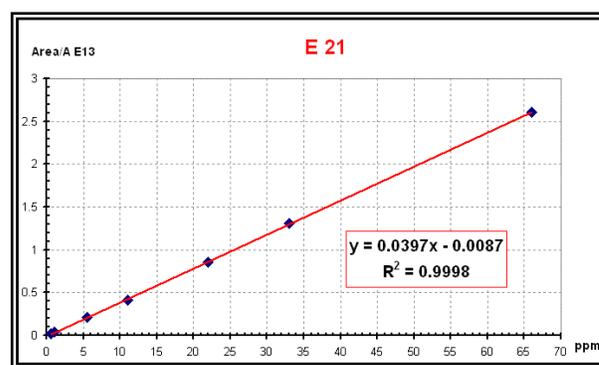


Fig. 5.3 Curva de calibración para ésteres etílicos en Agave Cocido

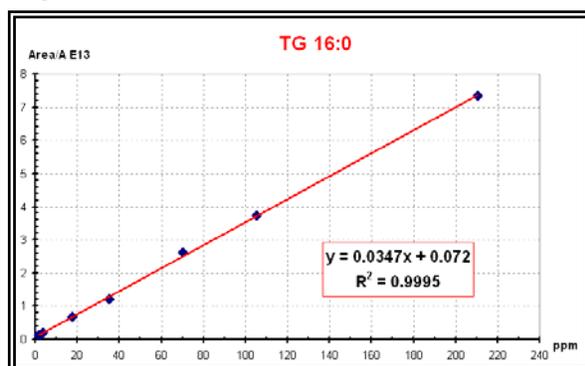


Fig. 5.4 Curva de calibración para acilglicéridos en Agave Cocido

²⁶ Ver página 33, Cuantificación de Lípidos Simples en Agave Cocido.

Los resultados de la cuantificación de lípidos simples para el agave cocido se muestran en la *Tabla 5.2*. Es importante hacer notar la precisión del método, ya que sólo uno de los analitos presentó un CV \gg 10 %, comprensible por la concentración baja en que se encuentra.

Tabla 5.2 Concentración de lípidos simples determinada en agave cocido

Analito	mg/kg	CV(n=5)	Analito	mg/kg	CV(n=5)
C8	0.003	31.58	E8	0.02	0.98
C10	0.08	9.79	E10	0.03	9.23
C12	0.07	7.85	E12	0.03	7.06
C14	0.47	7.49	E14	0.35	9.11
C15	0.16	2.08	E15	0.04	3.43
C16:1	0.02	6.00	E16:1	0.25	1.73
C16	11.01	3.21	E16	0.09	3.09
C17	0.17	3.29	E17	0.25	10.39
C18:2	16.37	3.64	E18:2+18:1	0.17	1.99
C18:3+18:1	7.28	2.99	E18:3	0.08	3.25
C18	1.00	3.10	E18	0.03	3.36
			MG	9.20	4.61
			DG	50.36	3.86
			TG	91.83	4.38

5.2.2. Cuantificación de Lípidos Simples en Mosto Muerto

Para la preparación de la muestra se retomaron las experiencias obtenidas en el desarrollo de la metodología para el agave cocido, es decir, se decidió trabajar con hexano como extractante con 3 extracciones sucesivas con las mismas condiciones de temperatura y agitación, que se determinaron para agave cocido.

La extracción líquido-líquido con hexano del mosto muerto presentó problemas de emulsión, se intentó resolver el problema basándose en las experiencias de la ELL con hexano del mosto muerto de Tequila²⁷; para esta matriz el problema de emulsión se resolvió modificándola con solución saturada de cloruro de sodio, rompiendo la emulsión mecánicamente y centrifugando para separación total. Sin embargo, la emulsión formada por el mosto muerto no se comportó de igual manera, por tal motivo y en consecuencia con nuestro trabajo previo, se probaron diferentes adiciones de solución saturada de cloruro de sodio; en ninguna de las adiciones probadas se logró la ruptura de la emulsión. Finalmente se demostró que la sola matriz sin modificación por cloruro de sodio permitía la mejor separación (sin ser la óptima) de las fases tras romper mecánicamente y centrifugar la emulsión.

²⁷ Metodología desarrollada en el mismo laboratorio para el Tequila en un trabajo previo (Peña et al., 2004).

Debido a la baja cantidad de ácidos grasos libres y ésteres etílicos presentes en el mosto muerto se probaron diferentes volúmenes de muestra, 20, 50 y 100 mL, en consecuencia se decidió emplear el mayor volumen de mosto muerto por lo que se seleccionó 100 mL.

Las condiciones establecidas para la extracción, limpieza y concentración de lípidos simples en mosto muerto se especifican en el *Desarrollo Experimental*²⁸.

La separación cromatográfica de los lípidos simples en mosto muerto se muestra en la *Figura 5.5*

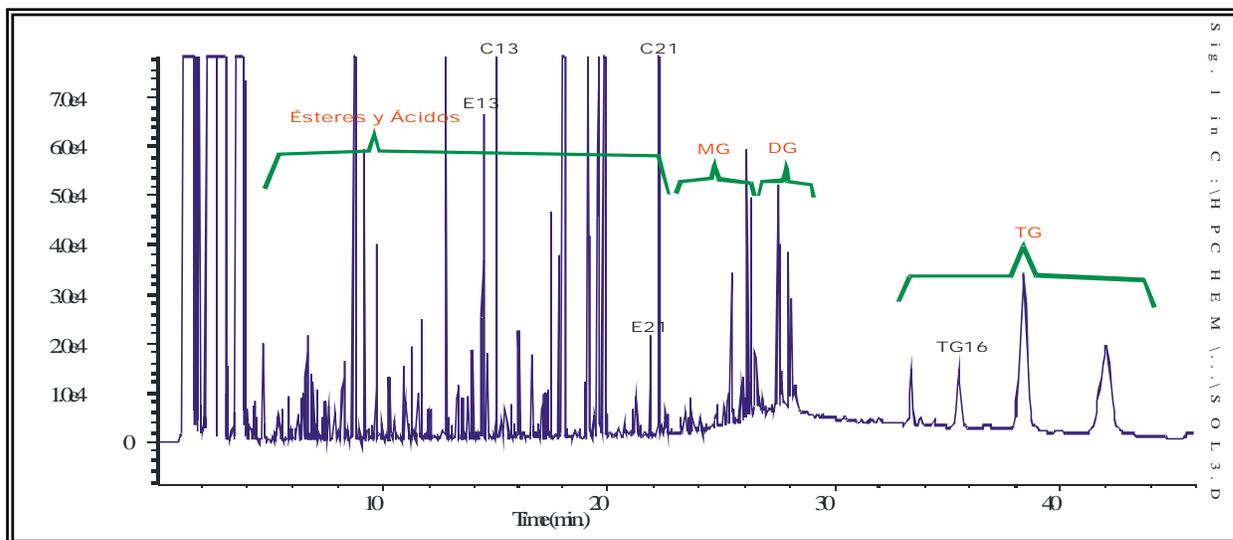


Fig. 5.5 Cromatograma de lípidos simples en mosto muerto

Los coeficientes de correlación para las curvas de calibración fueron mayores a 0.999 como lo muestran las *Figuras 5.6, 5.7 y 5.8*

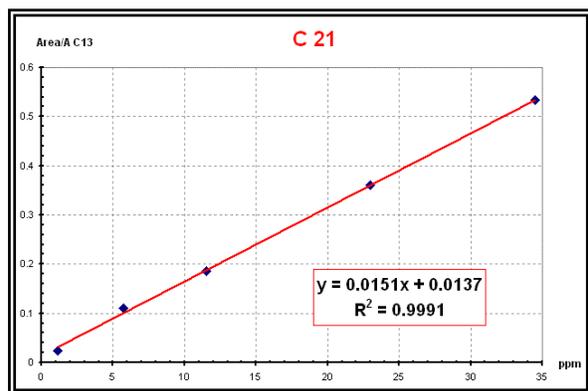


Fig. 5.6 Curva de calibración para ácidos grasos en Mosto Muerto.

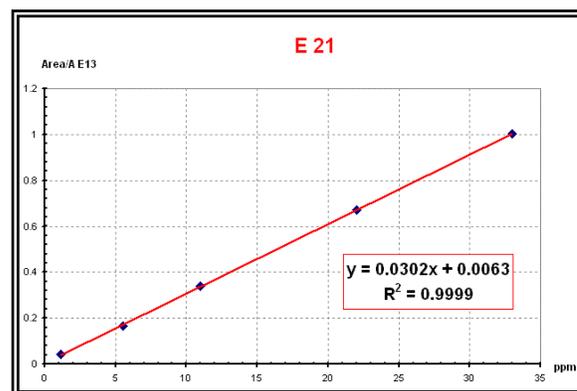


Fig. 5.7 Curva de calibración para ésteres etílicos en Mosto Muerto.

²⁸ Ver página 34, Cuantificación de Lípidos Simples en Mosto Muerto.

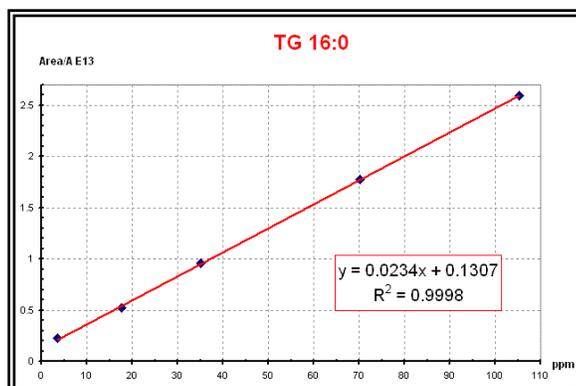


Fig. 5.8 Curva de calibración para acilglicéridos en Mosto Muerto

Los resultados de la cuantificación se muestran en la *Tabla 5.3*. Se obtuvo buena precisión del método de acuerdo a los coeficientes de variación determinados, solo un analito (MG) mostró un CV muy superior a 10 % debido posiblemente a que en el tiempo donde eluyen los MG se presentó un considerable sangrado de la columna lo que afectó la línea base y por tanto las condiciones de integración (ver *Figura 5.5*).

Tabla 5.3 Concentración de lípidos simples determinada en mosto muerto

Analito	mg/L	CV (n=5)	Analito	mg/L	CV (n=5)
C8	0.70	2.89	E8	0.17	6.18
C10	0.33	5.17	E10	0.14	2.86
C12	0.27	2.87	E12	0.13	4.14
C14	0.32	2.61	E14	0.04	5.35
C15	0.10	3.63	E15	0.01	10.59
C16:1	0.55	2.86	E16:1	0.11	7.52
C16	9.01	4.30	E16	0.48	6.43
C17	0.17	6.43	E17	0.04	10.09
C18:2	4.12	3.96	E18:2+18:1	1.21	7.23
C18:3+18:1	2.66	4.07	E18:3	0.51	7.12
C18	1.64	8.11	E18	0.05	5.46
			MG	1.03	44.51
			DG	7.12	4.75
			TG	12.82	7.02

5.2.3. Cuantificación de Lípidos Simples en Mezcal

En análisis previos se determinó que el mezcal no contiene acilglicéridos, lo que permitió recortar el tiempo de análisis, para ello se modificó el programa de temperatura y se eliminó el programa de presión.

La extracción líquido-líquido con hexano del mezcal resultó práctica, fue reproducible a temperatura ambiente y además no se presentaron problemas de emulsión.

Las condiciones establecidas para la extracción, limpieza y concentración de lípidos simples en mezcal se especifican en el *desarrollo experimental*²⁹. La separación cromatográfica de los lípidos simples en mezcal se muestra en la *Figura 5.9*, en éste cromatograma se aprecia la resolución, eficiencia, selectividad y sensibilidad lograda en la separación de los ácidos grasos y ésteres etílicos.

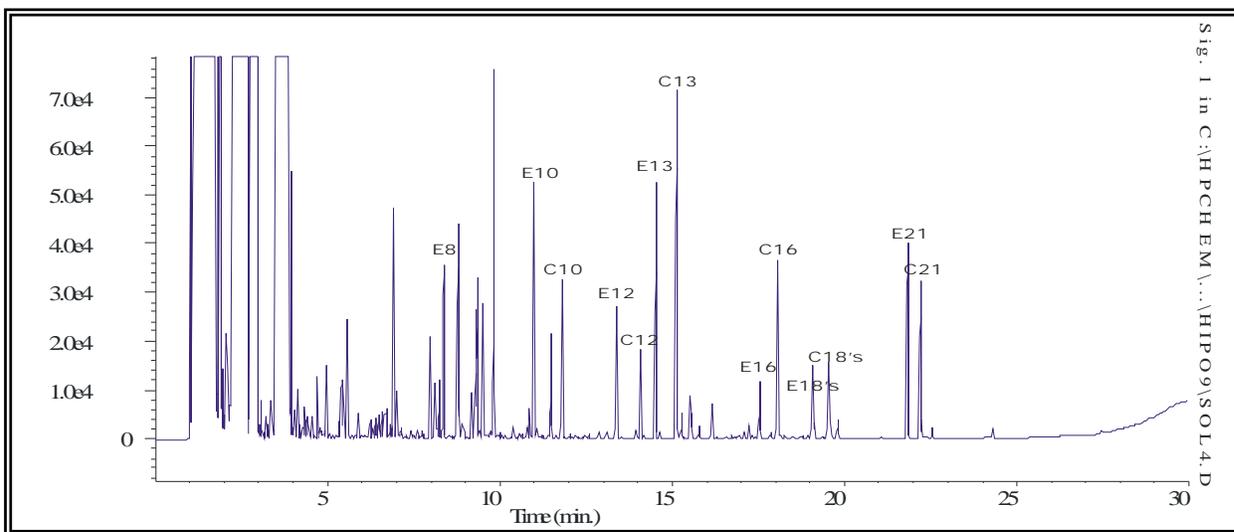


Fig. 5.9 Cromatograma de lípidos simples en Mezcal

5.2.3.1 Cuantificación por Curva de Calibración Relativa

Los coeficientes de correlación para las curvas de calibración fueron mayores a 0.999 como lo muestran las *Figuras 5.10* y *5.11*

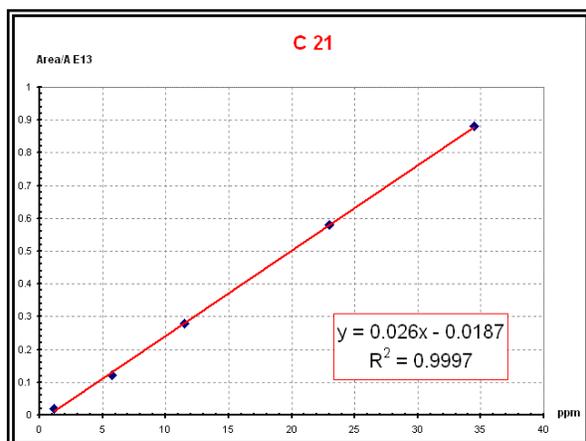


Fig. 5.10 Curva de calibración para ácidos grasos en Mezcal.

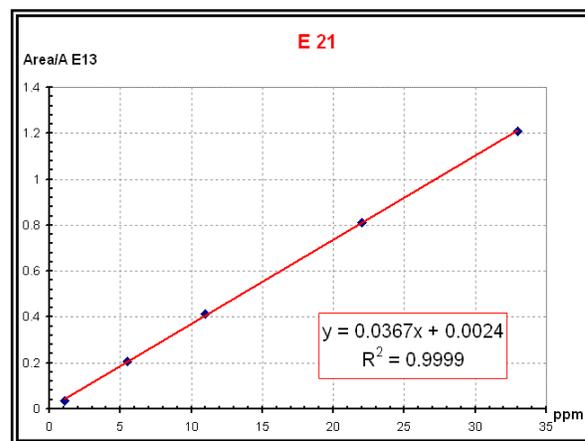


Fig. 5.11 Curva de calibración para ésteres etílicos en Mezcal.

²⁹ Ver página 36, Cuantificación de Lípidos Simples en Mezcal.

Los resultados de la cuantificación se muestran en la *Tabla 5.4*, se obtuvo buena precisión del método de acuerdo a los coeficientes de variación determinados, todos los analitos mostraron un CV menor al 10 % por lo que se consideran aceptables.

Tabla 5.4 Concentración de lípidos simples determinada en mezcal por curva de calibración relativa

Analito	mg/L	CV (n=5)	Analito	mg/L	CV (n=5)
C8	2.79	1.61	E8	3.48	2.00
C10	3.65	0.83	E10	6.33	0.70
C12	2.25	0.78	E12	3.80	0.61
C14	1.07	2.66	E14	0.92	1.44
C15	0.33	5.56	E15	0.10	6.60
C16:1	0.34	2.25	E16:1	0.17	3.29
C16	4.98	2.70	E16	2.37	2.04
C17	0.24	3.05	E17	0.28	4.94
C18:2	2.29	4.53	E18:2+18:1	3.11	1.74
C18:3+18:1	0.97	6.89	E18:3	0.88	2.20
C18	0.67	10.53	E18	0.06	8.67

5.2.3.2. Determinación de Factor de Respuesta

Los factores de respuesta calculados a partir de la *disolución estándar de lípidos* preparada como se indica en el *desarrollo experimental*³⁰ se muestran en la *Tabla 5.5*, todos los coeficientes de variación demostraron ser menores que 10 %, por lo que se consideran aceptables.

Tabla 5.5 Factores de respuesta de lípidos simples analizados

Analito	Fr	CV(n=5)	Analito	Fr	CV(n=5)
C8	0.0306	1.19	E8	0.0295	0.42
C10	0.0290	1.12	E10	0.0305	0.42
C12	0.0304	1.35	E12	0.0327	0.40
C14	0.0348	3.27	E14	0.0356	0.58
C15	0.0337	2.92	E15	0.0353	2.53
C16:1	0.0365	4.33	E16:1	0.0358	0.10
C16	0.0287	1.08	E16	0.0349	0.63
C17	0.0288	0.41	E17	0.0397	1.35
C18:2	0.0255	4.95	E18:2+18:1	0.0309	0.81
C18:3+18:1	0.0224	1.33	E18:3	0.0355	1.36
C18	0.0555	1.71	E18	0.0450	1.98

³⁰ Página 37

5.2.3.3. Cuantificación por Factor de Respuesta considerando el %R

Los resultados de la determinación del recobro en hexano de los lípidos simples analizados en mezcal de acuerdo al procedimiento descrito en el *Desarrollo Experimental*³¹ se ordenan en la *Tabla 5.6*

Tabla 5.6 Recobro en hexano de lípidos simples analizados en mezcal

Analito	%R	CV (n=3)	Analito	%R	CV (n=3)
C8	13.19	4.25	E8	77.85	1.22
C10	41.13	0.53	E10	78.21	1.55
C12	64.56	0.36	E12	78.38	1.69
C14	74.51	0.21	E14	78.03	1.90
C15	75.56	2.33	E15	78.48	1.95
C16:1	74.44	5.23	E16:1	89.25	14.91
C16	76.73	1.50	E16	78.93	1.40
C17	75.93	1.51	E17	85.84	3.58
C18:2	72.94	14.62	E18:2+18:1	79.39	0.52
C18:3+18:1	75.79	8.50	E18:3	79.00	2.78
C18	86.95	14.56	E18	82.80	2.25

Para mezcal decidimos plantear una alternativa de cuantificación con el fin de proponer un método de cuantificación práctico, no sólo por la simplicidad del método, sino también por la consideración del tiempo de análisis, precisión, exactitud y economía de los insumos.

El desarrollo de éste método pretende que a través de una sola *disolución estándar de lípidos* puedan determinarse las concentraciones de todos los analitos en cuestión sin el uso de las curvas de calibración en las que se necesitan 5 disoluciones para los puntos de calibración, lo que implica no solo el tiempo de preparación de la muestra y gasto de reactivos, sino además el tiempo de operación del cromatógrafo y el gasto de los insumos.

Además, en la cuantificación de lípidos simples por curva de calibración relativa, el uso de un solo estándar para una serie homóloga³² se justifica precisamente por la naturaleza química similar de la serie homóloga, considerando que los analitos tienen el mismo comportamiento (Fr y %R) que el estándar que sirve de base para la construcción de la curva de calibración. Sin embargo, la longitud de la cadena hidrocarbonada de cada analito tiene repercusión en la solubilidad del analito y por tanto en el reparto en la extracción líquido-líquido.

³¹ Página 38.

³² Serie homóloga: se refiere a un conjunto de compuestos de igual grupo funcional que solo varían entre sí por la longitud de la cadena hidrocarbonada, más específicamente cada uno tiene un grupo CH₂ más que su anterior.

De acuerdo a la *Tabla 5.5*³³, los factores de respuesta no son muy distintos entre sí, lo que hace válida la decisión de cuantificar los analitos a través del factor de respuesta de un solo estándar para la serie homologa.

Sin embargo, los resultados del %R presentados en la *Tabla 5.6*, manifiestan que los ácidos grasos de 8, 10 y 12 carbonos distan mucho del recobro promedio de los ácidos grasos estudiados: C8 tiene un %R de 13 % mientras que C10 y C12 se recuperan en un 41 y 64 % respectivamente. El resto de los ácidos grasos (C14 – C18), presentan un recobro promedio del 76.6 % con un CV de 5.6 % entre ellos.

Con respecto a los ésteres etílicos, la correlación en el recobro es mayor, pues el promedio de la serie (E8 – E18) es 80.5 % con un CV de 4.7 % entre ellos.

Los resultados de la cuantificación por factor de respuesta considerando el recobro se muestran en la *Tabla 5.7*. Los coeficientes de variación son menores al 10 % en la mayoría de los casos.

Tabla 5.7 Concentración de lípidos simples determinada en mezcal por Fr considerando el %R

Analito	mg/L	CV (n=3)	Analito	mg/L	CV (n=3)
C8	15.24	2.47	E8	4.75	4.66
C10	7.34	2.93	E10	7.88	4.17
C12	2.60	3.83	E12	4.55	3.80
C14	0.83	5.48	E14	0.94	1.48
C15	0.17	8.22	E15	0.09	4.60
C16:1	0.21	18.54	E16:1	0.15	4.87
C16	5.04	3.78	E16	2.43	4.28
C17	0.09	3.23	E17	0.12	12.56
C18:2	2.65	2.20	E18:2+18:1	3.48	4.03
C18:3+18:1	1.05	2.61	E18:3	0.83	4.19
C18	0.29	2.61	E18	0.03	25.35

5.2.3.4. Cuantificación por Curva de Calibración Relativa considerando el %R

De acuerdo con los resultados y discusiones del recobro, podemos asegurar que en el caso de la curva de calibración relativa, el reparto particular de los analitos está siendo generalizado como igual al del estándar. Ésta aseveración no tendría mayor relevancia si, como en el caso de los ésteres etílicos, el recobro de los analitos y del estándar resulta similar, sin embargo en el caso de los ácidos grasos, la tendencia no es similar en toda la serie, siendo los casos especiales: C8, C10 y C12, en consecuencia se hace discriminación para estos analitos en éste método.

³³ Página 46

La *Tabla 5.8* presenta una comparación entre las concentraciones obtenidas por la curva de calibración relativa y las concentraciones obtenidas por los Fr considerando el %R, al analizar esta tabla resulta evidente que las variaciones significativas en las concentraciones determinadas corresponden a los analitos con recuperaciones significativamente diferentes al resto de la serie (C8 y C10).

Tabla 5.8 Comparación de la concentración de lípidos simples en mezcal determinadas por curva de calibración relativa y por factor de respuesta

Analito	Curva de Calibración	Factor de Respuesta	Fr - CCR
	Relativa (CCR)	(Fr)	
	Sin considerar el %R	Considerando el %R	
	mg/L	mg/L	mg/L
E8	3.48	4.75	1.27
C8	2.79	15.24	12.45
E10	6.33	7.88	1.55
C10	3.65	7.34	3.69
E12	3.80	4.55	0.74
C12	2.25	2.60	0.35
E14	0.92	0.94	0.02
C14	1.07	0.83	0.24
E15	0.10	0.09	0.01
C15	0.33	0.17	0.16
E16:1	0.17	0.15	0.02
E16	2.37	2.43	0.06
C16:1	0.34	0.21	0.13
C16	4.98	5.04	0.06
E17	0.28	0.12	0.16
C17	0.24	0.09	0.14
E18:2+18:1	3.11	3.48	0.36
E18:3	0.88	0.83	0.05
E18	0.06	0.03	0.02
C18:2	2.29	2.65	0.36
C18:3+18:1	0.97	1.05	0.08
C18	0.67	0.29	0.37

Lo anterior es concluyente de que la determinación de los analitos por curva de calibración relativa solo es válida si los analitos y el estándar tienen recuperaciones similares.

Mediante estos resultados asumimos que la pretensión de la cuantificación basada en la curva de calibración relativa a un solo estándar sin considerar el recobro es adecuada para todos los ésteres etílicos y los ácidos grasos de cadena mayor que 10 carbonos.

Sin embargo, si se quiere hacer una determinación más exacta para los ácidos de cadena corta, es necesario determinar las recuperaciones de cada analito, lo que conlleva a un trabajo extra que involucra no solo la inversión de tiempo sino de reactivos y estándares.

La *Tabla 5.9* muestra los resultados de la cuantificación por curva de calibración relativa considerando las recuperaciones de los analitos en hexano, para tal efecto se empleó la metodología descrita en *Cuantificación de Lípidos Simples en Mezcal.- Curva de Calibración Relativa*³⁴, con la única diferencia que el estándar stock se adiciona posterior al punto 2 (ELL) de tal manera que no sea sometido a reparto, ya que al hacer los cálculos de cuantificación, se considera el %R de cada analito en la fase hexano por lo que no es necesario que el estándar acompañe a los analitos en el reparto. En estos resultados se observa que en el 82 % de las determinaciones se obtuvieron CV menores que 10 %, sólo una (E18) presenta una variación muy alta que se podría atribuir a la baja concentración en la que se encuentra.

Tabla 5.9 Concentración determinada para mezcal por curva de calibración relativa considerando el recobro.

Analito	mg/L	CV (n=5)	Analito	mg/L	CV (n=5)
C8	19.34	1.85	E8	3.71	3.94
C10	8.38	1.95	E10	6.48	1.76
C12	3.27	1.94	E12	3.63	2.92
C14	1.32	1.58	E14	0.69	6.36
C15	0.41	7.64	E15	0.05	17.63
C16:1	0.43	3.13	E16:1	0.10	10.06
C16	5.55	3.68	E16	1.62	7.97
C17	0.29	6.78	E17	0.07	23.58
C18:2	2.70	6.89	E18:2+18:1	2.10	8.09
C18:3+18:1	1.17	7.08	E18:3	0.57	6.78
C18	0.72	11.42	E18	0.01	52.32

La comparación de estos resultados (Tabla 5.9) con los obtenidos por factor de respuesta (Tabla 5.7) se presenta en la Tabla 5.10, en ella se observa que la variación en las determinaciones es menos significativa que en los resultados donde no se corregía por el recobro (Tabla 5.8).

Tabla 5.10 Comparación de la cuantificación de lípidos simples en mezcal por curva de calibración considerando el recobro y por factor de respuesta considerando el recobro.

Analito	CURVA DE CALIBRACION	FACTOR DE RESPUESTA	VARIACION
	Considerando el %R	Considerando el %R	
	mg/L	mg/L	mg/L
E8	3.71	4.75	1.04
C8	19.34	15.24	4.10
E10	6.48	7.88	1.40
C10	8.38	7.34	1.04
E12	3.63	4.55	0.92
C12	3.27	2.60	0.67
E14	0.69	0.94	0.25
C14	1.32	0.83	0.49
E15	0.05	0.09	0.04
C15	0.41	0.17	0.25
E16:1	0.10	0.15	0.06
E16	1.62	2.43	0.81
C16:1	0.43	0.21	0.22
C16	5.55	5.04	0.51
E17	0.07	0.12	0.05
C17	0.29	0.09	0.20
E18:2+18:1	2.10	3.48	1.38
E18:3	0.57	0.83	0.27
E18	0.01	0.03	0.02
C18:2	2.70	2.65	0.05
C18:3+18:1	1.17	1.05	0.12
C18	0.72	0.29	0.43

Ahora bien, hasta aquí hemos realizado 3 cuantificaciones para los lípidos simples en mezcal:

- Curva de Calibración Relativa
- Factor de Respuesta considerando el %R
- Curva de Calibración Relativa considerando el %R

Y hasta podríamos proponer la cuantificación por Factor de Respuesta sin considerar el recobro, se hace necesario entonces discutir sobre la aplicación de una metodología en particular. Consideramos que la cuantificación por Fr considerando el %R arroja los resultados más exactos

y por tanto confiables pues en esta metodología no se hace ninguna suposición sobre el comportamiento similar al del analito con el estándar puesto que el estándar es el mismo que el analito. Sin embargo, la aplicación de esta metodología hace necesaria la preparación de una *disolución estándar de lípidos* que contenga concentraciones semejantes a las que contiene el mezcal objeto de estudio. Además presupone la determinación del %R de los analitos en la fase orgánica, aun cuando la fase orgánica siempre fuera hexano, no se pueden emplear siempre los mismos %R puesto que el mezcal constituye la fase acuosa de la ELL y los mezcales varían en su grado alcohólico (36 – 55 °GL.) esto, en consecuencia, puede afectar la relación de reparto entre las fases.

Si los mezcales contuvieran un perfil de concentraciones de lípidos simples semejantes³⁵, bastaría con determinar los %R para cada graduación alcohólica y entonces la metodología resultaría práctica para su aplicación.

Sin embargo, no debemos soslayar la cuantificación obtenida por la curva de calibración relativa, al momento, esta metodología solo demuestra variaciones significativas para los analitos C8 y C10, cuya recuperación es inferior al resto de la serie determinada, en todo caso diríamos que esta metodología es robusta para el 91.6% de los analitos analizados si tenemos en cuenta que el panel es de 24 analitos cuantificados en mezcal y solo 2 mostraron variaciones significativas en las concentraciones determinadas por las metodologías aplicadas. Una consideración que favorece la aplicación de esta metodología resulta de la conveniencia de preparar un estándar stock con solo 2 estándares, mientras que la preparación de la *disolución estándar de lípidos* involucra los 24 analitos. Además, el empleo de una cuantificación que considere el recobro de los analitos en la fase orgánica, ya sea por curva de calibración relativa o por factor de respuesta solo es posible para mezcal, ya que si deseamos conocer el %R en agave cocido y mosto muerto debemos disponer de una matriz similar a ellos pero sin los lípidos simples para emplear la retroextracción³⁶, la concepción de tales matrices resulta una limitante considerando la complejidad de su constitución.

³⁵ A priori, suponemos que no debido al proceso artesanal de su producción.

³⁶ Descrita en la página 38.

5.3 Interpretación de la Evolución de Lípidos Simples en el Proceso de Producción del Mezcal

La *Tabla 5.11* presenta la concentración determinada para agave cocido, mosto muerto y mezcal, se comparan sólo los datos obtenidos por el método de la curva de calibración relativa, ya que es el único aplicable a todas las matrices, los resultados así tabulados, no permiten una interpretación práctica de los perfiles obtenidos, para facilitarla mostraremos los resultados en forma gráfica.

Tabla 5.11 Comparación de la concentración de lípidos simples en agave cocido, mosto muerto y mezcal

Analito	Agave Cocido ppm (mg/kg)	Mosto Muerto ppm (mg/L)	Mezcal ppm (mg/L)
E8	0.02	0.17	3.48
C8	0.003	0.70	2.79
E10	0.03	0.14	6.33
C10	0.08	0.33	3.65
E12	0.03	0.13	3.80
C12	0.07	0.27	2.25
E14	0.35	0.04	0.92
C14	0.47	0.32	1.07
E15	0.04	0.01	0.10
C15	0.16	0.10	0.33
E16:1	0.25	0.11	0.17
E16	0.09	0.48	2.37
C16:1	0.02	0.55	0.34
C16	11.01	9.01	4.98
E17	0.25	0.04	0.28
C17	0.17	0.17	0.24
E18:2+18:1	0.17	1.21	3.11
E18:3	0.08	0.51	0.88
E18	0.03	0.05	0.06
C18:2	16.37	4.12	2.29
C18:1+18:3	7.28	2.66	0.97
C18	1.00	1.64	0.67
MG	9.20	1.03	ND
DG	50.36	7.12	ND
TG	91.83	12.82	ND

ND: No detectable

5.3.1 Agave Cocido

Al analizar los resultados obtenidos en la cuantificación de los lípidos simples en el agave cocido es claro que el perfil de los lípidos simples está definido por la concentración de MG, DG y TG, quienes representan el 80% de los lípidos simples presentes en el agave cocido. Como se observa en el *Gráfico 5.1*, los ésteres etílicos sólo representan el 1% y los ácidos grasos el 19%.

Las concentraciones de los MG, DG y TG denotan que la hidrólisis de los acilglicéridos durante la cocción del agave no es completa. La misma hidrólisis explica la proporción alta de los ácidos y baja a su vez de los ésteres.

El *Gráfico 5.2*, muestra que del 100% de ácidos grasos presentes en el agave cocido, el C16, C18:2 y C18:1+18:3 representan en suma el 95% del total.

Estos resultados no resultan sorprendentes, pues en concordancia con la bibliografía, estos lípidos se encuentran ampliamente distribuidos en los vegetales (Fennema, 1993) y son abundantes en los aceites vegetales (deMan, 1990).

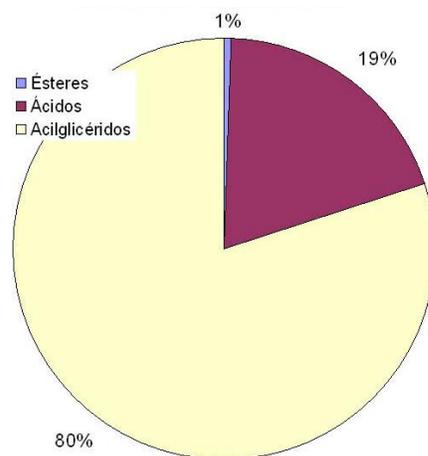


Gráfico 5.1 Distribución de lípidos simples en el Agave Cocido.

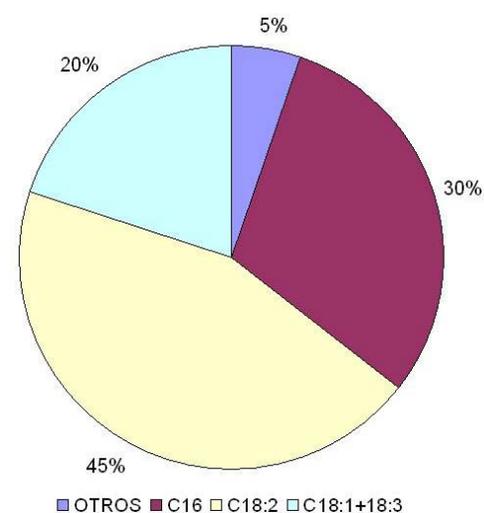


Gráfico 5.2 Distribución de ácidos grasos libres en Agave Cocido.

5.3.2 Mosto Muerto

En el *Gráfico 5.3* se observa que el perfil de lípidos simples en el mosto muerto al igual que en el agave cocido, está impuesto por los acilglicéridos y los ácidos grasos, a pesar de esto, se observa que los acilglicéridos han disminuido considerablemente mientras que los ácidos grasos y ésteres etílicos han incrementado su contribución al total de los lípidos simples presentes.

Para interpretar los datos obtenidos en ésta fase, se hace necesario recordar que en el proceso de fabricación del mezcal, el agave cocido una vez molido, se coloca en tinas de fermentación y se le adiciona agua, a esta nueva mezcla

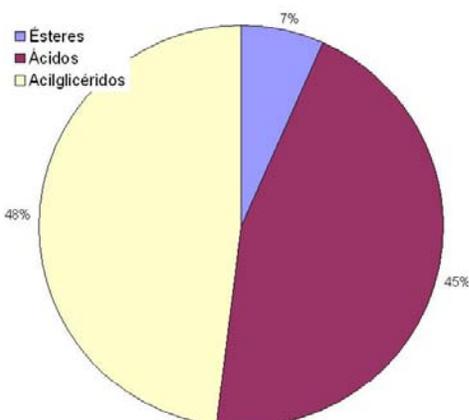


Gráfico 5.3 Distribución de lípidos simples en el Mosto Muerto.

se le denomina mosto, al cual se le permite fermentar hasta que cese la efervescencia de bióxido de carbono, transcurridas 72 horas del cese de la efervescencia se le denomina mosto muerto.

De acuerdo con lo anterior se deduce que en el mosto, y por consecuencia en el mosto muerto, la concentración de los lípidos disminuya con respecto a la determinada en el agave cocido por efecto de dilución.

Sin embargo, en el mosto muerto ocurre lo contrario en el 52% de las determinaciones (Gráfico 5.4), las concentraciones aumentan hacia el final de la fermentación con respecto a las determinadas en el agave cocido, por ejemplo los ácidos grasos y ésteres etílicos de 8 - 12 carbonos aumentan en concentración (Gráfico 5.5), por el contrario, es notorio que los MG, DG y TG disminuyen sustantivamente su concentración (Gráfico 5.6).

Estas observaciones sugieren la hidrólisis de los MG, DG y TG durante la fermentación, sin olvidarnos que algunos autores afirman que los lípidos simples presentes en las bebidas alcohólicas son liberados por las levaduras durante la fermentación (Pollock, 1981; Berry, 1984; Vallejo, 1999). En todo caso se debe interpretar que la presencia de los lípidos simples se debe a una contribución de ambos: agave –

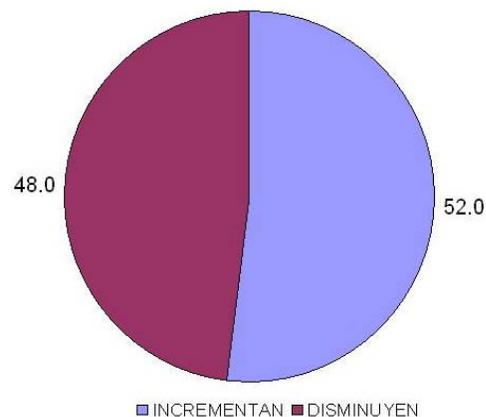


Gráfico 5.4 Evolución de las concentraciones de lípidos simples Agave Cocido – Mosto Muerto, % de analitos.

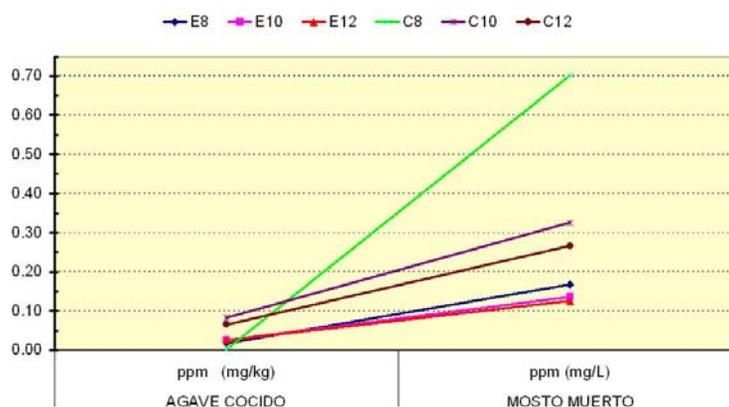


Gráfico 5.5 Evolución de ácidos grasos y ésteres etílicos de cadena mediana, Agave Cocido – Mosto Muerto,

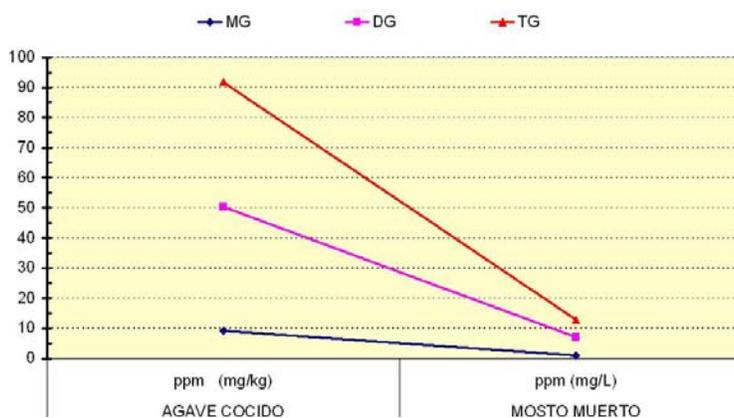


Gráfico 5.6 Evolución de MG, DG y TG, Agave Cocido – Mosto Muerto.

Levadura; la contribución de las levaduras resulta inequívocamente en un aumento de la concentración pues estas se generan durante el proceso fermentativo.

Por otra parte, en el caso de los ácidos de 18 carbonos es notorio que durante la fermentación estos disminuyen (Gráfico 5.7) y sus correspondientes ésteres aumentan (Gráfico 5.8). Podríamos suponer que la disminución es debida al efecto de dilución antes planteado, pero esto no explicaría el aumento de sus correspondientes ésteres, sin considerar el aporte hecho por las levaduras, podríamos sugerir que durante la fermentación, al irse generando etanol, se favorece la esterificación (etilación) de los ácidos.

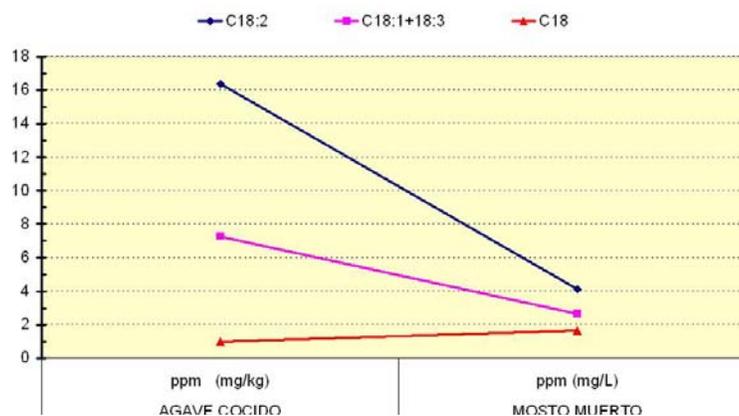


Gráfico 5.7 Evolución de ácidos grasos de 18 carbonos en el proceso Agave Cocido – Mosto Muerto.

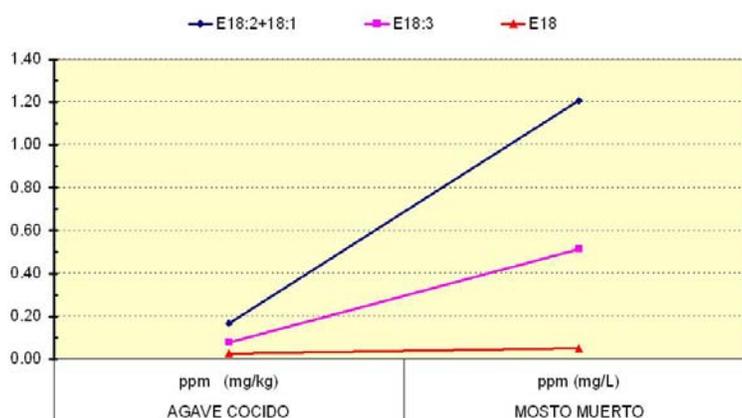


Gráfico 5.8 Evolución de ésteres etílicos de 18 carbonos en el proceso Agave Cocido – Mosto Muerto.

Esta explicación no debe entenderse como particular de los ejemplos planteados, en todo caso podríamos generalizar: *la evolución de las concentraciones particulares de los lípidos simples en el proceso de producción del mosto muerto son resultado de las reacciones de hidrólisis, aportaciones de las levaduras y esterificación.*

5.3.3 Mezcal

En el análisis de resultados, lo primero que se observa es la ausencia de acilglicéridos en el mezcal (*Gráfico 5.9*), lo cual contrasta con la presencia abundante de estos en el agave cocido y en el mosto muerto, además, la evolución de los ésteres etílicos desde el 1% hasta representar el 52% de los lípidos simples presentes en el mezcal.

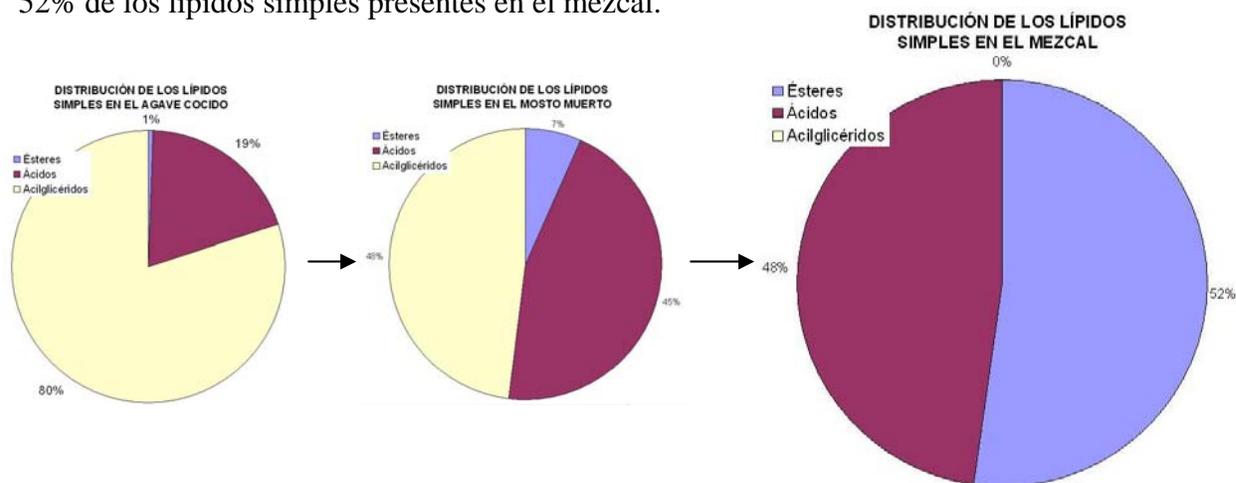


Gráfico 5.9 Evolución de la distribución de lípidos simples en el proceso Agave Cocido – Mosto Muerto – Mezcal.

Respecto a la evolución de los ácidos grasos libres y los ésteres etílicos en mezcal, resulta ilustrativo visualizar los perfiles por separado aunque el comportamiento y por ende la discusión sea la misma. Los *Gráficos 5.10* y *5.11* simulan un reloj, los ácidos grasos y ésteres etílicos están ordenados a partir del compuesto de 8 carbonos situado a las 12:00 en el reloj y hacia el giro de las manecillas del reloj conforme su cadena hidrocarbonada aumenta.

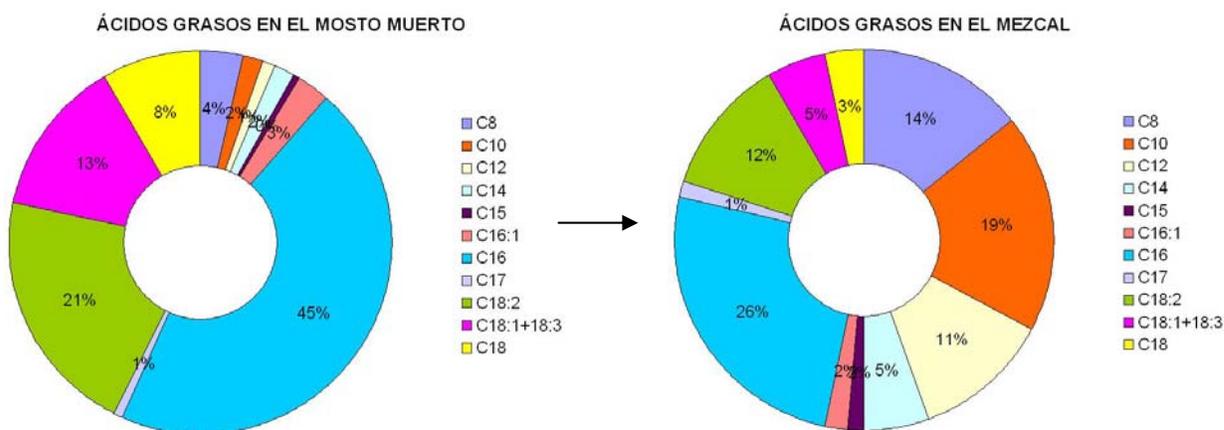


Gráfico 5.10 Evolución de ácidos grasos en el proceso Mosto Muerto – Mezcal.

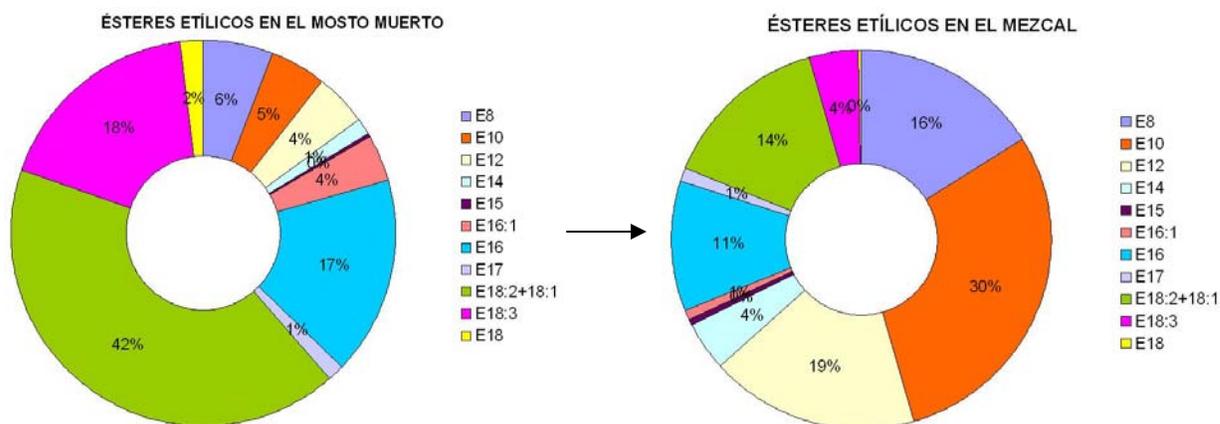


Gráfico 5.11 Evolución de ésteres etílicos en el proceso mosto muerto – mezcal.

De ésta manera, es fácil notar que los de cadena hidrocarbonada mediana (8 – 15) aumentan su porcentaje considerablemente al pasar del mosto muerto al mezcal y los de cadena larga (>15 C) disminuyen.

El cambio de perfil de lípidos simples por consecuencia de la destilación, se observa en el Gráfico 5.12, en el mosto muerto el perfil de ácidos grasos y ésteres etílicos está principalmente descrito por los ácidos grasos de cadena hidrocarbonada mayor: C16, C18, C18:1, C18:2 y C18:3 y, en el mezcal los descriptores incluyen además los ésteres etílicos y ácidos grasos de cadena hidrocarbonada mediana: E8, E10, E12, C8, C10, C12 y algunos ésteres etílicos de cadena hidrocarbonada mayor: E16, E18:2, E18:1, E18:3, siendo los mas abundantes: E10 y C16.

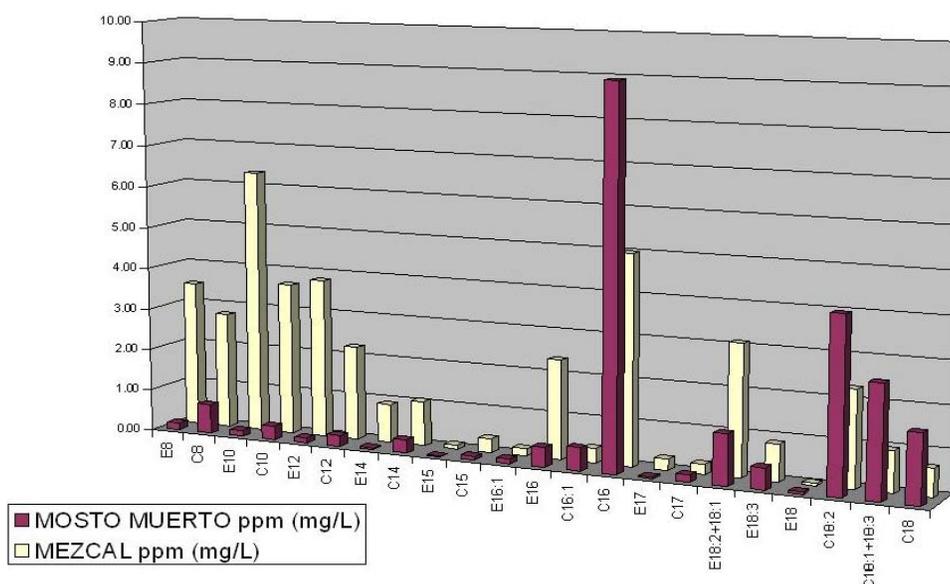


Gráfico 5.12 Comparativa de concentraciones: mosto muerto – mezcal.

Un acercamiento a la explicación del porqué los perfiles de ácidos grasos y ésteres etílicos de ácidos grasos se modifican con la destilación nos lo proporciona Robert Léauté en su exposición titulada “*Destilación en Alambique*” (1989 en la 40ª Reunión Anual de la Sociedad Americana para la Enología y la Viticultura), expresa que el comportamiento de los compuestos químicos al destilarse puede explicarse siguiendo tres criterios:

- Su punto de ebullición,
- su relación con etanol o agua, y,
- la variación del contenido de alcohol en el vapor durante la destilación.

Con respecto a las relaciones con etanol o agua, hay varias posibilidades:

- El componente es totalmente o parcialmente soluble en alcohol y puede destilarse cuando el vapor es rico en etanol.
- El componente es soluble en agua y puede destilarse cuando el vapor es bajo en etanol.
- El componente es soluble en etanol y agua y puede destilarse durante toda la destilación.
- El componente no es soluble en agua, pero el vapor de agua puede acarrear éste componente (hidrodestilación).

Tomando en cuenta estos criterios podríamos sugerir primeramente que los compuestos de menor punto de ebullición tienden concentrarse en el destilado, este primer razonamiento favorece la presencia de los ésteres etílicos y ácidos grasos de cadena corta, seguido de los de cadena mediana ya que ellos son de menor punto de ebullición que sus congéneres de mayor peso molecular, además tratándose de un éster etílico y un ácido graso con la misma longitud de cadena hidrocarbonada, el éster etílico tiene el menor punto de ebullición, lo cual explicaría el porqué la concentración de los ésteres es mayor que la de los ácidos de la misma longitud de cadena.

Por otra parte, los ésteres tienen mejor solubilidad en etanol, por lo que estos destilarían cuando la fase vapor es rica en este compuesto, o sea en las primeras etapas de destilación, lo cual, aunado a sus puntos de ebullición explica la evidencia de que a pesar de que los ésteres se encuentran en menor concentración en el mosto muerto, en el mezcal alcancen las mayores concentraciones, sobre todo los de menor cadena hidrocarbonada.

Con el mismo enfoque podríamos explicar la evolución de los ácidos grasos de cadena hidrocarbonada larga (los cuales disminuyen) sin embargo su alta concentración en el mosto muerto les permite tener una concentración importante en el mezcal.

6. Conclusiones

La extracción líquido - líquido con hexano nos permitió establecer una metodología sencilla y eficaz para la extracción y limpieza de los lípidos simples para agave cocido, mosto muerto y mezcal.

Por medio de la cromatografía de gases, se estableció una metodología para la determinación simultánea de ésteres etílicos, ácidos grasos y acilglicéridos que de acuerdo a los resultados obtenidos podemos cualificar como precisa ($CV < 10 \%$) y lineal ($R^2 > 0.999$). Otros trabajos de investigación han soportado la identificación de estos compuestos apoyados en la misma técnica analítica, sin embargo, nuestro aporte es la oportunidad de realizar la determinación simultánea de estos compuestos durante un mismo análisis cromatográfico.

Para la cuantificación de los analitos, propusimos la determinación por curva de calibración relativa basada en un estándar externo para toda una serie homóloga, esto con el fin de evitar la construcción de curvas de calibración de cada analito; de nuestros resultados concluimos que:

- De los ácidos grasos considerados como analitos: C8, C10, C12, C14, C15, C16, C16:1, C17, C18, C18:1, C18:2 y C18:3, la cuantificación por curva de calibración relativa sin considerar el recobro, basada en C21 resulta práctica para los analitos homólogos de cadena mayor a 12 carbonos, en el caso del C8 y C10, se debe considerar el recobro, ya que estos analitos evidenciaron una mayor solubilidad en agua que la de sus congéneres.
- De los ésteres etílicos considerados como analitos: E8, E10, E12, E14, E15, E16, E16:1, E17, E18, E18:1, E18:2 y E18:3, la cuantificación por curva de calibración relativa sin considerar el recobro, basada en E21 resulta práctica para todos los analitos considerados. El perfil de lípidos simples en el agave cocido y mosto muerto se caracteriza por su alto contenido de acilglicéridos, además destacan las concentraciones de los ácidos grasos C16, C18:1, C18:2 y C18:3.

En el mezcal, se encontraron ácidos grasos y ésteres etílicos, siendo el decanoato de etilo (6.33 mg/L) y el ácido palmítico (4.98 mg/L) los de mayor concentración, les siguen los ésteres etílicos y ácidos grasos de cadena corta: E8, C8, C10, E12 y C12 y algunos ácidos grasos y ésteres etílicos de cadena larga: E16, E18:2+18:1 y C18:2 que presentan concentraciones que varían entre 2 y 4 mg/L.

Al realizar el estudio comparativo de la evolución de las concentraciones particulares de los lípidos simples en el proceso de producción del mosto muerto se observó que algunos analitos disminuían su concentración, mientras que otros la aumentaban con respecto a las determinadas

para el agave cocido. Esta evidencia sugiere que durante la fermentación ocurren reacciones de hidrólisis y esterificación, además del aporte de las levaduras.

El perfil de lípidos en mezcal, en comparación con el del mosto muerto, es evidencia de que la destilación además de permitir la separación del contenido alcohólico producto de la fermentación, también favorece la concentración y discriminación de algunos compuestos químicos, resultando en un nuevo perfil que le otorga las características fisicoquímicas y organolépticas que identifican al mezcal.

Finalmente debemos hacer énfasis en la importancia que tiene el desarrollo de técnicas analíticas que permitan el conocimiento de la química del mezcal, no sólo por el desarrollo promisorio que la industria del mezcal ha tenido en la última década, sino mas aún, porque es un producto nuestro, ¡un producto mexicano!; aunque se encuentra ya protegido por la denominación de origen, ninguna bebida alcohólica se encuentra libre de las adulteraciones y competencia desleal.

Además, el conocimiento de la química del mezcal contribuirá al mejoramiento de su calidad, permitiéndonos en el transcurso, la comprensión (y en un futuro el control) de los procesos químicos de los cuales deriva.

7. Bibliografía

1. Allier G. A. y González B. O. 1999. Tesis Profesional: Estudio del Cocimiento del Maguey Mezcalero. Instituto Tecnológico de Oaxaca. Oaxaca. México.
2. Antonio Z. C. 1993. Tesis Profesional de Químico Biólogo: Análisis Físico-Químico de Mezcales de Oaxaca. Escuela de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca. Oaxaca, México.
3. Bautista, J.M. y O.I. García. 2000. Contenido de Azúcares en Agaves (*A. tequilana weber*) cultivados en el Estados de Guanajuato. Universidad Autónoma de Guanajuato. Guanajuato, México.
4. Benn M. S. y Peppard L. T. 1996. Characterization of Tequila Flavor by Instrumental and Sensory Analysis. American Chemical Society.
5. Berrry D.R. 1984. Physiology and Microbiology of the Malt Whisky Fermentation. Progress in Industrial Microbiology. Bushell M.E. Ed. Elsevier, Amsterdam.
6. Blomberg L. 2000. Tequila, Mezcal y Pulque. Editorial Diana. México.
7. Cedeño C., M. y J. Álvarez Jacobs. 2003. Production of Tequila from Agave. The Alcohol Textbook. 4a Edición. Murtagh & Associates. USA.
8. Christie W. W. 1987. Lipid Analysis. Second Edition. Pergamon Press. England. ISBN 0080237916. pp 1 – 10.
9. Cruz J.E. 2001. Tesis Profesional de Ingeniero Agrónomo: Fertilización Química y Orgánica del Agave Mezcalero (*Agave angustifolia* Haw) en Oaxaca. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Departamentote Suelos. Saltillo Coahuila. México.
10. Cruz, R. H. 1999. Tesis Profesional: Situación y Perspectivas del Sistema Agroindustrial del Mezcal en el Estado de Oaxaca. Universidad Autónoma de Chapingo. México. pp 9-34.
11. Dahlgren R. M. T., Clifford H.T. y Yeo P.F. 1985. The Family of the Monocotyledons. Structure, Evolution and Taxonomy. Springer-Verlag, Berlín, 520 pp.
12. deMan, John, (1990), Principles of food chemistry, AVIBook, segunda edición, U.S.A.. ISBN 0442224036, pp 36 – 53.
13. Diario Oficial de la Federación. 28 de Noviembre de 1994. Gobierno de México.
14. Fennema, Owen. (1993), Química de los alimentos, Acribia, segunda edición, España. ISBN 8420007331, pp 157 – 158.
15. Gallegos L. G. 2001. Tesis Profesional de Químico Farmacéutico Biólogo: Determinación del Contenido de Alcoholes Superiores en Mezcales de Palenque del Estado de Oaxaca y Aspectos Toxicológicos. Escuela de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca. Oaxaca, México.
16. García Medoza A. J. 2004. Agaváceas, Biodiversidad de Oaxaca. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. México. pp. 159 – 169.
17. Granados S. D. 1993. Los Agaves en México. 1ª Edición. Universidad Autónoma de Chapingo. México.
18. Gentry H.S., 1982. Agaves of Continental North America. The University of Arizona Press, Tucson, Arizona, USA.
19. Hernández R. C. 1997. Tesis Profesional: Innovación Tecnológica al Proceso de Producción de Jarabe Obtenido de *Agave angustifolia* Haw. Instituto Tecnológico de Oaxaca. Oaxaca, México.
20. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/> (consultado el 24/06/2004)
21. ICAPET. 1999. 1er Censo de la Industria del Mezcal. Gobierno del Estado de Oaxaca. Oaxaca, México.

22. Léauté Robert. 1989. Distillation in Alambic. Lecture at the 40th Annual Meeting of the American Society for Enology and Viticulture. Anaheim, California.
23. López J. 2002. Mezcal y la Denominación de Origen. Memorias del III Encuentro Internacional de Biotecnología UPIBI 2002. Santiago de Querétaro, Querétaro México.
24. Madrigal Lugo R., Pineda Estrada R. F. y Rodríguez O. I. 1981. Agave. Capítulo 9. pp 1-13.
25. Mancilla, M. A. 2000. Tesis de Maestría: Estudio de la Reacción de Maillard Durante el Horneado de *A. tequilana* Weber var. azul y Participación de la Inulina. CINVESTAV – Irapuato, Guanajuato, México.
26. Martínez D.C. 2003. Tesis Profesional de Ingeniero Agrónomo. Caracterización del Mezcal Producido en el Distrito de Tlacolula, Mediante la Evaluación de Parámetros Físicoquímicos. Instituto Tecnológico Agropecuario de Oaxaca #23. Oaxaca. México.
27. Martínez, C. J. y M. J. Estrada. 2001. La Microbiología del Mezcal. Memorias del I Foro de la agroindustria del Mezcal. Oaxaca. México.
28. Medina, A. 2004. Tesis Profesional de Químico en Alimentos: Determinación de Terpenos en Agave tequilana Weber var. azul, Agave angustifolia, agave salmiana y en sus respectivas bebidas alcohólicas. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F.
29. Norma Oficial Mexicana, NOM-070-SCFI-1994, Bebidas alcohólicas.- Mezcal Especificaciones.
30. Pedro O. M. 2002. Tesis Profesional de Químico Farmacéutico Biólogo: Determinación de Metanol en Mezcales de Palenque del Estado de Oaxaca y Aspectos Toxicológicos. Escuela de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca. Oaxaca, México.
31. Peña Alvarez A. *et al* 2004. Characterization of Three Agave Species by Gas Chromatography and Solid-Phase Microextraction-Gas Chromatography-Mass Spectrometry. Journal of Chromatography A, 1027. pp. 131-136.
32. Pollock P. 1981. Brewing Science; Food Science and Technology. Academic Press Vol. 2. 93-157. London. U.K.
33. Quiroz, M. J. 2000. 1ª Edición. Lo que Quería Saber del Mezcal y Temía Preguntar. Oaxaca, México.
34. Sánchez A. 1985. Plan de Desarrollo de la Agroindustria Mezcalera en el Estado de Oaxaca. Instituto Tecnológico de Oaxaca. Oaxaca. México. pp. 97-123.
35. Sánchez L. A. 1989. 1ª Edición. Oaxaca, Tierra de Maguey y Mezcal. Instituto Tecnológico de Oaxaca. Oaxaca. México. pp 1-30, 151-200.
36. Sánchez Marroquín, A. y P.H. Hope. 1953. Juice of Agave: Fermentation and Chemical Composition Studies of some Species from Agave. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1:3, 246-249.
37. Terán S. U. 2003. Tesis Profesional de Químico Farmacéutico Biólogo: Formación de Etanol, Metanol y Alcoholes Superiores durante la Fermentación de Mostos de *Agave angustifolia* Haw y *Agave potatorum* Zucc en la Producción del Mezcal. Escuela de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca. Oaxaca, México.
38. Valenzuela Z. A. y Sánchez L. A. 1985. Revisión Taxonómica del Género *Agave* en el Estado de Oaxaca. En: Plan de Desarrollo de la Agroindustria del Agave en el Estado de Oaxaca. Cap. 2 y 4. ITO-Conacyt. Oaxaca, México.
39. Vallejo C. B. et al. 2004. Tequila Volatile Characterization and Ethyl Ester Determination by Solid Phase Microextraction Gas Chromatography/Mass Spectrometry Analysis. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52 (18) 5567 – 5571.
40. Vallejo C. y Gonzalez C. 1999. Identificación de los Compuestos Volátiles del Tequila. Bebidas Mexicanas. 8 (4): 1 – 17.

41. Walker, G. M. 2000. Yeast. Physiology and Biotechnology. John Wiley & Sons. New York, USA. pp 51-91.
42. Yoldi et al. 2000. El Agave Tequilero, Pencas que Abrazan el Mundo. En Claridades Agropecuarias; Talleres Gráficos de México. México. pp 4-15.