



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**ANÁLISIS DE COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES Y SEMIVOLÁTILES EN
BEBIDAS ALCOHÓLICAS POR EXTRACCIÓN CON BARRA MAGNÉTICA (STIR BAR
SORTIVE EXTRACTION) SEGUIDA DE CROMATOGRAFÍA DE GASES-
ESPECTROMETRÍA DE MASAS (CG-EM)**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

STEFANIA ELIZALDE ORTIZ

MÉXICO, D.F.

2012





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE	Profesor: EUGENIO OCTAVIO REYES SALAS
VOCAL	Profesor: ARACELI PATRICIA PEÑA ALVAREZ
SECRETARIO	Profesor: PATRICIA SEVERIANO PEREZ
1er. SUPLENTE	Profesor: SILVIA CITLALLI GAMA GONZALEZ
2° SUPLENTE	Profesor: CARLOS IVAN MENDEZ GALLARDO

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 101, DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA, DEPG, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

DRA. ARACELI PATRICIA PEÑA ÁLVAREZ

SUSTENTANTE

STEFANIA ELIZALDE ORTIZ

DEDICATORIA:

A DIOS POR ACOMPAÑARME TODOS LOS DÍAS

A MIS PADRES, PORQUE CREYERON EN MI Y PORQUE ME SACARON ADELANTE, DÁNDOME EJEMPLOS DIGNOS DE SUPERACIÓN Y ENTREGA, PORQUE EN GRAN PARTE GRACIAS A USTEDES, HOY PUEDO VER ALCANZADA MI META, YA QUE SIEMPRE ESTUVIERON IMPULSÁNDOME EN LOS MOMENTOS MÁS DIFÍCILES Y PORQUE EL ORGULLO QUE SIENTEN POR MÍ, FUE LO QUE ME HIZO IR HASTA EL FINAL. VA POR USTEDES, POR LO QUE VALEN, POR QUE ADMIRO SU FORTALEZA Y POR LO QUE HAN HECHO DE MÍ

A MI HERMANA CAROLINA, GRACIAS POR CUIDARME TANTO

A MI HERMANA ÁSTRID, POR DARLE EL TOQUE DIVERTIDO A LA VIDA

A MIS TÍAS Y ABUELAS.

GRACIAS POR HABER FOMENTADO EN MÍ EL DESEO DE SUPERACIÓN Y EL ANHELO DE TRIUNFO EN LA VIDA.

A LA DRA. ARACELI, POR SUS ORIENTACIONES, SUS CONOCIMIENTOS, SU PERSISTENCIA, SU PACIENCIA Y SU ESFUERZO, HAN SIDO FUNDAMENTALES PARA MI FORMACIÓN, GRACIAS POR EL TIEMPO BRINDADO Y LA DEDICACIÓN A ESTE PROYECTO.

A MI FAMILIA DEL LABORATORIO 101 ALEX, SILVIA, EDGAR, FABIÁN Y ROCÍO, POR TODOS LOS MOMENTOS VIVIDOS Y CLARO, SUS CONOCIMIENTOS.

A TODOS LOS AMIGOS Y FAMILIA CHILAPEÑA, PORQUE CON USTEDES VAYA QUE SE APRENDEN MUCHÍSIMAS COSAS.

A LITER, DANY Y LA MADRE (PAM), POR TODO SU APOYO, YA MUCHÍSIMOS AÑOS JUNTAS.

A MI EQUIPO KARY, ALAN, VERO, LAURA, HUGUIUX Y JAZZ POR HACER EL APRENDIZAJE MUY DIVERTIDO.

FANNY GRACIAS POR TODO TU APOYO, PARA TERMINAR ESTE PROYECTO.

A ANAHI, EDSON, FERNANDO, GIBRAN E IVAN V., GRACIAS POR TODOS SUS CONSEJOS Y CHARLAS.

A LOS WICHOLAS, A LOS D&D, A LOS JUMAJI, A MIS AMIGOS DEL GYM CON USTEDES HE REÍDO A CARCAJADAS Y VIVIDO MUCHÍSIMAS COSAS.

A ALE, KARLA, CARLOS Y KARINA, POR SER UN EQUIPO GRANDIOSO EN EL TRABAJO, APOYARME EN ESTE PROYECTO.

A TODOS GRACIAS POR FORMAR PARTE DE MI VIDA.

Contenido

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
OBJETIVOS.....	4
GENERAL.....	4
PARTICULARES.....	4
CAPÍTULO 1.....	5
ANTECEDENTES.....	5
1.1 Cromatografía de Gases (CG).....	5
1.2. Espectrometría de masas	7
1.3. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas	8
1.4. Extracción con barra magnética (SBSE).....	9
1.4.1. Procedimiento de extracción con barra magnética (SBSE)	12
1.4.2. Variables que afectan la SBSE	13
1.4.3. Derivatización	15
1.4.4. Procedimientos usados en SBSE	16
1.4.5. Ventajas y límites de la extracción con barra magnética.....	17
1.5. Características generales de las bebidas alcohólicas.....	18
1.5.1. Clasificación de las bebidas alcohólicas	18
1.5.2. Congenéricos	19

1.6. Mezcal y Tequila.....	21
1.6.1 Mezcal.	21
1.6.2. Proceso de elaboración.....	22
1.6.3. Clasificación de Mezcal.....	23
1.6.4. Tequila.....	23
1.6.5. Proceso de elaboración.....	25
1.6.6. Clasificación de Tequila	25
1.6.7. Categorías de Tequila	26
1.7. Estudios preliminares sobre caracterización de compuestos que identifican el aroma y sabor de Mezcal y Tequila	27
1.7.1. Microbiología del Mezcal y Tequila.....	27
1.7.2. Mecanismos de generación de aromas	28
1.7.3. Biosíntesis	29
1.7.4. Compuestos volátiles en la materia prima y producidos durante la fermentación	30
1.8. Ácidos grasos y el aroma.....	31
1.9. Terpenos.....	32
CAPITULO 2.....	34
DESARROLLO EXPERIMENTAL	34
2.1. Materiales y Equipo.....	34
2.2. Reactivos.....	34

2.3. Muestras	34
2.4. Metodología	35
2.4.1. Identificación de compuestos	35
2.4.2. Cuantificación de Ésteres Etílicos.....	36
2.5. Análisis Cromatográfico.....	36
2.6. Acondicionamiento de barra magnética (SBSE).....	36
2.7. Optimización de los parámetros de SBSE.....	37
CAPITULO 3.....	40
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
3.1. Determinación de las condiciones de trabajo.....	40
3.1.1. Efecto del tiempo de extracción	40
3.1.2. Efecto de la agitación	41
3.1.3. Efecto de la adición de NaCl	42
3.1.4. Efecto de la temperatura.....	43
3.1.5. Efecto del porcentaje de alcohol.....	44
3.2. Metodología propuesta para la extracción de compuestos volátiles y semivolátiles en Mezcal y Tequila	45
3.3. Identificación	46
3.4. Análisis de compuestos en Mezcal.....	58
3.5. Análisis de compuestos en Tequila	61
3.6. Análisis cuantitativo.....	64

CONCLUSIONES	67
BIBLIOGRAFÍA	68
Anexo 1	72

RESUMEN

Se desarrolló y optimizó un método por extracción con barra magnética - Cromatografía de gases- Espectrometría de masas (SBSE-CG-EM) con el objetivo de probar esta técnica de extracción e identificar compuestos volátiles y semivolátiles en diferentes muestras de bebidas alcohólicas. Identificándose un total de 170 compuestos en Mezcal y 150 en Tequilas blancos 100% de Agave, entre los cuales destacan los terpenos y ésteres etílicos como los grupos químicos mayoritarios. El análisis se llevo a cabo con una barra magnética cubierta de polidimetilsiloxano (PDMS), extracción durante 60 minutos, con agitación a 100rpm y temperatura ambiente (25°C) la desorción se realizo con 500µl de diclorometano durante 30 minutos, agitación a 300 rpm y temperatura ambiente (25°C). La identificación se efectuó comparando la base de datos de la biblioteca de espectros de masas del NITS (Nacional Institute of Estándar Technology) y en algunos casos con los cromatogramas de estándares. Se cuantificaron los ésteres etílicos por ser los componentes mayoritarios. Se determino la linealidad, obteniendo coeficientes de correlación > 0.95 , con coeficiente de variación $\% cv < 10$, reflejando una buena precisión. El método desarrollado (SBSE-CG-EM) es eficiente, reproducible, de fácil manejo y el requerimiento de disolventes orgánicos es mínimo o nulo para caracterizar rápidamente los componentes químicos de diferentes muestras.

INTRODUCCIÓN

El Mezcal y Tequila son bebidas regionales mexicanas que cuentan con la protección de denominación de origen, la cual fue obtenida desde 1994, por lo que sólo en algunos Estados de la República Mexicana se puede producir. Las producciones de estas bebidas se han ido industrializando, por lo que las variaciones en el sabor y aroma dependen no solamente de la materia prima, sino del proceso para la obtención de estas. Estas bebidas con el paso de los años han adquirido el reconocimiento nacional, incluso su comercialización ha ido creciendo convirtiéndolos en productos de exportación (Quiroz, 1997), dejando de ser únicamente bebidas de consumo nacional.

El estudio químico de estas bebidas, hasta ahora, sigue siendo muy escaso, y aunado a la relevancia como actividad económica en varios Estados de la república, es importante seguir realizando estudios para la caracterización de las mismas.

Es importante mencionar que hasta ahora se han realizado trabajos en que se han identificado varios componentes de estas bebidas como alcoholes, aldehídos (Guadalupe, 2008), terpenos (Peña Álvarez-A, 2004) y lípidos entre otros, siempre con empleo de diferentes técnicas para identificar la mayor cantidad de compuestos.

En el presente trabajo se establece desarrollar una metodología sencilla y sensible para la identificación de compuestos volátiles y semivolátiles en Mezcal y Tequila utilizando una, técnica relativamente nueva de extracción y pre-concentración; esto es Extracción con Barra magnética (SBSE, por sus siglas en inglés) seguida de cromatografía de gases-espectrometría de masas (SBSE-CG-EM)

La determinación de compuestos orgánicos en diversas matrices (ambientales, alimenticias o biológicas) requiere pasos de separación, pre-concentración, antes de su detección que muchas veces es el talón de Aquiles en el análisis.

Históricamente, el paso de la preparación de muestra es considerado el paso más crítico desde que se adoptó la filosofía de la química verde en los laboratorios analíticos; la preparación de muestra ha tenido que minimizar el uso de disolventes, surgiendo diferentes técnicas de extracción como la microextracción en fase sólida (SPME), extracción en fase sólida (SPE), extracción en gota (SDME), extracción en barra magnética (SBSE) entre otras.

Estas técnicas miniaturizan la preparación de la muestra, reducen o eliminan el uso de disolventes orgánicos, seguido de esto los resultados que arrojan estas técnicas presentan una alta sensibilidad, reducen la cantidad de muestra a utilizar y la cantidad de analito perdido durante el análisis.

Por lo tanto en el presente trabajo se utilizó la técnica de SBSE-CG-EM para determinar los compuestos volátiles en dos tipos de bebidas alcohólicas: Mezcal y Tequila.

OBJETIVOS

GENERAL

Desarrollar un método analítico con empleo de la extracción en barra magnética (Stir Bar Sorptive Extraccion, SBSE) seguida de CG-EM para el análisis de compuestos orgánicos volátiles y semivolátiles en bebidas alcohólicas.

PARTICULARES

- Aplicar la metodología desarrollada para el análisis de compuestos orgánicos volátiles y semivolátiles en diferentes muestras de Mezcal y Tequila.
- Obtener el perfil de compuestos orgánicos volátiles y semivolátiles del Mezcal y Tequila utilizando la metodología desarrollada.
- Cuantificar los compuestos orgánicos volátiles y semivolátiles mayoritarios en muestras de Mezcal y Tequila.

CAPÍTULO 1

ANTECEDENTES

1.1 Cromatografía de Gases (CG)

La cromatografía de gases es un método físico de separación basado en la distribución de la muestra entre dos fases. Una fase es el lecho estacionario de extensa superficie empacada dentro de una columna, esta fase puede ser un sólido o una delgada película líquida que recubre al sólido, la fase móvil consiste en un gas o líquido que se filtra sobre la fase estacionaria y alrededor de la misma. La cromatografía de gases se ve limitada, a la manipulación únicamente de muestras volátiles, de lo contrario no pasarían por la columna; a menudo es necesario eliminar interferencias en la muestra, por medio de un disolvente para eliminar las sales y compuestos de mayor peso molecular, para no obstruir la columna (Nair, 1981).

La CG se lleva a cabo en un cromatógrafo de gases. Éste consta de diversos componentes como el gas portador, el sistema de inyección de la muestra, la columna (dentro de un horno) y el detector.

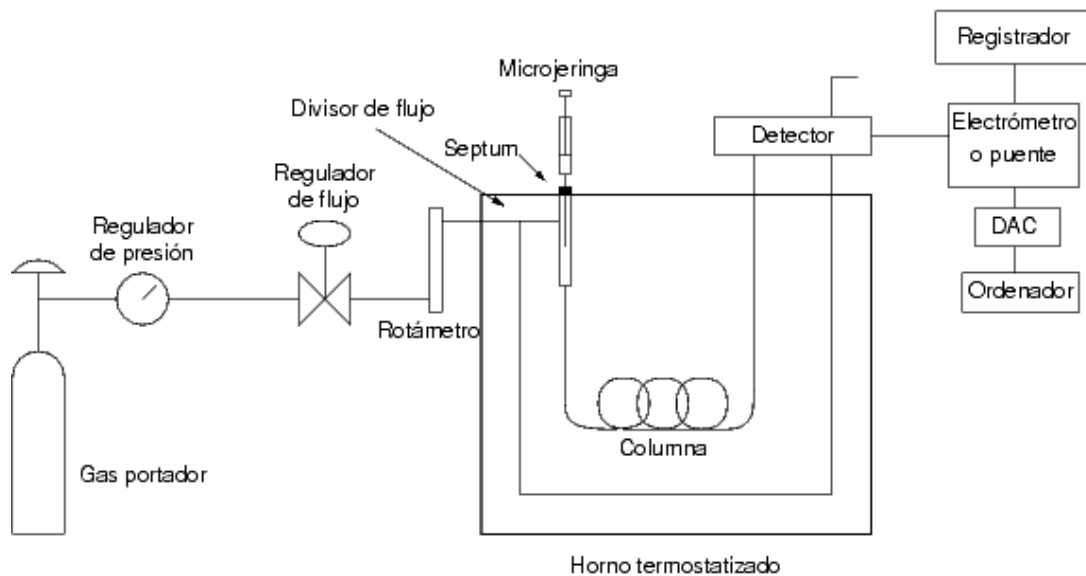


Figura1. Diagrama general de un cromatógrafo de gases (Skoog, 2001)

El uso de un gas portador cumple básicamente dos propósitos: transportar los componentes de la muestra y crear una matriz adecuada para el detector. Un gas portador debe reunir ciertas condiciones:

Debe ser inerte para evitar interacciones (tanto con la muestra como con la fase estacionario), adecuado al detector a utilizar, debe ser capaz de minimizar la difusión gaseosa, ser puro, disponible y económico.

La inyección de la muestra es un apartado crítico, ya que se debe de inyectar una cantidad adecuada y debe introducirse de una forma que sea rápida para evitar el ensanchamiento de las bandas de salida (este efecto se da con cantidades elevadas de analito). El método más utilizado emplea una microjeringa para introducir el analito en una cama de vaporización instantánea. Esta cámara está por encima del punto de ebullición del componente menos volátil y está sellada por una junta de goma o septum.

En la actualidad las columnas más comunes son las capilares debido a su mayor eficiencia y rapidez, la longitud de estas columnas puede variar; debido a esto y a la necesidad de ser colocadas en un horno es necesario enrollarlas en forma helicoidal con diámetros de 10 a 30 cm, dependiendo del tamaño del horno.

La temperatura es una variable importante, ya que de ella dependerá el grado de separación de los analitos, dicha temperatura depende del punto de ebullición de los analitos y por lo general se ajusta a un valor igual o ligeramente superior a él. Si tenemos varios componentes con diferentes puntos de ebullición, se ajusta la llamada rampa de temperatura con lo cual ésta va aumentando ya sea de forma continua o por etapas. En varios casos es necesario ajustar correctamente la rampa puede hacer la diferencia entre separar bien o no los distintos analitos (Skoog, 2001).

En el caso de los detectores esta es la parte del cromatógrafo que se encarga de determinar cuándo ha salido el analito por fin de la columna. Las características ideales de los detectores utilizados son:

- Sensibilidad
- Respuesta lineal del analito
- Tiempo de respuesta corto
- Intervalo de temperatura de trabajo amplio
- Estabilidad y reproducibilidad

1.2. Espectrometría de masas

La espectrometría de masas, es una técnica universal y específica de alta sensibilidad que nos da la capacidad de identificación inequívoca de cualquier tipo de sustancia, nos da información estructural, energías de enlace, cinética y fisicoquímica.

Dentro del espectrómetro de masas se procede a la ionización de la muestra mediante diferentes métodos. El sistema de ionización más frecuente es el de ionización electrónica que bombardea las moléculas con electrones de cierta energía, generalmente 70 eV, capaz de provocar la emisión estimulada de un electrón de las moléculas y así ionizarlas (Gross, 2004).

Además de las moléculas ionizadas, también se forman iones fragmento debido a la descomposición de los iones moleculares con exceso de energía. El tipo de proporción relativa de cada uno de estos fragmentos es característico de cada molécula analizada y las condiciones del proceso de ionización. Una vez ionizadas las moléculas, se aceleran en el cuadrupolo (analizador másico) y se conducen hacia el sistema de detección.

La detección consecutiva de los iones formados a partir de las moléculas de la muestra, suponiendo que se trate de una muestra pura, produce el espectro de masas de la sustancia, que es diferente para cada compuesto químico y que es la identificación de cada compuesto analizado.

El espectro de masas obtenido, se compara con una colección de espectros (generalmente se utiliza la biblioteca del National Institute of Standards and

Technology) se procede a su identificación o averiguar la naturaleza de la molécula que dio origen a esos fragmentos. (Skoog, 2001).

Las principales cualidades de esta técnica son:

- Capacidad de identificación de forma prácticamente inequívoca, ya que proporciona un espectro característico de cada molécula.
- Cuantitativa; permite medir la concentración de las sustancias.
- Gran sensibilidad: habitualmente se detectan concentraciones del orden de ppm o ppb y en casos específicos se puede llegar hasta ppt.
- Proporciona información estructural sobre la molécula analizada.
- Suministra información isotópica
- Es una técnica rápida: se puede realizar un espectro en décimas de segundo, por lo que puede monitorizarse para obtener información en tiempo real sobre la composición de una mezcla de gases.

1.3. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

La cromatografía de gases- espectrometría de masas se ha convertido en una de las herramientas más poderosas para el análisis de mezclas orgánicas y bioquímicas complejas al alcance de los químicos. La ventaja de esta técnica se debe a la forma en la que se complementan ambas técnicas; la Cromatografía de Gases, se basa en la separación de los componentes de una muestra de acuerdo a las interacciones entre la muestra y la fase estacionaria en la columna, la Espectrometría de Masas se emplea para conocer la composición elemental de la muestra, que eluye de la columna (Skoog, 2001).

La técnica analítica acoplada Cromatografía de gases- Espectrometría de masas (CG-EM) es la más ampliamente utilizada para el análisis de muestras complejas.

La cromatografía de gases es una técnica de separación que tiene la cualidad de conseguir la separación de muestras muy complejas. Pero una vez separados, detectados e incluso cuantificados todos los componentes de una muestra

problema, el único dato que disponemos para la identificación de ellos es el tiempo de retención de los correspondientes picos cromatográficos. Este dato no es suficiente para una identificación inequívoca, sobre todo cuando analizamos muestras con un número elevado de componentes (P.T., 1991).

Por otra parte, la espectrometría de masas puede identificar de manera casi inequívoca cualquier sustancia pura pero normalmente no es capaz de identificar los componentes individuales de una mezcla sin separar previamente sus componentes, debido a la extrema complejidad del espectro obtenido por superposición de los espectros particulares de cada componente.

Por lo tanto la asociación de las dos técnicas, CG y EM da lugar a una técnica que permite la separación e identificación de muestras complejas.

1.4. Extracción con barra magnética (SBSE)

La SBSE y la MEFS (microextracción en fase sólida), son técnicas que miniaturizan la preparación de la muestra, reducen ó eliminan el uso de disolventes orgánicos, tienen mayor sensibilidad, reducen la pérdida del analito, la cantidad de muestra para llevar a cabo el análisis y manipulación de la misma.

La SBSE se basa en la extracción de un analito en una matriz por absorción hacia una fase no miscible generalmente una fase de polidimetilsiloxano (PDMS), esta es muy termoestable, lo cual nos permite usarla en un amplio rango de temperaturas (220-320°C), además de que cuenta con propiedades de difusión muy interesantes, estas características hacen que esta fase sea una de las más utilizadas.

La SBSE fue introducida en 1999 por Baltussen et al (Carlo Bicchi E. I., 2009), como la mejora de una nueva técnica de preparación de muestra.

En la SBSE, la barra magnética, también llamado agitador, puede tener un largo de 1 o 2 cm y una cubierta de 0.5 o 1 mm de PDMS; la barra magnética es encapsulada en vidrio sobre cual va la capa de PDMS, ya que el contacto del

polímero con el magneto en condiciones de desorción, cataliza la degradación del polímero (Frank David, 2007).

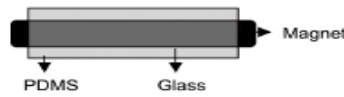


Figura2. Esquema de Stir bar (Carlo Bicchi E. I., 2009)

Principio de la extracción con barra magnética (SBSE)

La eficiencia de la extracción se basa en el coeficiente de partición entre un analito y la fase estacionaria, este se ve afectado por el volumen de la muestra, coeficiente de distribución y la relación entre el volumen de las fases.

Empezando por el paso cinético, esta extracción es considerada como reacción de primer orden la cual podemos describir en la siguiente ecuación (A. Prieto O. Z., 2007).

$$C_{PDMS}(t) = C_{w,0} \times \frac{k_1}{k_2} \times (1 - e^{-k_2 \times \tau})$$

$C_{PDMS}(t)$ es la concentración del analito en función del tiempo en la barra magnética, $C_{w,0}$ es la concentración del analito en la fase acuosa.

Ahora bien para el equilibrio químico se utiliza un balance de materia y el coeficiente de partición.

$$m_{w,0} = m_{PDMS} + m_w$$

Donde $m_{w,0}$ es la masa inicial del analito en la fase acuosa, que es distribuido entre PDMS y el agua.

$$K_{PDMS,w} = \frac{C_{PDMS}}{C_w} = \frac{m_{PDMS}}{m_w} \times \frac{V_w}{V_{PDMS}} = \frac{m_{PDMS}}{m_w} \times \beta$$

El coeficiente de partición $K_{PDMS,w}$ se define como la relación de concentración del analito entre la fase de C_{PDMS} y la fase acuosa C_w . β incluye los volúmenes de cada fase.

Con las ecuaciones anteriores y al hacer arreglos matemáticos; podemos obtener la siguiente ecuación

$$R = \frac{m_{\text{PDMS}}}{m_{w,0}} = \frac{K_{\text{PDMS},w}}{K_{\text{PDMS},w} + \beta}$$

Donde R es el recobro, por lo que podemos hacer cálculos teóricos para las extracciones a realizar.

Como se observa en la Figura 3 el % de recobro con la técnica de SBSE es mayor debido a la cantidad de PDMS que tienen la barra que en la MEFS que es mucho menor, lo cual aumenta la eficiencia de extracción (L. Montero, 2005).

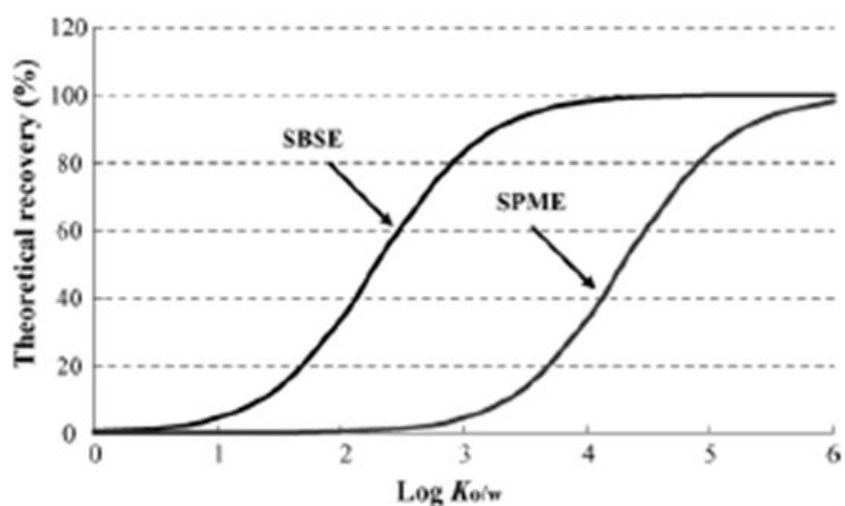


Figura 3. Recobros teóricos para solutos en función del coeficiente de partición octanol-agua K_{ow} para SBSE (10 mL de muestra, 50 μ L de fase) y para MEFS (10 mL de muestra, 0.5 μ L de fase)

1.4.1. Procedimiento de extracción con barra magnética (SBSE)

Extracción

Durante la extracción (Fig. 4) la fase de polímero en la barra (PDMS), es puesta en contacto con los solutos ya sea por inmersión o por espacio de cabeza (Head Space).

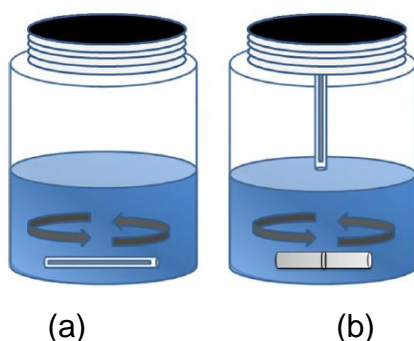


Figura 4. (a) Inmersión, (b) HSSE

En el modo de inmersión, la barra magnética se coloca en un vial, que contiene la muestra líquida, y se pone en agitación bajo condiciones físicas y químicas controladas. Después de la extracción se remueve la barra magnética y se enjuaga con agua destilada para la remoción de sales, azúcares u otros componentes, se seca suavemente con un papel y se procede a la desorción.

El paso de enjuague es extremadamente importante cuando se desorbe térmicamente, para evitar la formación de compuestos no volátiles que puedan dañar la unidad de desorción.

En el modo espacio de cabeza (HSSE) la barra magnética se pone en contacto únicamente con la fase vapor de la muestra sólida o líquida, la cual está generalmente en agitación, para favorecer la presencia de los solutos en la fase vapor. Después de la extracción es recomendable enjuagar la barra magnética con agua destilada y secarla suavemente con un papel, con esta técnica la vida de la barra se incrementa (M. Kawaguchi, 2006).

Desorción

Desorción térmica (TD). Esta forma de desorción implica el no usar disolventes orgánicos para la introducción de compuestos extraídos en el sistema cromatográfico. La desorción térmica es realizada en un intervalo de temperaturas entre 150-350°C; la alta sensibilidad de la TD requiere de una costosa unidad para el cromatógrafo, la unidad de desorción térmica (TDU), la cual consiste en 2 vaporizadores programables (PTVs). El primer PTV tiene la suficiente temperatura para desorber del polímero de la barra de extracción los analitos; el segundo PTV es frío con temperaturas entre -150 a 40°C que crioenfocan los analitos desorbidos, antes de entrar al cromatógrafo de gases.

El crioenfriamiento de los analitos desorbidos con la TD, antes de entrar al cromatógrafo de gases garantiza la cuantitatividad de los analitos transferidos, el uso de este tipo de desorción se ve limitada por la estabilidad de los compuestos volátiles y semivolátiles (Carlo Bicchi E. I., 2009)

Desorción líquida (LD). Durante la desorción líquida la barra de extracción se sumerge y se pone en agitación en un disolvente o mezcla de disolventes compatibles con el polímero, en el caso de PDMS puede ser acetonitrilo, metanol, mezclas de estos disolventes, mezcla de disolventes con agua, buffers, diclorometano, etc. La desorción líquida puede acelerarse con el incremento de temperatura o sonicación (A. Prieto O. Z., 2008).

1.4.2. Variables que afectan la SBSE

Con respecto al paso de extracción, este se ve afectado por el tiempo de extracción, pH, adición de sal o de algún modificador orgánico, temperatura, cantidad de muestra y velocidad de agitación. Algunas de estas variables como el pH y la adición de sal modifican las condiciones de la muestra o analitos, afectan el equilibrio y otro grupo de variables, afectan la cinética de la extracción.

1. El pH en la muestra es una variable importante en la SBSE para los analitos con propiedades ácidas o básicas, el pH se ajusta con el fin de obtener el analito en forma totalmente molecular o parcialmente. De cualquier forma, muy ácido ($\text{pH} < 2$) o muy básico ($\text{pH} > 9$), son condiciones no recomendadas para exponer la barra magnética ya que disminuye la vida de esta.
2. Sales inertes como el cloruro de sodio se emplean para aumentar la fuerza iónica en la muestra; en general se observa que para analitos hidrofóbicos ($\log K_{o,w} > 3.5$) la adición de una sal inerte no mejora la eficiencia de extracción, lo contrario sucede con analitos polares. Hay varias hipótesis sobre el descenso de la eficiencia en la extracción de compuestos no polares, como el efecto aceite, que promueve el movimiento de compuestos no polares a la fase acuosa, minimizando la interacción entre la cubierta de PDMS y los analitos. Otros autores atribuyen el descenso de la eficiencia, a que la adición de la sal da como resultado el aumento en la viscosidad que disminuye la cinética de la extracción de los compuestos.
3. Modificadores orgánicos como el metanol o el acetonitrilo se prueban como aditivos durante la SBSE, para minimizar la adsorción del analito a las paredes de vidrio, de cualquier manera la adición de estos modificadores incrementan la solubilidad de los analitos en la fase acuosa y se ve afectada la extracción minimizándose la eficiencia.
4. Otra variable es la temperatura; a elevadas temperaturas el equilibrio de extracción se alcanza rápidamente pero el coeficiente de partición de los analitos, así como la eficiencia de la extracción, se puede ver reducido.
5. La velocidad de agitación se estudia a menudo ya que aumenta la extracción y por lo tanto aumenta la respuesta en un tiempo de extracción fijo. Velocidades muy altas de agitación pueden provocar daños en la fase de PDMS (VM León, 2003).

1.4.3. Derivatización

La derivatización de compuestos polares y compuestos termolábiles es una de las alternativas implementadas para la extracción con barra magnética (SBSE). Diferentes formas de derivatización pueden emplearse por ejemplo in situ, en barra magnética, la diferencia de estas dos es el punto donde se agrega el derivatizante y la derivatización post-extracción.

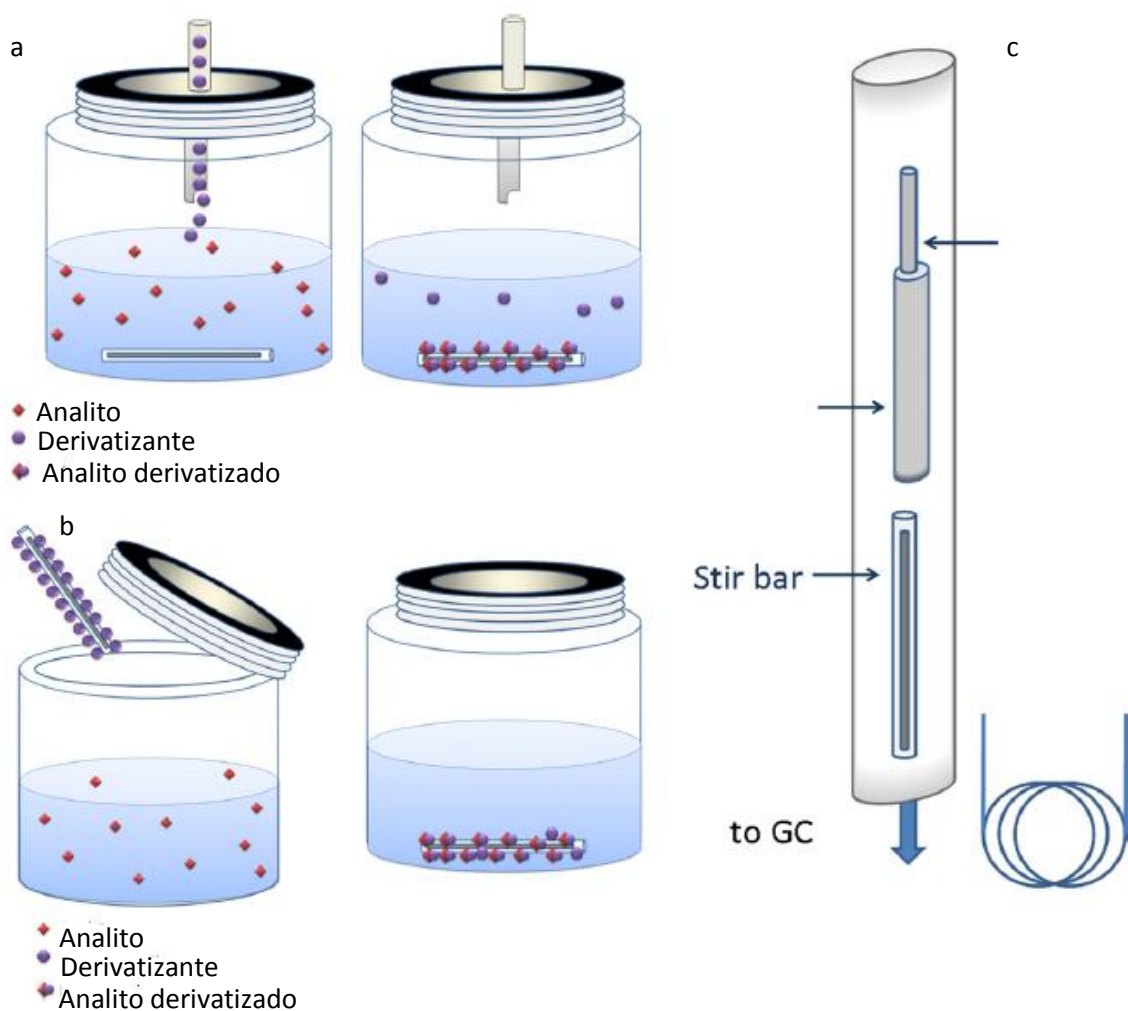


Figura 5. Tipos de derivatización en SBSE a) in situ b) Exponiendo la barra magnética al derivatizante y extrayendo c) en- tubo capilar que contiene derivatizante usado con la unidad de desorción térmica (TDU).

Derivatización “In-Situ” que es la forma más fácil de derivatización, ya que ésta se lleva a cabo en el paso de extracción, o los derivados pueden formarse primero

y luego ser extraídos con PDMS la limitación de esta forma no es aplicable para reacciones que se ven afectadas por la humedad (Figura 5 a).

La derivatización en barra magnética, se puede realizar precargando la barra con el agente derivatizante, por lo que la reacción de derivatización se lleva simultáneamente con la extracción; otra forma es concentrando primero los analitos en la barra de PDMS y exponer la barra magnética al vapor del agente derivatizante (Figura 5 b).

La derivatización post- extracción ya sea en forma de desorción térmica o desorción líquida, en ambos casos un capilar contiene el derivatizante, en el caso de desorción líquida el derivatizante es agregado al disolvente orgánico, en este tipo de derivatización dependerá las propiedades de los analitos para que se lleve a cabo, utilizando la TDU el capilar que contiene el derivatizante se introduce en la TDU para que en el momento que la derivatización sea simultánea a la desorción.

1.4.4. Procedimientos usados en SBSE

De las técnicas utilizadas para SBSE se destacan cuatro

- SBSE con Derivatización IN SITU.
- SBSE con De-conjugación IN SITU, utilizando una enzima.
- SBSE con Desorción Líquida.
- SBSE con Desorción Térmica en Disparo Múltiple, implica la desorción de varias barras magnéticas (con un máximo de 5), lo que incrementa la sensibilidad del análisis.
- SBSE con Desorción Térmica con Derivatización en Tubo.

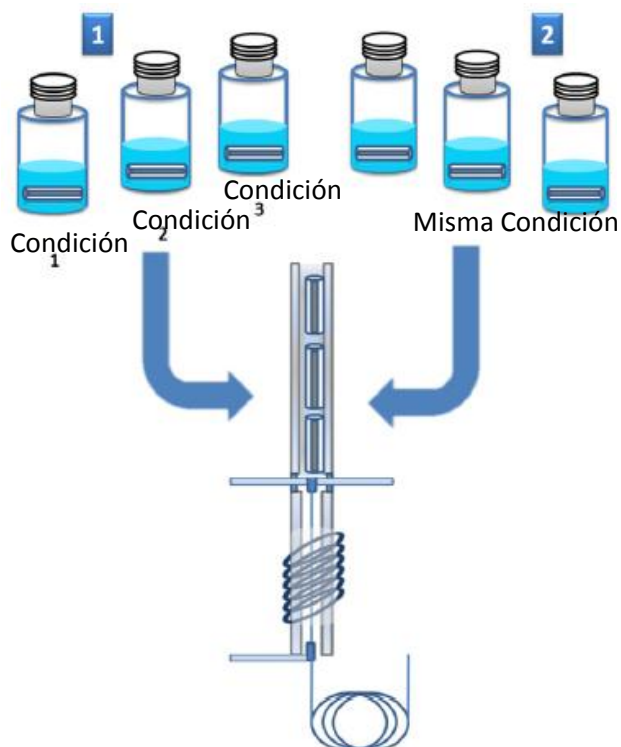


Figura 6. SBSE en modo de multidisparo

1.4.5. Ventajas y límites de la extracción con barra magnética

Es una técnica fácil de aplicar y automatizar, altamente flexible, se ve poco influenciada por condiciones desfavorables en relación con la fase, es una técnica muy reproducible y puede ser utilizada en análisis de analitos con estructura química muy diferente.

Las desventajas son: el alto costo de la instrumentación, como el caso de la TDU, el largo tiempo de extracción, la utilización de disolventes solo compatibles con el polímero de la barra (en este caso PDMS). En el caso de desorción térmica la estabilidad de los analitos debe ser termo-medio-alta y solo se aplica a compuestos de volatilidad media-alta (A. Prieto O. Z., 2008).

1.5. Características generales de las bebidas alcohólicas

Importancia y desarrollo histórico

Las bebidas alcohólicas ocupan el primer lugar en volumen de producción dentro de las empresas biotecnológicas. La principal bebida alcohólica por su volumen de producción a nivel mundial es la cerveza.

La elaboración de las bebidas alcohólicas es tan antigua que no se puede establecer con precisión el origen de esta práctica. Existen evidencias de más de 7000 años de antigüedad, durante milenios el hombre supo fermentar mostos que contenían carbohidratos con técnicas muy depuradas e incluso aprendió a destilar alcohol para aumentar su concentración en bebidas. Todo sin tener idea del papel o la existencia de los microorganismos. Probablemente las primeras bebidas se hicieron a partir de sustratos azucarados como los jugos de frutas, ya que solo se requiere poner en contacto al jugo con la levadura silvestre presente en la propia fruta.

Las civilizaciones han aprendido a fermentar diversos sustratos a fin de producir sus bebidas alcohólicas autóctonas; en general estas bebidas habían logrado el contenido alcohólico logrado exclusivamente por la fermentación. Fue hasta el siglo XV cuando se empezó a popularizar el arte de la destilación, y por lo tanto aparecieron bebidas con mayor contenido alcohólico (Mariano García Garibay, 2004).

1.5.1. Clasificación de las bebidas alcohólicas

Una forma general de clasificación de las bebidas alcohólicas puede ser en función del sustrato del que proceden, si son o no destiladas, o si son simples o compuestas, además de las bebidas destiladas y no destiladas se hace una distinción intermedia: ésta es de las bebidas fortificadas, cuyo grado alcohólico ha sido incrementado mediante una mezcla de una bebida alcohólica no destilada con una destilada o alcohol.

El último criterio de clasificación se refiere a si la bebida consta exclusivamente del producto obtenido mediante la fermentación y, en su caso la destilación (simples), o si además se le adicionaron algunos otros componentes que contribuyan al sabor (compuestas): tal es el caso de las infusiones como el lúpulo de la Cerveza, el enebro o las cascavas de naranja en la Ginebra, hiervas y especias en el Vermouth, etc.

1.5.2. Congenéricos

El denominador común de todas las bebidas alcohólicas es que son productos con un contenido significativo de etanol obtenido mediante la fermentación, donde generalmente predomina un microorganismo productor, la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. El sabor y el aroma de las bebidas alcohólicas está influenciado en gran parte por el alcohol; sin embargo, una gran variedad de compuestos orgánicos presentes en cantidades mucho menores también son responsables de estos atributos y contribuyen en gran medida a las características distintivas entre las diferentes bebidas alcohólicas. Estos compuestos son alcoholes, carbonilos, ácidos orgánicos, ésteres y compuestos azufrados, que en conjunto reciben el nombre de congenéricos (Tabla 1).

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

El origen de los congenéricos se encuentra principalmente en la cepa de la levadura y otros microorganismos presentes durante la fermentación; estos producen algunos de los compuestos y transforman algunos otros presentes en el sustrato. También la materia prima contribuye en la aportación de congenéricos, algunos de los cuales permanecen inalterados durante la fermentación (Mariano García Garibay, 2004).

En general los factores que afectan la formación de congénicos son:

- La cepa de la levadura
- La temperatura de la fermentación
- La concentración de oxígeno en el medio
- La concentración y fuente de nitrógeno
- El tipo y concentración de los azúcares fermentables
- La concentración y tipo de aminoácidos, así como la concentración de algunas vitaminas

Operaciones posteriores a la fermentación, como fermentaciones secundarias, destilación y añejamiento modificarán las concentraciones y proporciones de los congénicos.

Si bien la formación de estos compuestos es en general desagradable, hay algunos que no lo son y su concentración debe ser lo más baja posible. Dos ejemplos de esta situación son el metanol, proveniente de la propia levadura o de la desmetilación de las pectinas, alcohol de muy alta toxicidad, y el diacetilo, el cual confiere a la bebida un sabor desagradable (a mantequilla).

Tabla 1. Principales congénicos presentes normalmente en bebidas alcohólicas

Tipo de compuesto	Compuesto
Alcoholes Pesados (aceite de fusel)	N-propanol
C3	Butanol, iso-butanol, sec-butanol
C4	Amílico, isoamílico, amílico activo
C5	
Otros alcoholes	Glicerol, 2-feniletanol
Carbonilos (aldehídos y cetonas)	Acetaldehído, acetona, 2,3-pentanodiona
Ácidos orgánicos	Fórmico, acético, propiónico Láctico, butírico.
Ésteres	Acetato de etilo, formiato de etilo, acetato de isoamilo, acetato de metilo.

1.6. Mezcal y Tequila

Entre las plantas más conspicuas del paisaje mexicano, en especial de las zonas áridas y semiáridas de México, están los Agaves o magueyes, considerados especies clave en esas regiones, tanto por su abundancia como por la cantidad de recursos que proporcionan a otros organismos.

El presente estudio se llevó a cabo, por tanto, profundizar en el conocimiento de la composición química del Mezcal y Tequila, para así entender cómo se relaciona la percepción de las características sensoriales del producto.

1.6.1 Mezcal.

La palabra “Mezcal” es derivada de las palabras náhuatl Metl (palabra general para Agaves) e ixcalli (palabra que significa cocido al horno), y se refiere no solamente al Mezcal como licor sino al maguey mismo.

En la antigüedad el Mezcal era considerado indispensable en ciertas ceremonias prehispánicas durante las cuales se practicaba el autosacrificio por medio de punción en diversos lugares del cuerpo con las espinas terminales de las hojas. El Mezcal se bebía después de celebradas las ceremonias rituales en honor a sus dioses.

En la actualidad el Mezcal es una bebida popular de México, destilado de la fermentación de tallos cocidos de ciertos magueyes silvestres y cultivados de las regiones áridas y semiáridas en México (Sánchez, 1993).

La norma oficial mexicana NOM-070-SCFI-1999 define al Mezcal como, bebida alcohólica regional obtenida por destilación y rectificación de mostos preparados directa y originalmente con los azúcares extraídos de las cabezas maduras de los Agaves *Angustifolia Haw* (maguey espadín); *Agave Esperrima jacobi*, Amarilidáceas (maguey de cerro, bruto o cenizo); *Agave Patatorum zucc*, Amarilidáceas (maguey de Mezcal); *Agave Salmiana Otto Ex Salm SSP Crassispina* (Trel) *Gentry* (maguey verde o Mezcalero); y otras especies de Agave, siempre y cuando no sean utilizadas como materia prima para otras bebidas con denominaciones de origen dentro del mismo Estado. Previamente hidrolizadas o cocidas, y sometidas a fermentación alcohólica con levaduras, cultivadas o no,

siendo susceptible de ser enriquecido, para el caso del Mezcal tipo II, con hasta en 20% de otros carbohidratos en la preparación de dichos mostos, siempre y cuando no se eliminen los componentes que le dan las características a este producto, no permitiéndose las mezclas en frío.

El Mezcal es un líquido de olor y sabor suigeneris de acuerdo a su tipo. Es incoloro o ligeramente amarillento cuando es reposado o añejado en recipientes de madera de roble blanco o encino, o cuando se aboque sin reposarlo o añejarlo.

1.6.2. Proceso de elaboración

En la Figura 7 se ejemplifica en forma resumida el proceso artesanal de elaboración del Mezcal



Figura 7. Proceso de elaboración del Mezcal

1.6.3. Clasificación de Mezcal

De acuerdo al porcentaje de carbohidratos provenientes del agave que se utilicen en la elaboración del Mezcal; este se clasifica en:

- Tipo I. Mezcal 100% de agave, aquel producto que se obtiene de la destilación y rectificación de mostos preparados directa y originalmente con los azúcares de las cabezas maduras de los agaves mencionados, previamente hidrolizadas o cocidas y sometidas a fermentación alcohólica con levaduras, cultivadas o no. Este tipo de Mezcal puede ser joven, reposado o añejo y susceptible de ser abocado.
- Tipo II. Mezcal, aquel producto que se obtiene de la destilación y rectificación de mostos en cuya formulación se han adicionado hasta un 20% de otros carbohidratos permitidos por las disposiciones legales correspondientes. Este tipo de Mezcal es joven, reposado o añejo y susceptible de ser abocado.

Categorías. De acuerdo a las categorías adquiridas en procesos posteriores a la destilación y rectificación, se tiene.

- Mezcal añejo o añejado, sujeto a un proceso de maduración de por lo menos 1 año.
- Mezcal reposado, sujeto a un proceso de maduración de por lo menos 2 meses.
- Mezcal Joven

1.6.4. Tequila.

Se considera que al igual que la formación de los mestizos, por mezcla de dos culturas, el Tequila resultó de la combinación de un recurso nativo (el maguey) y una tecnología importada (la destilación). Se plantea un patrón que indica a la zona de la parte central de México como el sitio donde se difundió el Tequila.

A fines del siglo XIX se comenzó a elaborar en el pueblo de Tequila, de donde tomó el nombre esta bebida (Sánchez, 1993).

De acuerdo con la norma mexicana NOM-006-SCFI-2005, el Tequila se define como sigue: “Bebida alcohólica regional obtenida por destilación de mostos, preparados directa y originalmente del material extraído, en las instalaciones de la fábrica de un productor autorizado la cual debe estar ubicada en el territorio comprendido en la denominación de origen, derivados de las cabezas de Agave *Tequilana weber* variedad azul, previa o posteriormente hidrolizadas o cocidas, y sometidos a fermentación alcohólica con levaduras, cultivadas o no, siendo susceptibles los mostos de ser enriquecidos y mezclados conjuntamente en la formulación con otros azúcares hasta en una proporción no mayor de 49% de azúcares reductores totales expresados en unidades de masa, en los términos establecidos por esta NOM y en la inteligencia que no están permitidas las mezclas en frío. El Tequila es un líquido que, de acuerdo a su clase, es incoloro o coloreado cuando es madurado o cuando es abocado sin madurarlo.” (NOM-006-SCFI-2005, 2006)

1.6.5. Proceso de elaboración

En la Figura 8 se muestra el proceso resumido de elaboración del Tequila.



Figura 8. Proceso de elaboración del Tequila

1.6.6. Clasificación de Tequila

De acuerdo al porcentaje de los azúcares provenientes del Agave que se utilice en la elaboración del Tequila, éste se puede clasificar en una de las siguientes categorías:

- 100% de Agave, que no es susceptible de ser enriquecido con otros azúcares distintos a los obtenidos del Agave *Tequilana weber variedad azul* cultivado en el territorio de denominación de origen.
- Tequila, en el que los mostos son susceptibles de ser enriquecidos y mezclados conjuntamente en la formulación con otros azúcares en una proporción no mayor de 49% de azúcares reductores totales expresados en unidades de masa.

1.6.7. Categorías de Tequila

De acuerdo a las características adquiridas en procesos posteriores a la destilación, el Tequila se clasifica en:

- **Tequila blanco.** Producto cuyo contenido alcohólico comercial debe, en su caso, ajustarse con agua de dilución.
- **Tequila joven u oro.** Es el resultado de las mezclas de Tequila blanco con Tequilas reposados y/o añejos y/o extra añejo, se considera como Tequila joven u oro.
- **Tequila reposado.** Sujeto a un proceso de maduración de por lo menos dos meses en recipientes de madera de roble o encino.
- **Tequila añejo.** Sujeto a un proceso de maduración de por lo menos un año en recipientes de madera de roble o encino, cuya capacidad máxima sea de 600 litros.
- **Tequila extra añejo.** Sujeto a un proceso de maduración de por lo menos tres años, sin especificar el tiempo de maduración en la etiqueta, en contacto directo con la madera de recipientes de roble o encino, cuya capacidad máxima sea de 600 litros.

Para el mercado internacional se puede sustituir la clasificación mencionada en el párrafo anterior por la traducción al idioma correspondiente, o bien, por la siguiente:

- "Silver" en lugar de Blanco
- "Gold" en lugar de Joven u Oro

- "Aged" en lugar de Reposado
- "Extra aged" en lugar de Añejo.
- "Ultra aged" en lugar de Extra Añejo.

1.7. Estudios preliminares sobre caracterización de compuestos que identifican el aroma y sabor de Mezcal y Tequila

1.7.1. Microbiología del Mezcal y Tequila

La mayoría de los procesos de producción de las bebidas mexicanas alcohólicas y destilados de Agave implican una fermentación compleja en el que las bacterias (ácido lácticas y ácido acéticas) y levaduras (no *Saccharomyces* y *Saccharomyces*) están presentes. Esta microbiota es responsable de la producción de varios compuestos químicos y volátiles que confieren las características particulares del producto final.

En una destilería de Tequila se llevo a cabo una caracterización de hongos presentes en el proceso del Tequila; en el Agave natural se encontro *C. lusitaniae* y *Metschnikowia Agaves* como levaduras dominantes y *K. marxianus* y *P. membranifaciens* como levaduras secundarias. En el Agave cocido, mosto fresco y maquinas trituradoras, se encontraron diferentes especies de *Candida* spp., *Candida* intermedia, *Hanseniaspora vineae*, and *P. membranifaciens* incluyendo tres *S. cerevisiae* biotipos y *T. delbrueckii* como levaduras dominantes. Durante la fermentación fueron observadas una sucesión de especies, al inicio de la fermentación *Dekkera bruxellensis*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Hanseniaspora vineae*, *K. marxianus*, *P. membranifaciens*, y *T. delbrueckii* estuvieron presentes como levaduras secundarias, la especie predominante fue *S. cerevisiae*. Conforme al progreso de la fermentación la heterogeneidad de las especies disminuyó y al final de la fermentación *S. cerevisiae* fue la dominante (Gschaedler Mathis A, 2004).

En el mezcal de Oaxaca fueron aisladas las especies ***Candida***, ***Hanseniaspora***, ***Rhodothorula*** , y ***S. cerevisiae***; al igual que en Tequila la población de otras especies diferentes a ***S. cerevisiae*** durante la fermentación se ve disminuida quedando como especie predominante ***S. cerevisiae***.

En estos pocos trabajos publicados sobre la microbiota Mezcal, parece que las levaduras nativas y las levaduras del tipo ***Saccharomyces*** juegan un papel importante en las etapas iniciales de fermentación y en la influencia de la generación de compuestos volátiles que participan en el perfil aromático del producto final (Escalante-Minakata P, 2008)

1.7.2. Mecanismos de generación de aromas

El número de compuestos volátiles descritos en la literatura aumenta continuamente, debido en gran parte al desarrollo de técnicas de extracción y análisis instrumentales cada vez más sensibles, que son capaces de detectar compuestos odoríferos que están presentes en concentraciones extremadamente pequeñas.

Las principales reacciones en la generación de compuestos responsables del aroma son la oxidación de lípidos, reacciones de Maillard, caramelización, degradación y por la interacción de los productos de estas reacciones.

Debido a que cada uno de los constituyentes de los alimentos es un sustrato potencial en alguna transformación química, enzimática o microbiológica, el número de reacciones que estos favorecen es muy grande, por lo que existe una amplia variedad de compuestos tales como ácidos, aldehídos, azúcares, cetonas, ésteres, éteres, furanonas, furanos, terpenos, sales, aminoácidos etc. que forman parte del aroma de muchos productos (Tabla 2).

Tradicionalmente se ha considerado que la síntesis de todas estas moléculas químicamente tan distintas, se efectúa mediante uno de los cuatro mecanismos siguientes: biosintético, enzimático directo, indirecto y pirolítico.

Tabla 2. Algunos aromas generados por el metabolismo de los principales constituyentes de los alimentos

Componente	Aroma
I. Carbohidratos: glucosa, fructuosa, sacarosa.	a) Ácidos orgánicos: pirúvico, acético, propiónico, acetoacético, butírico, hexanoico, octanoico. b) Ésteres: piruvatos, acetatos, propianatos, butiratos, acetoacetatos, hexanoatos, octanoatos. c) Alcoholes: etanol, propanol, butanol, hexanol, octanol. d) Aldehídos: acetaldehído, propanal, butanal, hexanal, octanal. e) Terpenos: linalol, limoneno, pinenos, citronelal, citral, geranial.
II. Aminoácidos: alanina, valina, leucina, isoleucina, fenilalanina, serina, treonina, glicina, cistina, cisteína, serina.	Ácido pirúvico, acetaldehído, etanol, isopropanal, isopropanol, ácido α -ceto-isobutírico, 3-metilbutanal, 3-metilbutanol, 2-metilbutanal, 2-metilbutanol, benzaldehído, tiazoles, glioxal.
III. Ácidos grasos: linoleico	Trana-2-trans-decadienal, hexanal, trans-2-octenal, trans-2-pentenal, trans-2-hexenol, cis-3-hexenal, cis-3-hexenol, propanal.
IV. Ácidos orgánicos: cítrico, málico, oxalacético, láctico	Ácido pirúvico, acetaldehído, etanol.
V. Carotenoides: β -caroteno	B-ionona

(Dergal, 1999)

1.7.3. Biosíntesis

Los compuestos generados por biosíntesis, son metabolitos secundarios, que se forman durante el ciclo normal de crecimiento de los tejidos vegetales, de microorganismos o por acción de sistemas enzimáticos endógenos y exógenos.

Los ciclos bioquímicos y por ende la producción de compuestos volátiles y no volátiles se asocia con múltiples factores. En primer término la genética, establece un metabolismo diferente, por lo que cada producto exhibe un perfil sensorial característico; además de los aspectos genéticos, las condiciones climatológicas (temperatura, humedad, tiempo de exposición a la luz solar), tipo de suelo (pH, disponibilidad de nutrimentos) y las prácticas culturales (rotación de cultivos, riego,

fertilización, adición de hormonas, formación de injertos) también influyen de manera decisiva.

1.7.4. Compuestos volátiles en la materia prima y producidos durante la fermentación

Los compuestos volátiles de las materias primas juegan un papel importante en el desarrollo de las características sensoriales del producto final, por ejemplo en ***A. angustifolia***, ***A. salmiana*** y ***A. Tequilana*** se reportó el mismo perfil de ácidos grasos en diferente concentración, pero diferente perfil de terpenos (Peña Álvarez-A, 2004).

Los terpenos son compuestos aromáticos importantes; en bajas concentraciones en algunos casos dan buenas características al producto final. Ciertos terpenos están presentes en la materia prima como complejos de polisacáridos y pueden ser liberados por acción de las enzimas microbianas como la β -glucosidasa, β -cellobiosidase, y β -xylosidase.

Un examen para detectar la presencia de β -glucosidasa y β -xylosidase se ha realizado en seis levaduras (tres **cepas de *S. cerevisiae***: ***C. magnoliae***, ***C. krusei*** y ***vineae H.***) aisladas de mostos de ***Agave*** cepas ***cerevisiae*** producen β -xylosidase y la no- ***Saccharomyces*** producen dos enzimas. La mayor actividad de la β -glucosidasa se obtuvo al aislar ***C. magnoliae***. Por lo tanto, las levaduras presentes en el proceso de fermentación podrían desempeñar un papel importante en la liberación de los terpenos. Por otra parte, en cada cepa existen diferentes actividades enzimáticas por lo que el perfil aromático de la bebida puede ser diferente dependiendo de la microbiota involucradas en el proceso de fermentación (Fiore C, 2005).

1.8. Ácidos grasos y el aroma

La fracción lipídica es un sustrato fundamental en la generación de compuestos volátiles, porque una gran cantidad de compuestos del aroma y del sabor provienen de la degradación de lípidos e incluyen hidrocarburos alifáticos, aldehídos, cetonas, alcoholes, ácidos carboxílicos, ésteres, lactonas y alquilfuranos.

Los lípidos simples se presentan principalmente como acilgliceroles, y una de sus características es la generación de ácidos grasos por hidrólisis, (López, 1999); un ejemplo de esto, se observo con el aumento de la concentración de ácidos grasos de cadena larga durante la cocción del Agave. Estos ácidos grasos como se ha mencionado son importantes ya que dan características organolépticas a las bebidas, sobre todo porque con la presencia del alcohol se forman los ésteres correspondientes, que poseen aromas singulares del tipo floral, frutal, dulce y céreo (Tabla 3). Los ésteres son lo compuestos organolépticos más numerosos en las bebidas alcohólicas (Nykänen & Suomalaien, 1983).

Tabla 3. Olores de ésteres etílicos

Ésteres etílicos	Olor
Ester etílico del ácido heptanoico	Bayas, melón, melocotón, piña, ciruela, brandy
Ester etílico del ácido octanoico	Flores, pera, piña, matices lácteos cremosos, setas, matices de brandy
Ester etílico del ácido nonanoico	Coñac de cera, manzana, platano, tropical, avinado, cera, jabón,uva
Ester etílico del ácido undecanoico	Jabón, cera, grasa, con un ligero matiz a mantequilla

Sólo los ácidos grasos libres de cadena corta son volátiles y presentan un determinado olor. Sin embargo, aunque los de cadena más larga no huelen, son precursores importantes en la síntesis de los aromas de una gran cantidad de alimentos. Para su utilización, debe haber una actividad lipásica que los libere de los triglicéridos. Los ácidos grasos poliinsaturados localizados en la membrana

celular son extraídos de ella durante el picado, en el caso del Agave, una vez libres, los ácidos linoleico y linolénico entran en la β -oxidación y la oxidación por la lipoxigenasa, este conjunto de transformaciones trae consigo la síntesis de aldehídos (Tabla 4), alcoholes, cetonas, ésteres, ácidos, lactonas etc.

Tabla 4. Olores de Aldehídos

Aldehídos	Olor
Propionaldehído	Café tostado, hierba
Butiraldehído	Frutal, plátano, hierba
Pentanal	Acre, 32utilic, chocolate
Hexanal	Hierba pasto, grasa, fruta
Heptanal	Grasa, rancio, nuez, coñac
Octanal	Grasa, rancio, fruta, citrico
Nonanal	Grasa, floral, cera, citrico
Decanal	Grasa, dulce, naranja, citrico
Undecanal	Dulce, rancio, grasa, cera, floral
Dodecanal	Dulce, rancio, cera, violeta

1.9. Terpenos

Los terpenos constituyen un grupo muy importante de compuestos aromáticos y se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Su frecuencia y abundancia están íntimamente ligadas a factores genéticos y climáticos. Gran cantidad de aceites esenciales se han utilizado desde la antigüedad como perfumes, medicinas, narcóticos, pigmentos, conservadores etc.

Los terpenos son un grupo de compuestos derivados del isopreno y se clasifican como monoterpenos, los de tres, cuatro, seis y ocho reciben los nombres de sequiterpenos, diterpenos, triterpenos y tetraterpenos respectivamente.

Las moléculas de isopreno se unen generalmente en un arreglo tipo cabeza-cola, como ocurre con los monoterpernos, pero también existen en forma de cola-cola, para integrar las dos partes de los Carotenoides. Sólo los terpenoides volátiles contribuyen al aroma de los alimentos.

Los monoterpenos como los sequiterpenos pueden estar oxigenados en forma de aldehídos, cetonas, alcoholes, ácidos y ésteres; son los compuestos oxigenados los realmente responsables de los aromas y sabor de los aceites esenciales.

Los monoterpenos pineno, mentol, geraniol, carvanona, etc. son sustancias que se encuentran en los volátiles de diversas frutas y especias; dadas su estructura química, algunos presentan carbonos asimétricos y por lo tanto existen en dos formas ópticamente activas; así, el pineno se encuentra como a y b y difiere en sus propiedades sensoriales.

CAPITULO 2

DESARROLLO EXPERIMENTAL

2.1. Materiales y Equipo

- Barras de agitación (Stir Bars, Twister) con 1cm de longitud y cubierta con polidimetilsiloxano (PDMS) de Gerstel (Mülheim and der Ruhr, Germany).
- Balanza analítica Startorius modelo CP124S
- Parrilla con agitador magnético (Mirak, EUA)
- Viales de vidrio de 11mL de capacidad y tapón horadado de polipropileno con septa de teflón
- Jeringas de vidrio Hamilton de 10, 250, 100 y 500 μ L
- Material de vidrio común del laboratorio
- Soporte universal y pinzas

2.2. Reactivos

Alcohol etílico absoluto (99.2% pureza) y cloruro de sodio (99.5% pureza) de Analytyka, México. Diclorometano (99.9% pureza) de J.T. Baker, EUA.

Estándares

Estándares (pureza > 97%): linalol, α -terpineol, cis-nerolidol, trans,trans-farnesol, Fluka Chemika, EUA y Sigma Aldrich, Suiza.

Estándares (pureza >99%): Ester etílico del ácido graso hexanoico (EE6), Ester etílico del ácido graso octanoico (EE8), Ester etílico del ácido graso octadecanoico (EE18) Nu-Chek Prep, INC, EUA.

2.3. Muestras

Se analizaron 5 Mezcales y 5 Tequilas blancos, los cuales se enlistan en la siguiente Tabla 5.

Tabla 5. Muestras de Mezcal y Tequila analizadas

Mezcal	Tipo de Agave	Región Geográfica	Alcohol %
Enmascarado	Joven, <i>Espadín</i>	Matatlán Oaxaca	45%
Casa del Agave Divino	Joven, <i>Espadín</i>	Teometl	40%
Laguna Seca	<i>Esperrima jacobi</i>	San Luis Potosi	38%
Real minero	Joven, largo	Ocotlán de Morelos, Oaxaca	45%
Dioseño	Cenizo y Capón	Durango	50.2%
Tequila			
Herradura Blanco	<i>Tequilana Weber</i> <i>variedad azul</i>	Amatitan, Jalisco	46%
Viuda de Romero	<i>Tequilana Weber</i> <i>variedad azul</i>	Tequila, Jalisco	38%
Catador Blanco	<i>Tequilana Weber</i> <i>variedad azul</i>	Jesús María Arandas	38%
Plata Hornitos	<i>Tequilana Weber</i> <i>variedad azul</i>	Tequila, Jalisco	38%
Orendain Blanco	<i>Tequilana Weber</i> <i>variedad azul</i>	Tequila, Jalisco	38%

2.4. Metodología

2.4.1. Identificación de compuestos

La identificación de los compuestos se realizó comparando los tiempos de retención y los espectros de masas obtenidos de las muestras con los tiempos de retención de algunos estándares, así como los espectros de masas de la base de datos de la biblioteca de espectros de masas del NIST (The NIST Mass Spectral Search Program for the NIST/EPA/NIH Mass Spectra Library versión 2.0 build 19 Nov 2001).

2.4.2. Cuantificación de Ésteres Etílicos

Para la cuantificación de ésteres etílicos se realizaron 3 curvas patrón utilizando las siguientes concentraciones en 45% de alcohol etílico: 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 y 4.0 ppm; para EE8 y EE16 y 0.1, 0.15, 0.2 y 0.25ppm para EE18.

2.5. Análisis Cromatográfico

Cromatógrafo de Gases con inyector Split/splitless (6890N Agilent Technologies) acoplado a un Detector Selectivo de Masas (5973 Agilent Technologies) y columna capilar 5% fenil siloxano (Quadrex) 30m*0.25mm*0,25µm. Temperatura del inyector 250°C, en modo splitless (3 min). Programa de Temperatura: Temperatura inicial 40°C manteniéndose durante 1 min, incrementándose hasta 210°C con una velocidad de 5°C/min, incrementándose nuevamente hasta 280°C con una velocidad de 10°C/min, y manteniéndose durante 5 min. Gas acarreador: He 1mL/min; Temperatura de la línea de transferencia: 280°C; Temperatura de la fuente de ionización: 230°C y Temperatura del analizador (cuadrupolar) 150°C. Los análisis se realizaron por impacto electrónico a (70eV); se utilizó el modo de barrido total del espectro (SCAN por sus siglas en ingles).

2.6. Acondicionamiento de barra magnética (SBSE)

Previo al uso de la barra magnética se requiere realizar un acondicionamiento y este se efectuó de la siguiente manera: en un vial de 1 ml se introduce la barra magnética, se tapa con una septa de alta temperatura y se engargola con una tapa de aluminio. Se coloca en el inyector de un cromatógrafo de gases un capilar (30 cm aprox.) que permitirá el paso del H₂ hacia el vial con la barra y otro capilar que sale del vial hacia el detector del cromatógrafo, ya colocado el dispositivo en el horno se incrementa la temperatura a 280°C y se mantiene así durante 60 min (Figura 9); posteriormente se enfría durante 60 min y se procede a sacar la barra. Para verificar que el proceso de acondicionamiento se realizó de manera correcta se le adicionan 500µL de diclorometano, se pone en agitación durante 30 min, se evapora a 100 µL con una suave corriente de N₂ y se inyecta 1 µL en el CG-EM.

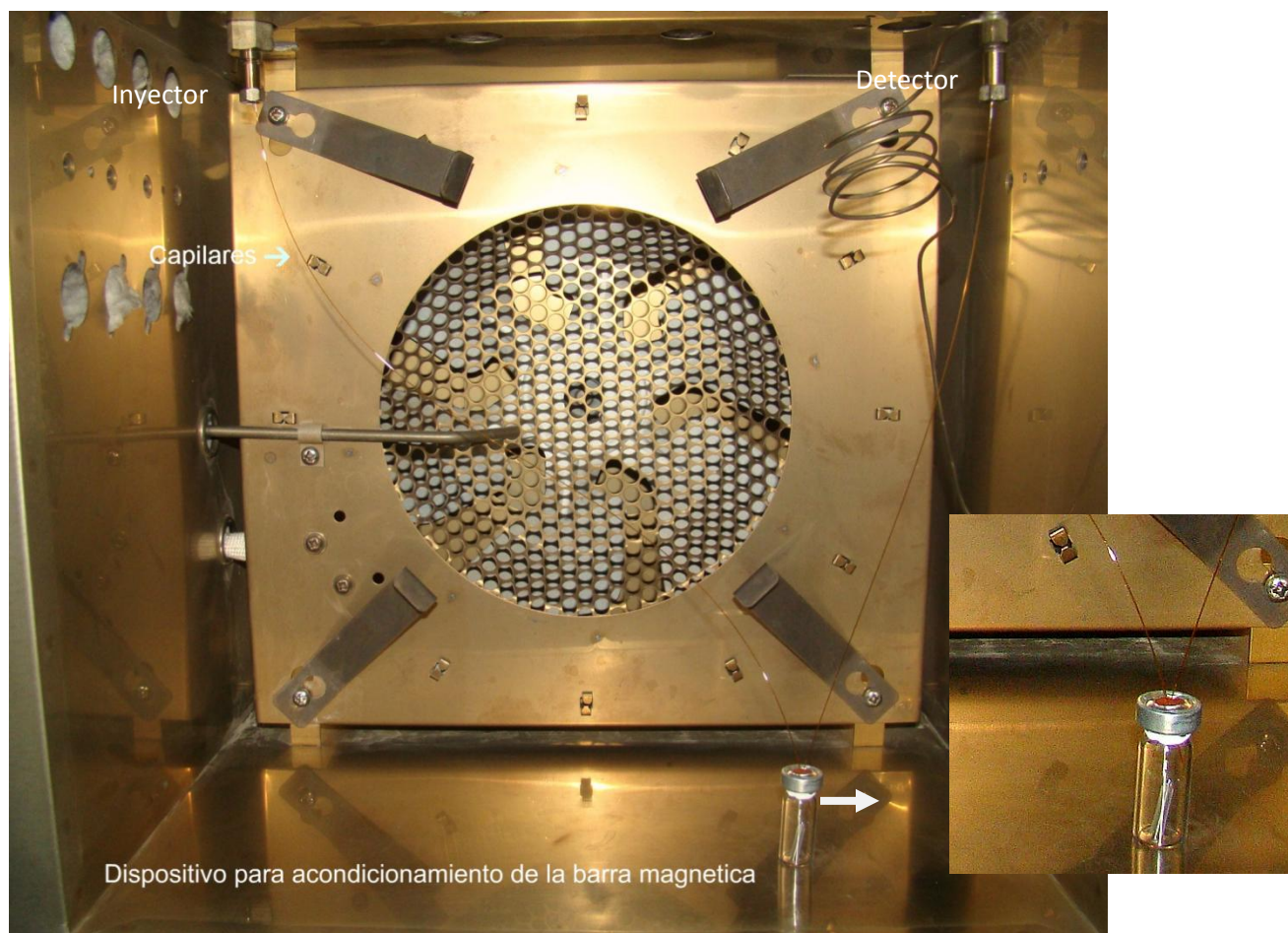


Figura 9. Dispositivo para el acondicionamiento de la barra magnética (SBSE)

2.7. Optimización de los parámetros de SBSE

Para el desarrollo de la metodología fue necesario optimizar diversos factores para mejorar la eficiencia de la extracción; estos fueron: tiempo de extracción, velocidad de agitación, fuerza iónica y temperatura. La optimización se realizó con el Mezcal Enmascarado por que fue el que presentó mayor número de compuestos en un análisis preliminar.

Tiempo de extracción. Para determinar la influencia del tiempo de extracción se seleccionaron 30, 60, 90 y 120 minutos, con agitación de 1000 rpm, temperatura ambiente y 4ml de muestra.

Efecto de agitación. De acuerdo con los resultados del inciso anterior se eligieron 60 min de extracción para realizar el estudio del efecto de agitación se realizaron extracciones a velocidades de 60, 100, 500, 1000 y 1200 rpm, temperatura ambiente y 4 ml de muestra (Figura 10).



Figura 10. Efecto de agitación

Temperatura de extracción. De acuerdo con los resultados del inciso anterior se utilizaron 60 min de extracción, 1000 rpm y 4 ml de muestra para la evaluación de temperatura de extracción y estas fueron: temperatura ambiente (22°C), 30°C y 50°C.

Efecto de la adición de sal. Para el estudio del efecto de la fuerza iónica se adicionó un porcentaje de sal, de acuerdo al punto de saturación del agua, de modo que para obtener el 50% de saturación en 4mL de muestra se adicionaron 0.718g NaCl, se realizaron extracciones durante 60 minutos, a 1000 rpm, temperatura ambiente debido a los resultados obtenidos de los incisos anteriores.

Efecto del porcentaje de alcohol. Para el estudio de esta variable se utilizaron muestras con un porcentaje de 25% y 45% de alcohol etílico realizándose

extracciones durante 60 min, 1000rpm, temperatura ambiente (22°C) y 4ml de muestra.

CAPITULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Determinación de las condiciones de trabajo

Los resultados obtenidos con las diferentes variables que se optimizaron para el análisis de compuestos volátiles y semivolátiles de las bebidas alcohólicas se muestran a continuación. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

3.1.1. Efecto del tiempo de extracción

En la Figura 11 se ilustra el perfil de tiempo de extracción de los compuestos mayoritarios, ésteres etílicos (EE) y terpenos; como se observa, en casi todos los casos 60 min de extracción resulta ser el óptimo para estos compuestos, ya que 30 y 90 min presentaron menor rendimiento y a pesar de que 120 min de extracción, en algunos casos, es mayor que a 60 min el aumento en el rendimiento de extracción no es tan significativo y se alarga el tiempo de análisis.

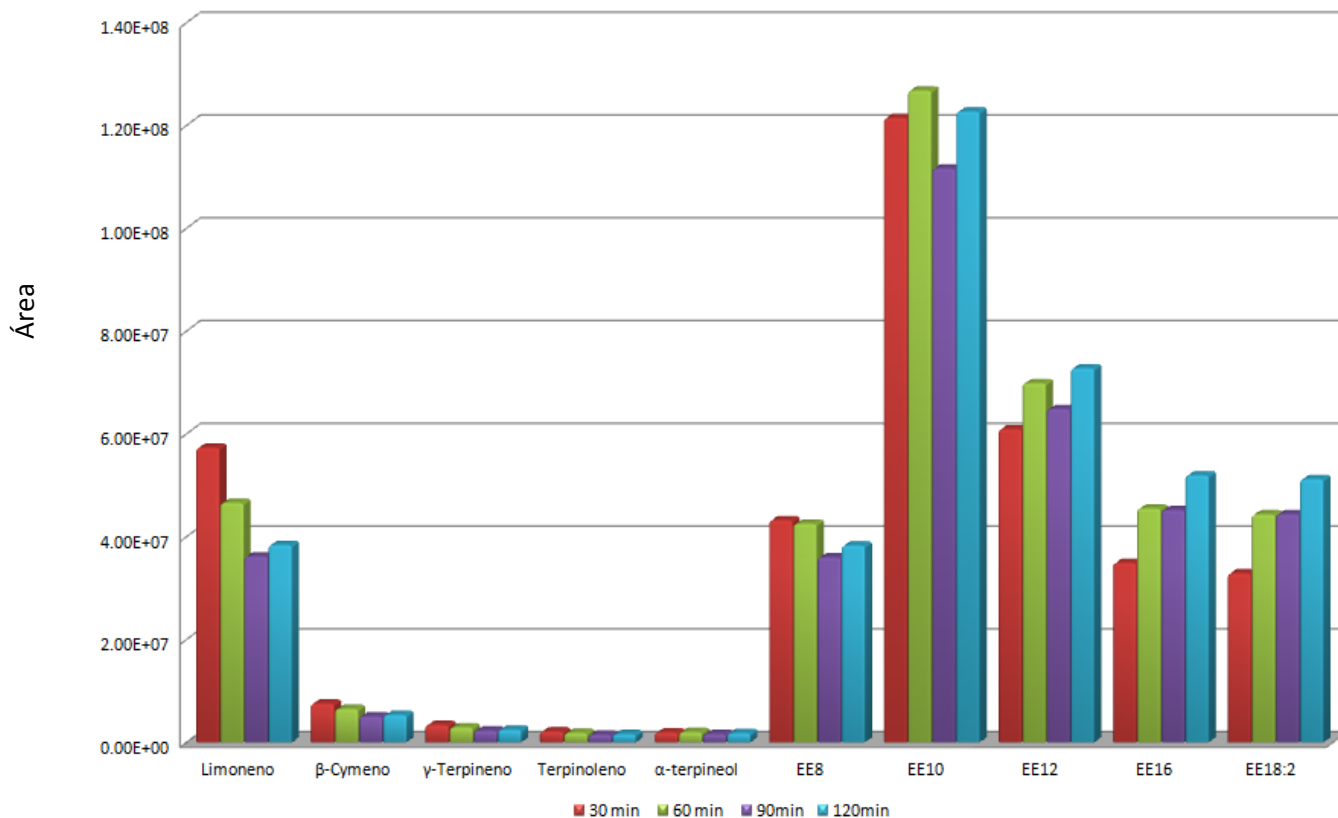


Figura 11. Perfil de tiempo de extracción de Ésteres Etílicos y Terpenos en el Mezcal Enmascarado (n=3 CV<10%)

3.1.2. Efecto de la agitación

La Figura 12 muestra que al ir incrementando la velocidad de agitación la extracción de los ésteres etílicos y terpenos aumenta, por lo que la agitación óptima para realizar la extracción fue 1200 rpm; sin embargo, con velocidad de 1000 rpm, la extracción obtenida no presenta una diferencia significativa con la obtenida a 1200 rpm, por lo que para este análisis la agitación seleccionada fue de 1000 rpm, debido a que a agitación mayor se tiene el riesgo de que se fracture la barra magnética.

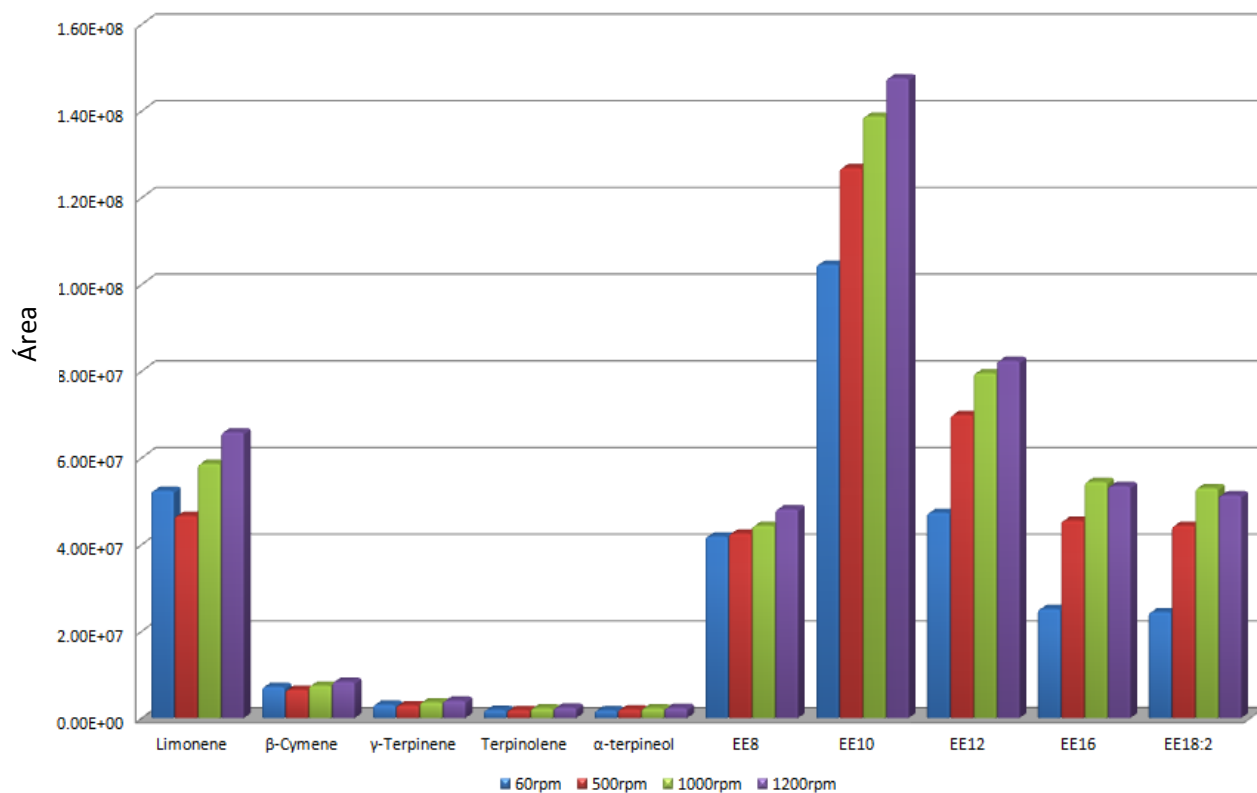


Figura 12. Efecto de la agitación en la extracción de Ésteres Etílicos y Terpenos en el Mezcal Enmascarado (n=3 CV<10%)

3.1.3. Efecto de la adición de NaCl

La Figura 13 ilustra el efecto de la adición de sal observándose que al adicionar 50% de NaCl disminuye la extracción significativamente por lo que se decidió no adicionar sal para la extracción. Esto se puede deber a que la adición de NaCl aumenta la fuerza iónica y por lo tanto favorece la volatilización de algunos compuestos.

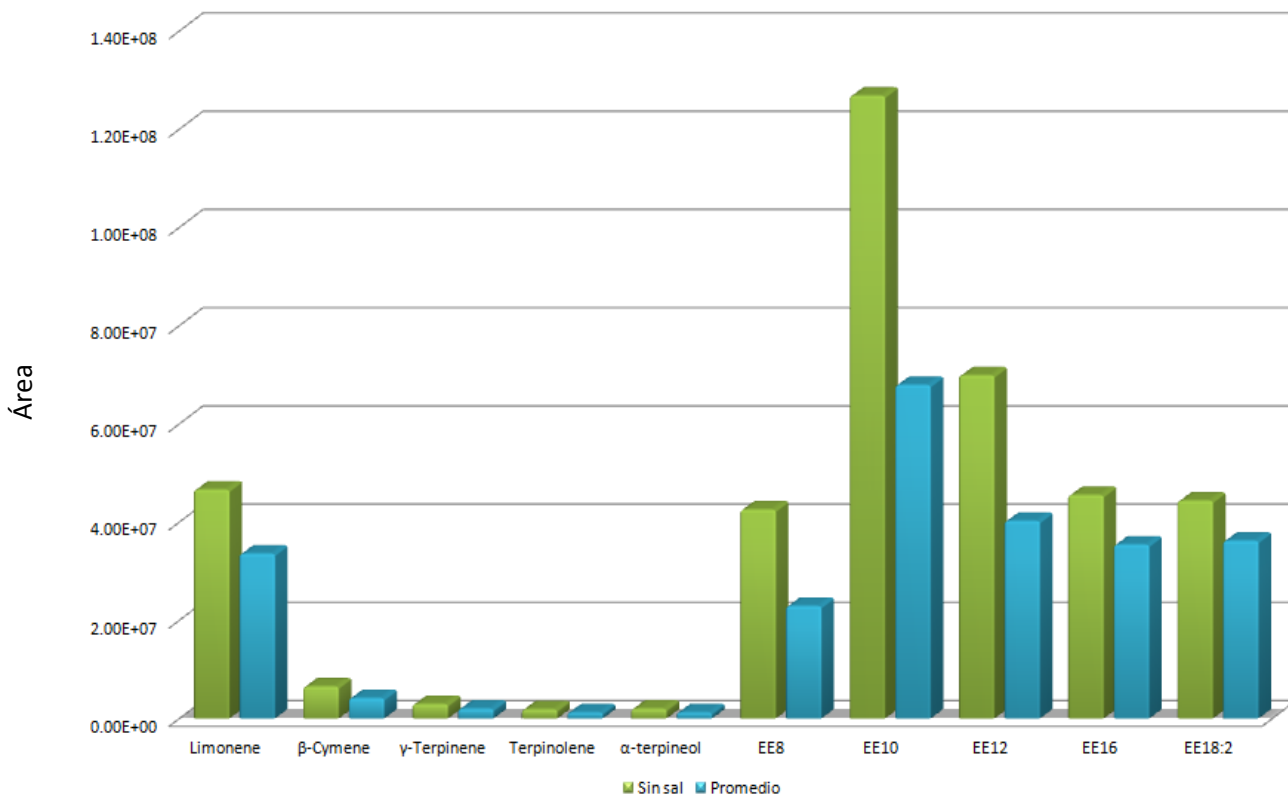


Figura 13. Efecto de la adición de sal en la extracción de Ésteres Etílicos y Terpenos en el Mezcal Enmascarado (n=3 CV<10%)

3.1.4. Efecto de la temperatura

Como lo muestra la Figura 14 mientras la temperatura se incrementa la extracción de los ésteres etílicos y terpenos presenta una disminución considerable, aunque esto no ocurre con todos los compuestos ya que el β-cimeno presenta una mayor extracción a 50°C. Sin embargo, debido al comportamiento que presentan los demás compuestos se decidió realizar las extracciones a temperatura ambiente, donde la extracción fue mejor.

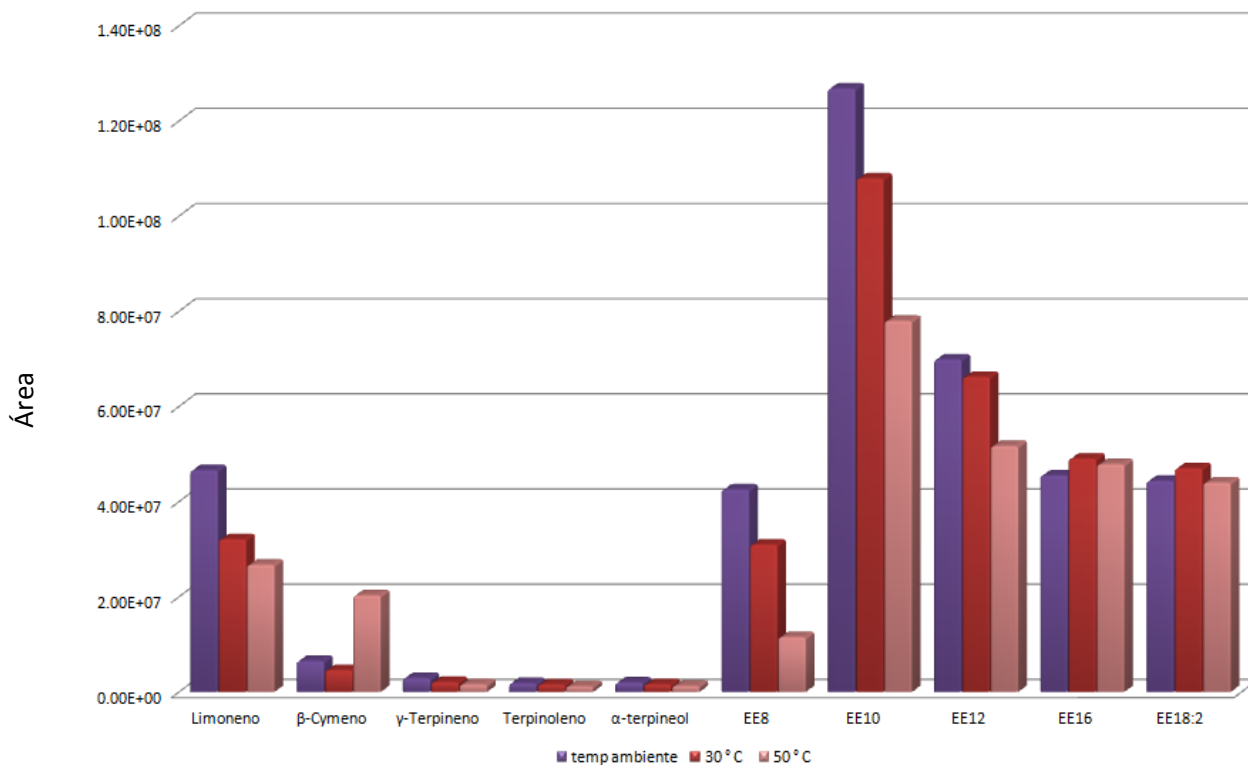


Figura 14. Efecto de la temperatura en la extracción de Ésteres Etílicos y Terpenos en el Mezcal Enmascarado (n=3 CV>10%)

3.1.5. Efecto del porcentaje de alcohol

La Figura 15 ilustra el efecto del porcentaje de alcohol en la extracción de los compuestos. Se observa que en general (excepto el EE8 presenta mejor extracción a 25% de alcohol) hay un incremento en la extracción con un porcentaje mayor de alcohol, por tal motivo se selecciono realizar los análisis con la muestra directa sin diluir. Sin embargo, de acuerdo con la literatura se recomienda realizar extracciones con un porcentaje bajo de alcohol (20%) debido al daño que puede ocasionar al polímero de la barra magnética.

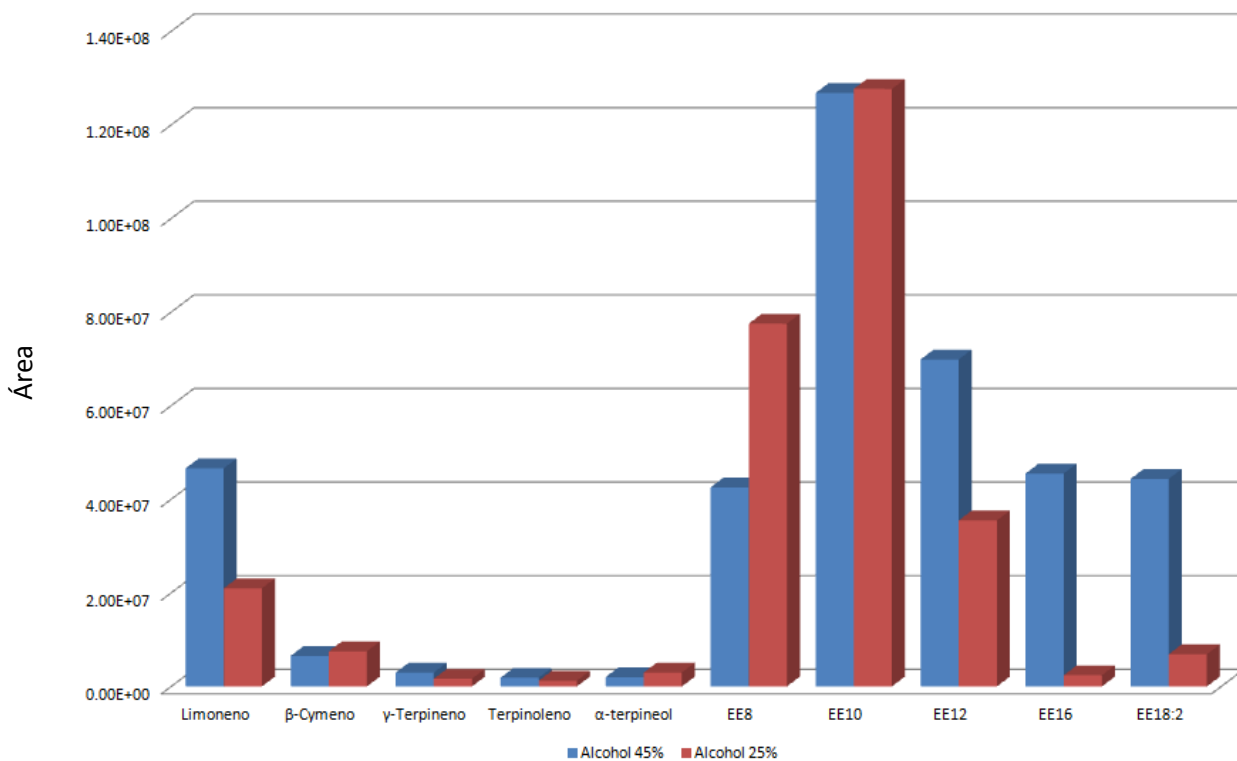


Figura 15. Efecto del porcentaje de alcohol en la extracción de Ésteres Eftílicos y Terpenos en el Mezcal Enmascarado (n=3 CV<10%)

3.2. Metodología propuesta para la extracción de compuestos volátiles y semivolátiles en Mezcal y Tequila

Basado en los resultados obtenidos en la optimización de los factores que afectan la eficiencia de la extracción, las siguientes condiciones fueron seleccionadas para el análisis de compuestos volátiles y semivolátiles en bebidas alcohólicas (Tabla 6). En la Figura 16 se ilustra el proceso de extracción y desorción propuesto utilizando SBSE para compuestos volátiles y semivolátiles en Mezcal y Tequila, desde la preparación de la muestra hasta la inyección de los compuestos extraídos en el cromatógrafo de gases.

Tabla 6. Condiciones optimas de extracción con SBSE

Condición	Extracción	Desorción
Tiempo	60 min	30 min
Temperatura	25°C	25°C
Velocidad de agitación	1000 rpm	300 rpm
Volumen de muestra	4 ml	-----
Volumen de CH ₂ Cl ₂	-----	500 µL

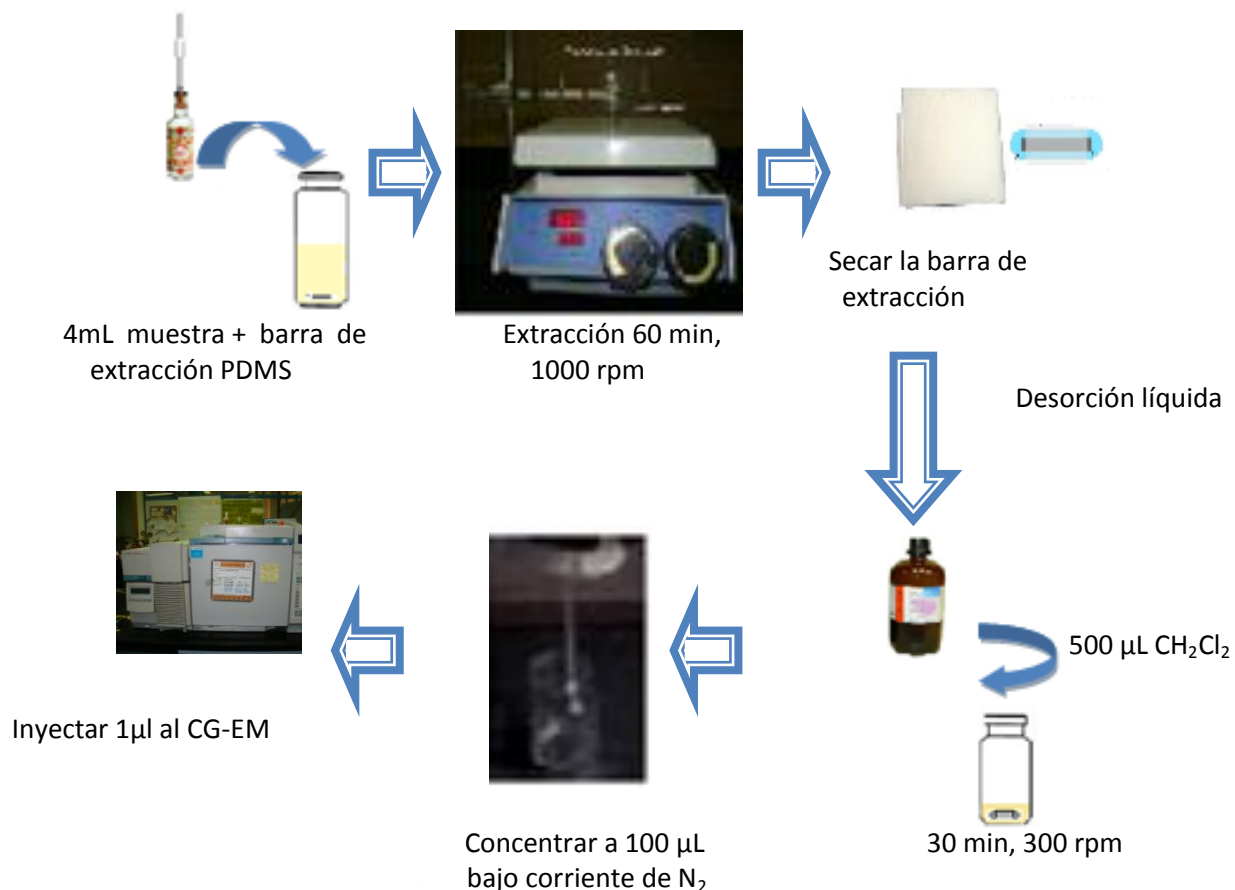


Figura 16. Esquema Analítico de la Extracción de compuestos volátiles y semivolátiles en Mezcal y Tequila.

3.3. Identificación

Mediante CG-EM se identificaron un total de 170 compuestos en Mezcal y 151 en Tequila. En general se identificaron ésteres etílicos, terpenos, alcoholes, ácidos grasos, aldehídos, furanos, pirazinas, etc. Los compuestos identificados en Mezcal

y Tequila se muestran en la Tabla 6 y 7, respectivamente, ordenados de acuerdo a los principales grupos funcionales.

Tabla 6. Compuestos identificados en Mezcal

	Alcoholes	Tr (min)	Enmascarado	Laguna Seca	Dioseño	Divino	R. Minero
1	Isoamilalcohol	4.92	★	★	★	★	★
2	2-metilenociclopentanol	9.585					★
3	4-ciclononen-1-ol	15.764					★
4	Feniletalcohol	17.148	★	★	★	★	★
5	p-menth-1-en-8-ol	20.28	★	★	★		
6	1-decanol	20.972	★	★		★	★
7	3,7-dimetil-6-nonen-1-ol	25.627		★			★
8	1-undecanol	26.464					★
9	1-dodecanol	26.448		★		★	
10	1-tridecanol	26.453	★	★			
11	2-dodecanol	27.097		★			
12	2-tridecanol	27.102		★			
13	Cedren-13-ol,8-	30.128		★			
14	1-tetradecanol	31.393	★			★	
15	1-hexadecanol	35.824	★	★	★	★	★
16	1-heptadecanol	38.977					★
17	2-metil-(s)-1-butanol	5.005	★				
	Ésteres etílicos						
18	Ester etílico del ácido Butanoico	6.517		★	★		★
19	Estere etílico del ácido isovalerico	7.96			★		★
20	Ester etílico del ácido Pentanoico	9.44		★	★		
21	Ester etílico del ácido Hexanoico	12.562	★	★	★	★	★
22	Ester etílico del ácido Heptanoico	15.662		★	★		★
23	Ester etílico del ácido Octanoico	18.687	★	★	★	★	★
24	Ester etílico del ácido Nonanoico	21.557		★		★	
25	Ester etílico del ácido Decanoico	24.292	★	★	★	★	★
26	Ester etílico del ácido Undecanoico	26.866	★		★		★
27	Ester etílico del ácido Dodecanoico	29.355	★	★	★	★	★
28	Ester etílico del ácido Tetradecanoico	33.893		★	★	★	

29	Ester etílico del ácido Pentanoico	35.985	★	★			★
30	Ester etílico del ácido Hexadecanoico	37.626	★	★	★		★
31	Ester etílico del ácido Heptadecanoico	39.015					★
32	Ester etílico del ácido Linoleico	39.964	★	★	★	★	★
33	Ester etílico del ácido Linolenico	40.098	★	★	★	★	★
34	Ester etílico del ácido Estearico	40.216	★	★	★		★
	Ácidos grasos						
35	Ácido hexanoico	11.757		★			
36	Ácido octanoico	17.727	★	★	★	★	★
37	Ácido 2-nonanoico	20.124		★			
38	2-metil del ácido decanoico	22.372	★				
39	Ácido decanoico	23.466	★	★	★	★	★
40	Ácido dodecanoico	28.561	★	★	★	★	
41	Ácido tridecanoico	33.222	★	★	★	★	
42	Ácido tetradecanoico	33.748			★		
43	Ácido hexadecanoico	37.207		★	★	★	★
	Terpenos						
44	Canfeno	10.72	★		★		
45	β-Myrceno	11.875	★				
46	Limoneno	13.329	★		★		
47	β-Cimeno	13.436	★		★		
48	Trifluoroacetyl-α-terpineol	13.667			★		
49	Eucaliptol	13.683			★		
50	γ-Terpineno	14.316	★		★		
51	Terpinoleno	15.163	★				
52	Linalol	15.759		★			
53	Cis-2-pinanol	17.276			★		★
54	Citronelol	19.7		★			
55	r-+β-citronelol	19.711		★	★		
56	β-ciclocitral	20.092					★
57	trans-geraniol	20.495		★			
58	α-terpineol	20.285	★	★		★	
59	p-cymen-2-ol	21.932		★			
60	p-alliliarisole	22.152	★				
61	Damascenone	24.426		★			★
62	β-Damascone	25.37		★			
63	(z,z)-alfa-farneseno	26.668					★
64	(-)-Zingibereno	26.679					★
65	cloveno	26.781	★				
66	α-gurjuneno	26.79	★				
67	δ-Cadineno	27.58	★		★		

68	α -calacoreno	28.593			★		
69	\pm -trans-nerolidol	28.658					
70	Nerolidol	28.663		★	★		
71	Eudaleno	29.934	★				
72	Eudesmol	30.803		★	★	★	
73	(- δ)-cardinol	31.184		★			★
74	β -Eudesmol	31.56		★	★		
75	2,3-dihidro-6-trans-farnesol (DL-)	31.715		★			
76	(z,E,)-alfa-farneseno	31.989		★		★	
77	(E,E)-farnesol	32.461		★			
78	Farnesol	32.477			★	★	★
	Ésteres						
79	2-metilester del ácido propanoico	5.4			★		★
80	Butil ester del ácido acético	6.903		★			
81	Ester metílico del ácido decanoico	24.313	★		★		★
82	3-metilbutilester del ácido octanoico	25.638	★		★		★
83	Ester metílico del ácido dodecanoico	27.66	★		★		
84	3-metilbutilester del ácido pentadecanoico	30.519	★		★		
85	2-fenilester del ácido hexanoico	31.243		★			
86	2-metilbutilester del ácido dodecanoico	34.971	★	★			
87	Octanoic acid,2-fenilester	35.722	★	★			
88	Ester metílico del ácido hexanoico	36.564	★	★	★		
89	Ester metílico del ácido linolénico	39.326		★	★	★	
90	2-etildodecilester del ácido hexanoico	40.941	★				
91	Ácido dihidroabietico metilester	42.448	★				
92	Butil ester del ácido acético	6.903		★			
	Aldehídos						
93	Furfural	8.28	★				★
94	4-pentenal	8.486		★			
95	Trans-2-octenal	9.57	★				
96	2-etenil-2-butenal	9.88	★	★	★		★
97	5-metil-2-furfuraldehido	12.353	★		★		★
98	Hexanedial	15.067	★	★	★	★	
99	Nonanal	16.172	★	★		★	
100	2-etil-4-pentanal	18.124		★			

101	Decanal	19.25	★				
102	Hexaniedal	19.583		★	★		
103	Oactanaldietilacetat	20.752	★				
104	2-metil,heptanal	22.785		★			
105	Decanaldietilacetat	26.057	★				
106	Pentadecanal	34.595		★			★
107	Hexadecanal	34.611	★				
	Otros						
108	Acetal	4.57	★		★	★	★
109	Propilenglycol	6.973		★			★
110	Tiranton	8.164		★	★		
111	Isoamilacetato	8.71	★			★	★
112	Estireno	9.45	★		★		
113	1,1-dietoxy-3-metil-butano	10.448					★
114	Acetaldehido etillamiacetat	11.167	★		★		★
115	2-ciclohexen-1-one	11.575	★	★	★	★	★
116	Isocineole	12.975	★		★		
117	1,1,3-trietoxipropano	14.691					★
118	Morfolina	16.536	★				
119	Isoborneol	17.303	★				
120	Dureno	17.63					★
121	Azuleno	19.433	★	★			
122	Naftaleno	19.448			★		★
123	3-BHA	19.69	★				★
124	Adamantan-2-ol,4-cloro-	20.602	★	★	★	★	★
125	4-Hexen-1-ol,2-etenil-2,5-dimetil-	21.036			★		
126	Ciclohexanol,1-(1-hexenil)-,(E	21.256	★				
127	2(1H)-Naftaleno,3,4,4 ^a ,5,6,7-hexahidro-1,1,4 ^a -trimetil-	21.374					★
128	1,3-Dioxolane,2-(1-metiletil)-	21.83	★		★	★	★
129	1,3-Dioxolane,2-heptil-	22.97		★		★	★
130	2-(3-chloropropil)-1,3-dioxolane	22.082	★				
131	ciclohexil-benzeno	22.93	★	★	★	★	★
132	Bifenil	25.02		★	★	★	★
133	2-etenil- Naftaleno	25.054	★	★		★	
134	α-curcumeno	26.727	★				
135	propilester del acido decanoico	26.775		★			
136	Chamigreno	26.786					★
137	Valenceno	27.011	★				
138	4-hexil-2,5-dihidro-2,5-dioxo-3-del ácido Furanacetico	27.188		★			★
139	Acenaftileno	27.21	★		★	★	
140	Butilated Hidroxitolueno	27.329			★		
141	Acenafteno	27.945	★				

142	Decanamide, n-pentil	28.073	★				
143	Dibenzofurano	28.813	★				
144	Carbazole	28.819		★			
145	1,3-dioxolane,2-pentadecil-	29.017	★	★	★	★	★
146	Naftaleno,2,3,6-trimetil-	29.52	★				
147	1-naftalenol,1,2,3,4-tetrahidro- 2,5,8,-trimetil	29.698		★	★		
148	Cubenol	30.133		★			
149	β-Orcinaldehido	30.015	★				
150	Fluoreno	30.514		★		★	★
151	Epiglobulal	31.093		★			
152	Xantana	31.195	★				
153	Azulon	31.731	★	★			
154	Veridiflorol	32.627		★			★
155	Isobutillaurato	32.74	★				
156	9-metil,fluorene	33.072	★		★		★
157	Ascabiol	34.874		★			
158	Antraceno	35.405	★			★	
159	Fenantreno	35.4	★	★	★	★	
160	1,9-Dihidropireno	36.666		★			
161	Ethyl9-hexadecanoate	37.213		★	★		★
162	1-metilfenantreno	37.486	★			★	
163	6H-ciclobuta[jk]fenantreno	37.83	★				
164	Longiborneol	38.768					★
165	2,7-dimetilfenantreno	39.331	★			★	
166	Ácido 9,12-octadecadienoico (z,z)-	39.728	★	★	★	★	★
167	Pireno	40.726		★		★	
168	2,3,5-trimetil-fenantreno	40.747	★				
169	Reteno	41.343	★				
170	7H-Benzo[c]fluoreno	41.911	★				
	Total de compuestos		92	87	69	44	65

Tabla 7. Compuestos identificados en Tequila

	Alcoholes	Tr (min)	Catador	Herradura	Viuda de Romero	Orendain	Hornitos
1	Feniletilalcohol	17.126	★	★	★		
2	Isopentilalcohol	4.913	★	★	★	★	
3	3,4-dimetil-2-hexanol	7.16	★				
4	Diacetone alcohol	8.158	★				
5	2-ciclohexen-1-ol	9.547	★	★			★
6	(s)-3-etil-4-metilpentanol	13.237	★	★	★		
7	1,8-nonadien-3-ol	14.686	★		★	★	
8	7-oxabicyclo(4,10)heptan-2-ol	14.809			★		
9	4-clorociclohexanol	15.753	★				
10	P-menth-1-en-8-ol	19.186	★	★	★	★	★
11	1-decanol	20.961	★	★			
12	2-butil-2,7-octadien-1-ol	21.251	★				
13	1-dodecanol	26.448	★				
14	1-undecanol	26.443		★	★		
15	1-tridecanol	26.464		★			
16	2-dodecanol	27.097	★	★			
17	1-hexadecanol	31.398	★	★	★		
18	2-undecanol	21.728	★	★			
19	2-clorociclohexanol	14.509	★	★			
	Ésteres etílicos						
20	Ácido butanoico-3-metil-etilester	7.949	★	★			
21	Ester etílico del ácido hexanoico	12.551	★	★	★	★	★
22	Ester etílico del ácido heptanoico	15.672	★				
23	Ester etílico del ácido octanoico	16.305	★	★	★	★	★
24	Ester etílico del ácido nonanoico	21.556	★	★			
25	Ester etílico del ácido benzoprapanoico	23.884	★	★	★		
26	Ester etílico del ácido decanoico	24.302	★	★	★	★	★
27	Ester etílico del ácido E-11-hexadecanoico	28.824		★			
28	Ester etílico del ácido dodecanoico	29.323	★	★	★	★	★
29	Ester etílico , 9,9-dietoxy-del ácido	33.42		★	★		

	nonanoico		★	★			
30	Ester etílico del ácido tetradecanoico	33.989			★		★
31	Ester etílico del ácido oleico	35.502	★	★	★		
32	Ester etílico del ácido pentadecanoico	35.947	★	★	★		
33	Ester etílico del ácido hexadecanoico	37.609	★	★	★	★	★
34	Ester etílico del ácido heptadecanoico	39.015		★			
35	Ester etílico del ácido linoleico	39.969	★	★	★		
36	Ester etílico del ácido linolenico	40.093	★	★	★		
37	Ester etílico del ácido estearico	40.2	★	★	★		
38	Ester etílico del ácido nonadecanoico	41.037	★				
	Ésteres						
39	Éster metílico del ácido octanoico	16.525	★	★			★
40	Éster metílico del ácido decanoico	22.388	★	★			
41	3-metilbutilester del ácido octanoico	25.622	★	★			
42	Hexil ester del ácido decanoico	26.775	★				
43	Éster metílico del ácido dodecanoico	27.664	★				
44	3-metilbutilester del ácido pentadecanoico	30.53	★	★	★		
45	2-oxo-.metilester del ácido hexadecanoico	34.204	★				
46	14-metil-metilester del ácido pentadecanoico	36.574	★				
47	Éster metílico del ácido hexadecanoico	36.558	★	★			
48	2-oxo-metilester del ácido hexadecanoico	37.958					
49	tetradecilester del ácido valerico	38.43	★				
50	Éster metílico del ácido linolenico	39.187		★			★
	Terpenos						
51	Dihidrocitronelol	14.069	★				

52	linalol	15.764				★	
53	Cis-2-pinanol	17.276	★	★			
54	β-ciclocitral	20.092	★				
55	α-terpineol	20.29	★	★		★	
56	±-trans-nerolidol	28.657		★	★		
57	Nerolidilacetato	29.667		★			
58	Cubenol	30.32	★				
59	2,3-dihidro-6-trans-farnesol (DL-)	31.715	★	★	★		
60	α-bisabolol	31.946	★	★	★		
61	D-nerolidol	31.919		★			
62	Farnesol	32.46	★	★	★		
63	(E,E)-farnesol	32.461			★		
64	(Z,E)-farnesol	32.53	★	★			
65	Farnesol	38.178	★	★	★		
66	Farnesan	14.911	★				
	Aldehidos						
67	2-etenil-2-butenal	9.874	★	★	★	★	★
68	5-metilfurfural	12.347	★	★	★		
69	Hexadienal	15.056	★	★	★	★	★
70	Nonal	16.171	★				
71	2-butil-2-etil-5-metil-3,4-hexadienal	19.685		★			
72	Decanal	27.547	★				
73	(z)-7-hexadecenal	29.119	★				
74	Hexadecanal	34.595	★				
75	Pentadecanal	34.611		★			
76	13-otadecenal, (z)-	39.39	★	★			
	Ácidos grasos					★	
77	Ácido octanoico	17.807	★	★	★		
78	Ácido decenoico	23.557	★	★	★		
79	Ácido dodecanoico	28.642	★	★	★		
80	(z,z)-Ácido linoleico	37.878	★	★	★		
81	Ácido hexadecanoico	27.234	★	★	★		
82	Ácido pentadecanoico	35.384	★		★		
83	Ácido 14-pentadecenoico	35.743	★	★			
84	Ácido z-7-tetradecenoico	33.517	★	★			
85	Ácido E-11-tetradecenoico	33.737	★				
86	Ácido tetradecanoico	33.233	★	★	★		
	Otros						
87	Acetal	4.57	★	★	★		

88	Tolueno	5.653	★				
89	2,3,4-trimetil-hexano	6.136	★				
90	2,4-dimetil-1-hepteno	6.839	★				
91	Éster 55útilico del ácido acetico	6.914	★		★	★	
92	1-(metoxymetoxi)-hexano	6.962	★	★			
93	4-metiloctano	7.423	★				
94	4-hidroxi-4-metil-2-pentanona	8.169			★		
95	1,2-dichoropentano	8.517	★				
96	3-metil-acetato-1-butanol	8.711	★	★		★	
97	3-cloro-ciclohexano	10.089	★	★	★	★	★
98	Glutural	10.733	★				
99	1,1,2,2-tetracloro-etano	10.851	★				
100	1-(1-etoxietoxi)-pentano	11.156	★		★		
101	2-ciclohexen-1-one	11.58		★	★		
102	Etriol	11.913	★				
103	1-butoxi-3-metil-2-buteno	12.985	★				
104	Undecano	13.393	★				
105	1,2-ciclohexadiona	13.624	★				
106	Adipoin	13.817	★				
107	Hexiloctileter	14.23	★				
108	1,4-dietoxi-2-buteno	14.696	★				
109	1,1-dietoxi-hexano	14.922		★			
110	4-metil-undecano	15.168	★				
111	4-oxo-etillester del acido pentanoico	15.501	★	★			
112	2-clorociclohexanona	15.774			★		
113	3,4-dimetilestireno	15.775		★			
114	Dureno	17.625	★	★			
115	3-(2metilpropoxi)-ciclohexano	18.445	★				
116	MetilSalicilato	19.443	★	★			
117	1-(1,1-dimetiletil)-2-metoxi-4-metil-benzo	19.937		★			
118	dl-ácido aspartico	20.13			★		
119	Adamantan-2-ol,4-cloro-	20.596	★	★	★	★	

120	Geranioletoleter2	21.02	★				
121	Geranioletoleter1	21.02		★			
122	3,4,4 ^a ,5,6,7-hexahidro-1,1,4 ^a -trimetil-2(1H)-naftalenona	21.358	★				
123	2-(1-metilpropil)-1,3-dioxolano	21.819		★	★		★
124	1,2-heptil-1,3-dioxolano	21.83	★	★	★		★
125	Formilpiperidina	21.916	★				
126	2-(3-cloropropil)-1,3-dioxolano	22.109	★				
127	Ploroglucitol	22.125	★	★			
128	Thimol	22.211		★			
129	cilohexil-benzeno	22.924	★		★		★
130	2-etenil-naftaleno	25.016	★				
131	Acenafteno	25.037	★				★
132	7-metil-1-naftol	25.289	★				
133	Etiltrans-2-decenoato	25.938	★				
134	2-andamantanol,2-(bromometil)-	27.006					
135	1-ter-butil-3-(3-metoxifenil)-biciclo(1,1,1,)pentano	27.317	★		★		
136	Ácido trans-2-dodecenoico	29.006	★		★		
137	Epoxido Isoaromadendreno	29.666	★				
138	,cis- Lancelol	31.796		★			
139	Cadeleno	32.02		★			
140	5,6-decadien-3-yne-5,7-dietil	34.048	★				
141	Benzilbenzoato	34.853	★	★	★		
142	Isoamillaurato	34.96		★			
143	trans-9- Hexadecen-1-ol	35.824		★			
144	4-metil-Ciclopentadecanona,	36.242	★				
145	tetradecil- oxidano	36.231	★				
146	Ácido Hexadecenoico	36.977	★				
147	Etil-9-hexadecenoato	37.39	★	★	★		
148	Fitol	36.671		★			
149	Z-10-tetradecen-1-olacetato	36.982		★			

150	Ácido octanoico, 2-hexyl-	38.688	★				
151	Isopropilinoleato	42.598		★			
	Compuestos totales		118	87	52	17	17

En las muestras de Mezcal analizadas se identificaron diferente número de compuestos; en orden decreciente se tiene: “Enmascarado” (92 compuestos) > “Laguna Seca” (87 compuestos) > “Dioseño” (69 compuestos) > “Real Minero” (65 compuestos) > “Divino” (44 compuestos).

Como se ilustra en la Figura 17, la distribución general de los diferentes compuestos en el Mezcal son: terpenos 29%, ésteres etílicos (EE) 17%, alcoholes 16%, aldehídos 15%, ésteres metílicos en 14% y ácidos grasos 9%. Como se observa, el mayor porcentaje es de terpenos ya que se consideraron en la identificación todos los isómeros debido a que todos, en mayor o menor grado, contribuyen a las propiedades sensoriales del Mezcal. Sin embargo, la concentración de muchos de ellos es a nivel de trazas. La presencia y concentración de estos compuestos, en cada Mezcal probablemente se deba a diferentes factores como el tipo de agave, el tipo de tierra en donde se cultiva los agaves, la cepa o cepas presentes en la fermentación y el proceso de elaboración artesanal del Mezcal.

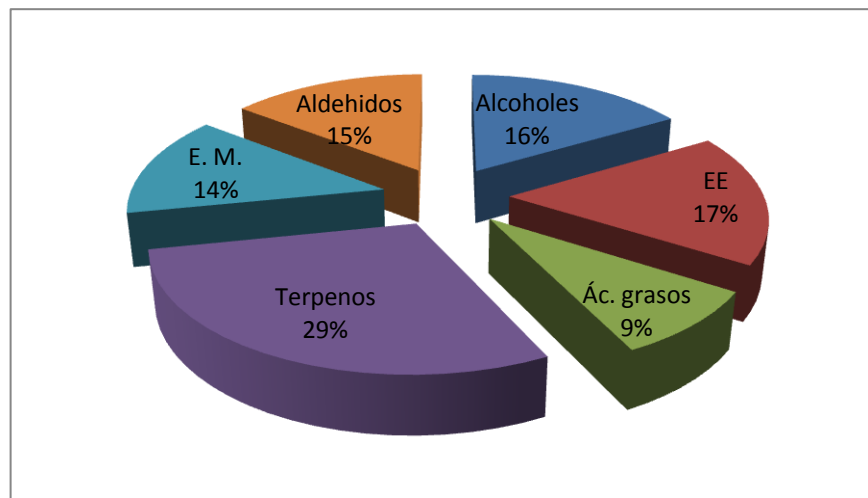


Figura 17. Compuestos mayoritarios en los Mezcales

La distribución general de los compuestos en el Tequila (Figura 18), a diferencia del Mezcal, los ésteres etílicos y los alcoholes son los mayoritarios (22%), siguiendo terpenos 18%, ésteres metílicos 14%, aldehídos y ácidos grasos 12%.

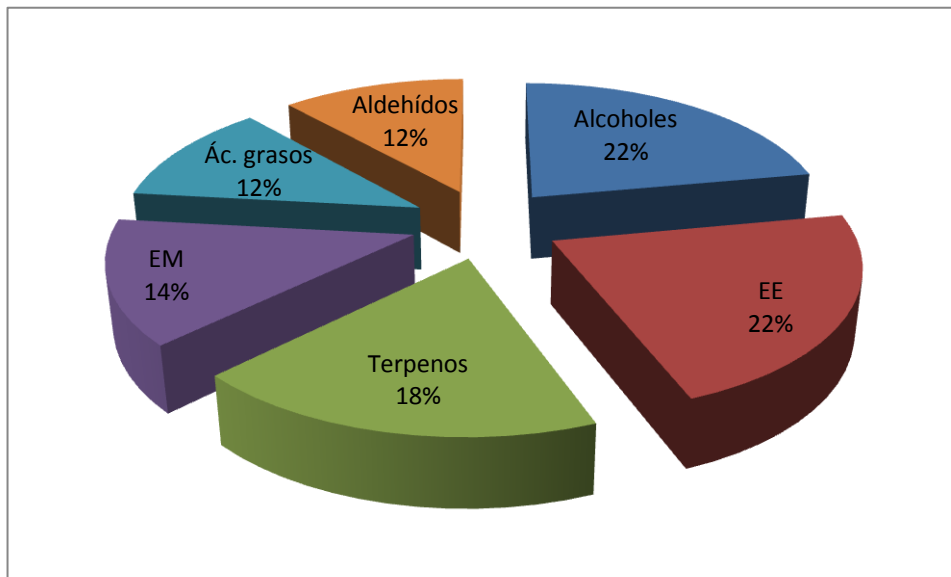


Figura 18. Compuestos mayoritarios en los Tequilas

3.4. Análisis de compuestos en Mezcal

De la Figura 19 a la 23 se muestran los cromatogramas Iónicos Totales y en la Tabla 6 los compuestos identificados de las cinco muestras de mezcal analizadas. De acuerdo a la cantidad de ésteres etílicos (EE) identificados, el Mezcal Real Minero presentó 15 EE, Laguna Seca, Dioseño y Divino 14 EE y Enmascarado 10EE. De estos EE el EE8, EE10, EE18, EE18:2 y EE18:3 son los mayoritarios en todos los mezcales analizados. El segundo grupo mayoritario de compuestos identificados fueron los terpenos; en el Mezcal Laguna Seca y Divino se identificaron 15 terpenos, y de ellos el α -citronelol, nerolidol y eudesmol fueron comunes a ambos. El Dioseño presentó 14 terpenos, Enmascarado 12 y Real Minero 9, todos ellos diferentes. Al comparar el total de compuestos identificados en cada mezcal, se observa que Laguna Seca y Divino presentan un perfil muy similar y la diferencia es el número de ésteres metílicos identificados mientras que

los otros tres mezcales presentan diferente número y tipo de compuestos por lo que sería difícil encontrar una relación entre ellos.

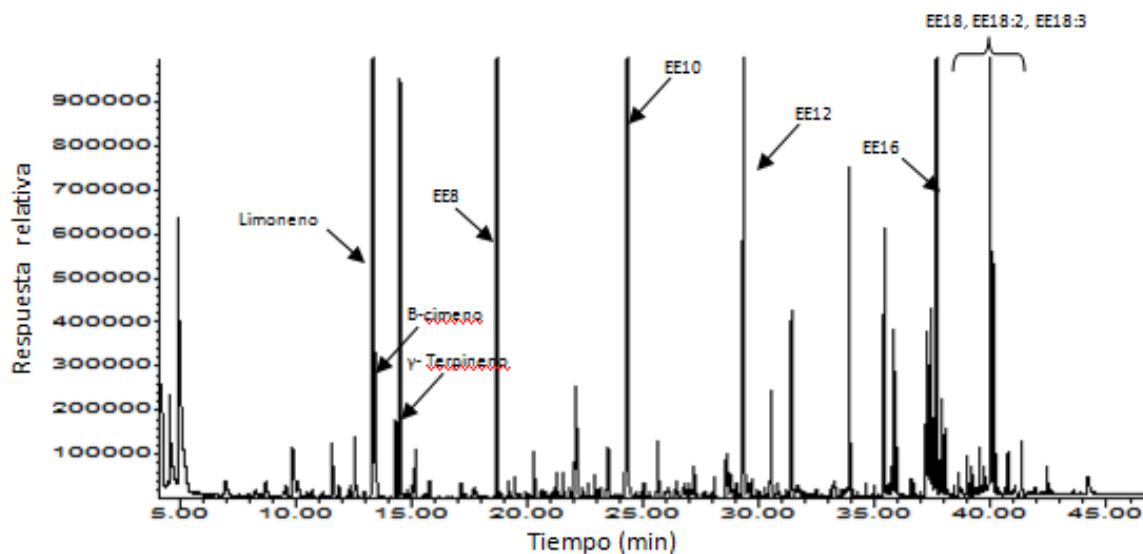


Figura 19. Cromatograma Iónico Total del análisis por SBSES-CG-EM del Mezcal Enmascarado

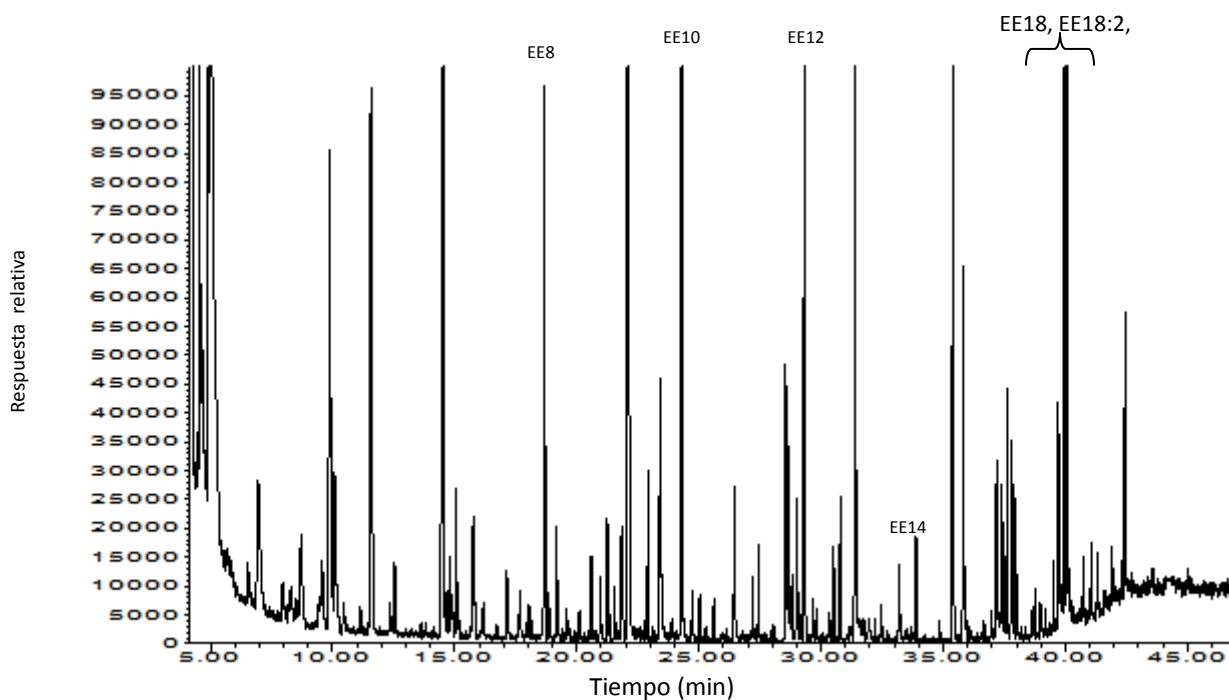


Figura 20. Cromatograma Iónico Total del análisis por SBSES-CG-EM del Mezcal Divino

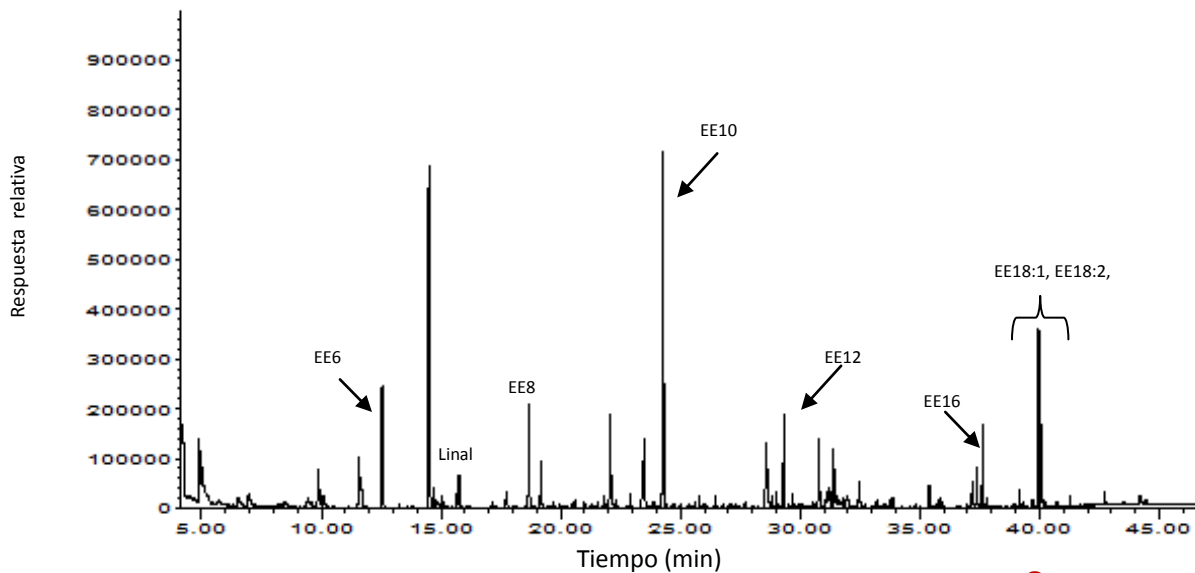


Figura 21. Cromatograma Iónico Total del análisis por SBSES-CG-EM del Mezcal Laguna **Seca**

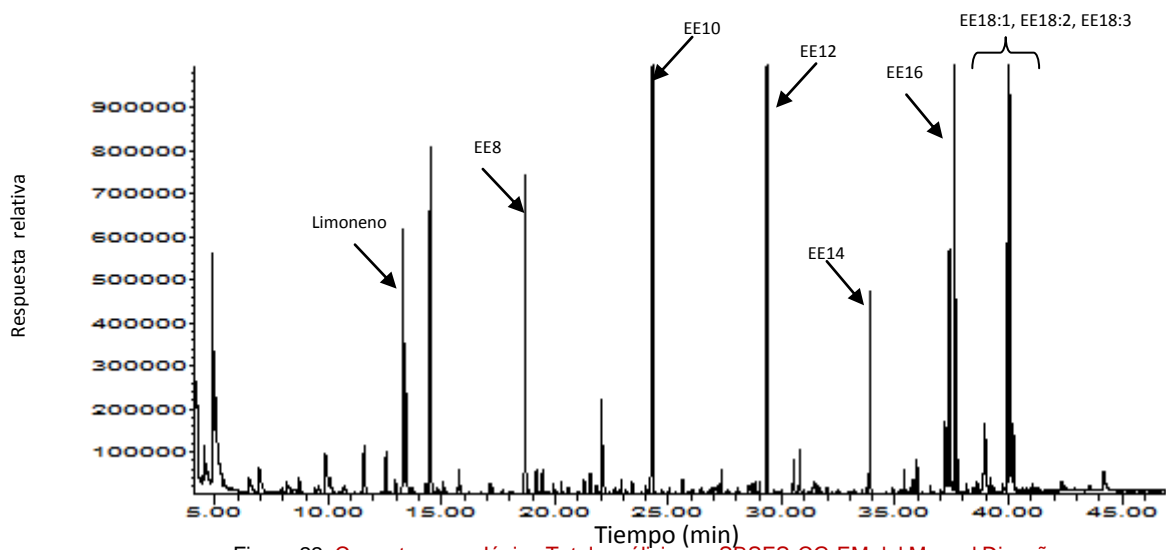


Figura 22. Cromatograma Iónico Total análisis por SBSES-CG-EM del Mezcal Diseño

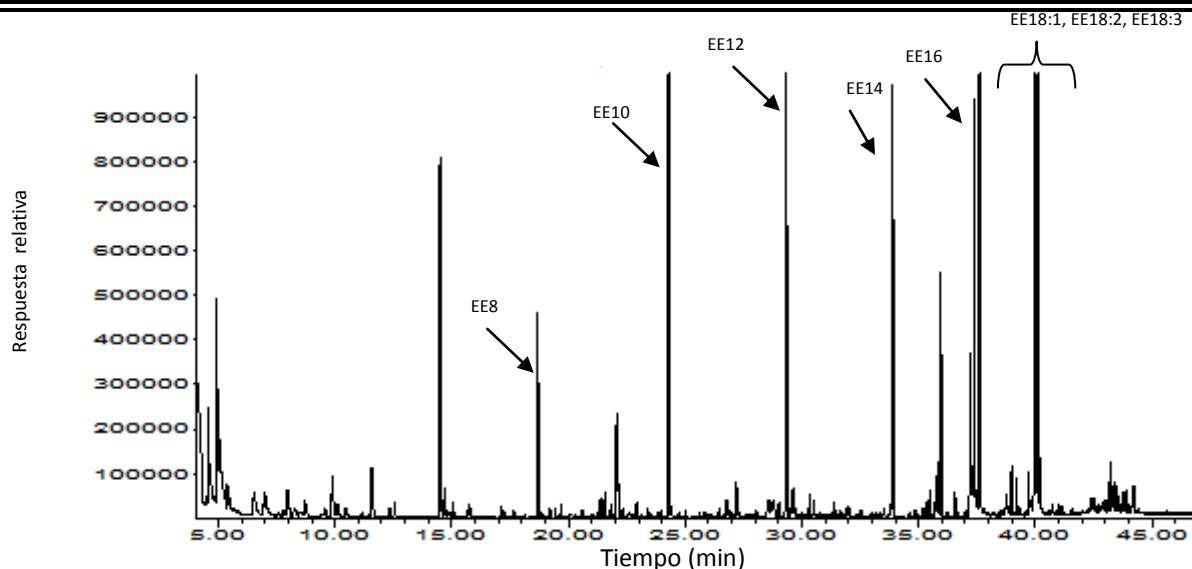


Figura 23. Cromatograma Iónico Total análisis por SBSES-CG-EM del Mezcal Real Minero

3.5. Análisis de compuestos en Tequila

Al igual que en el análisis de mezcal de la figura 24 a la 28 se muestra el cromatograma iónico total y en la tabla 7 los compuestos identificados de las cinco muestras de Tequila blanco analizadas. En este caso, el Tequila Catador y Herradura presentaron 16 EE, Viuda de Romero 12 EE, Orendain 6 EE y Hornitos 2 EE. De estos ésteres etílicos, EE6, EE8, EE10, EE12 y EE16 son los mayoritarios en todos los tequilas analizados. Al igual que en el mezcal, el segundo grupo mayoritario de compuestos identificados fueron terpenos, en el Tequila Catador se identificaron 11, en Herradura 10 y de ellos el cis-2-pinanol, α -terpineol, DL-2,3-dihidro-6-trans-farnesol, α -bisabolol y farnesol, se identificaron en estas dos muestras. El tequila Viuda de Romero presentó 6 terpenos, Orendain 2 y Hornitos 2. En general las cinco muestras analizadas presentaron diferente número y tipo de compuestos por lo que sería difícil encontrar una relación simple entre ellos.

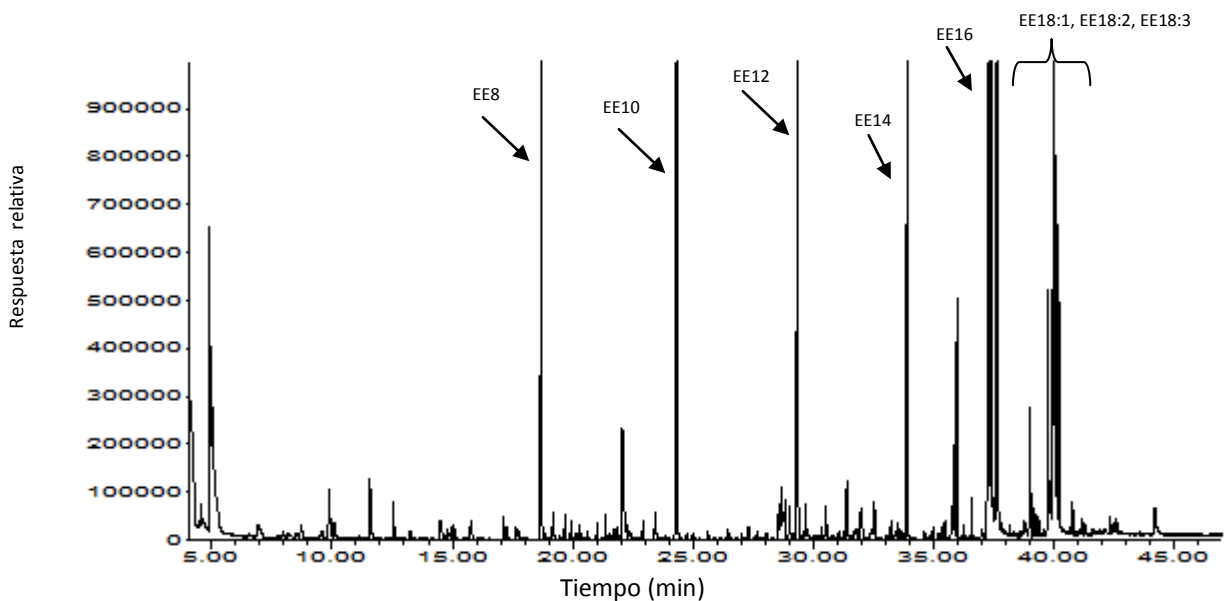


Figura 24. Cromatograma Iónico Total análisis por SBSES-CG-EM del Tequila Herradura

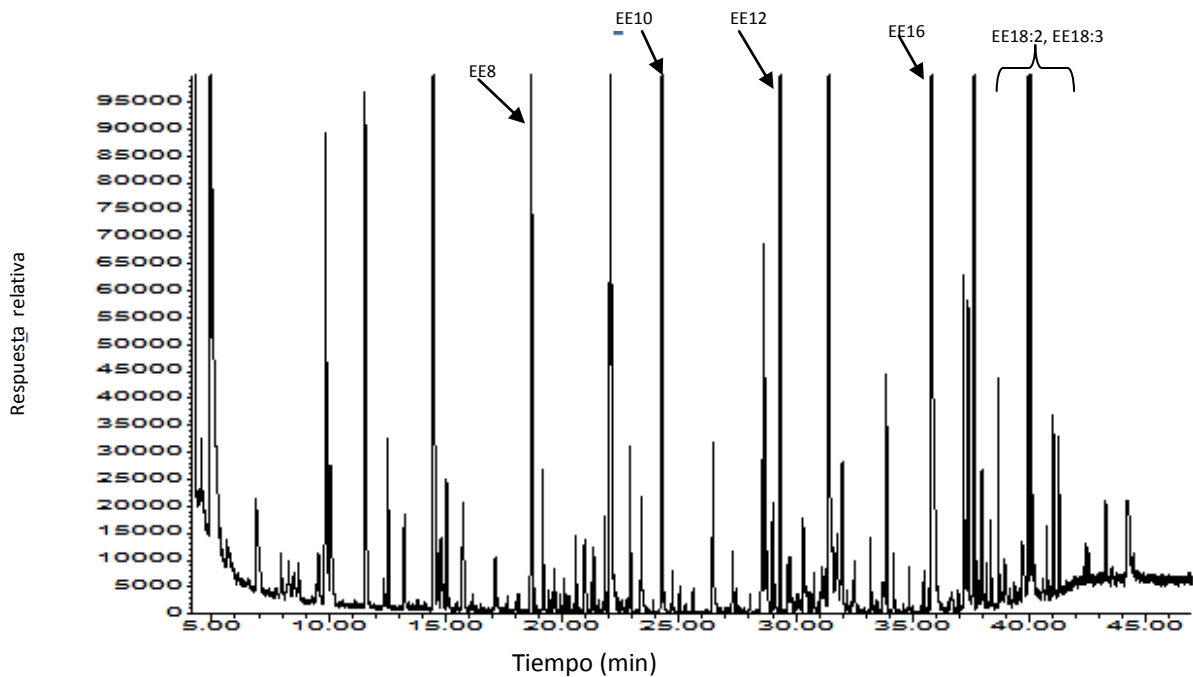


Figura 25. Cromatograma Iónico Total análisis por SBSES-CG-EM del Tequila Catador

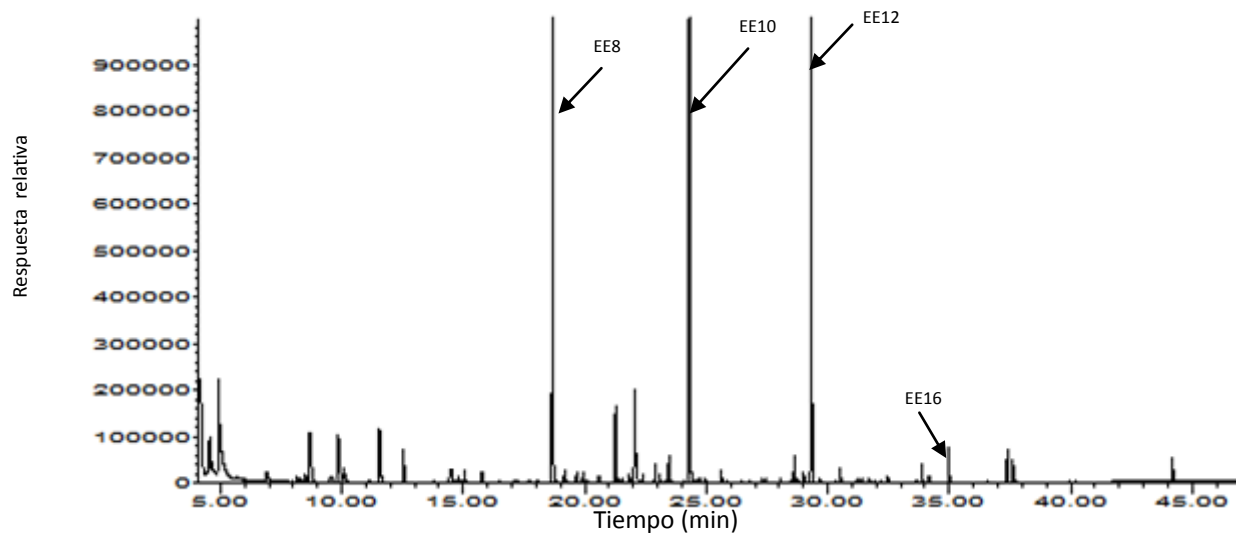


Figura 26. Cromatograma Iónico Total análisis por SBSES-CG-EM del Tequila Hornitos Blanco

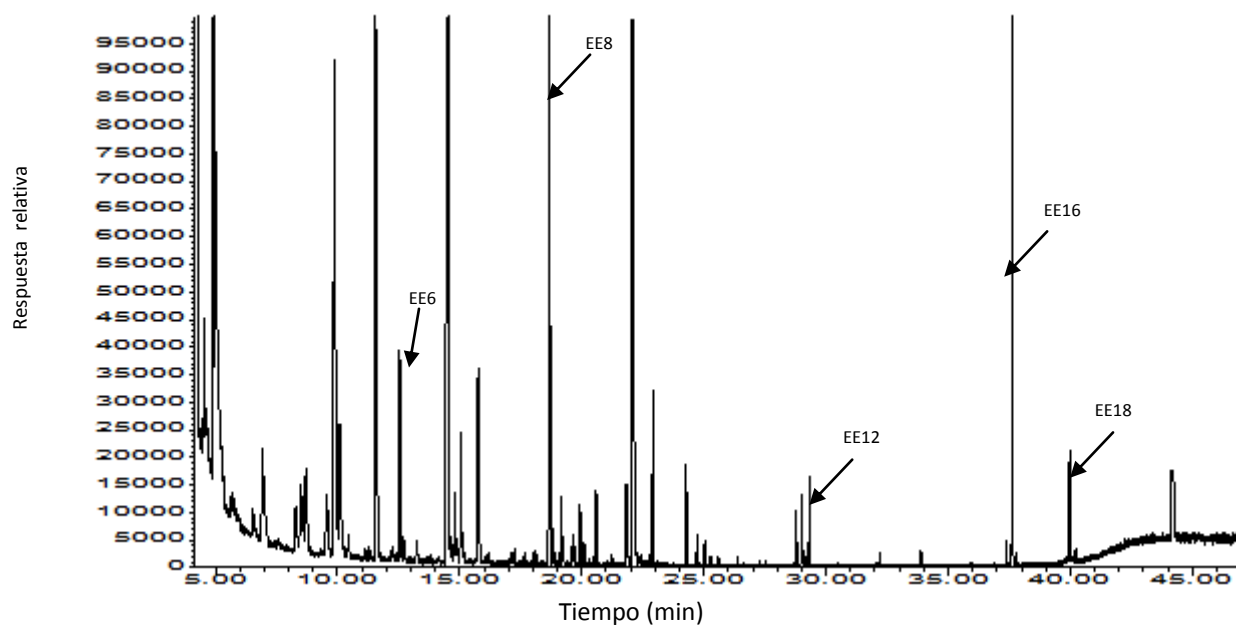


Figura 27. Cromatograma Iónico Total análisis por SBSES-CG-EM del Tequila Orendain

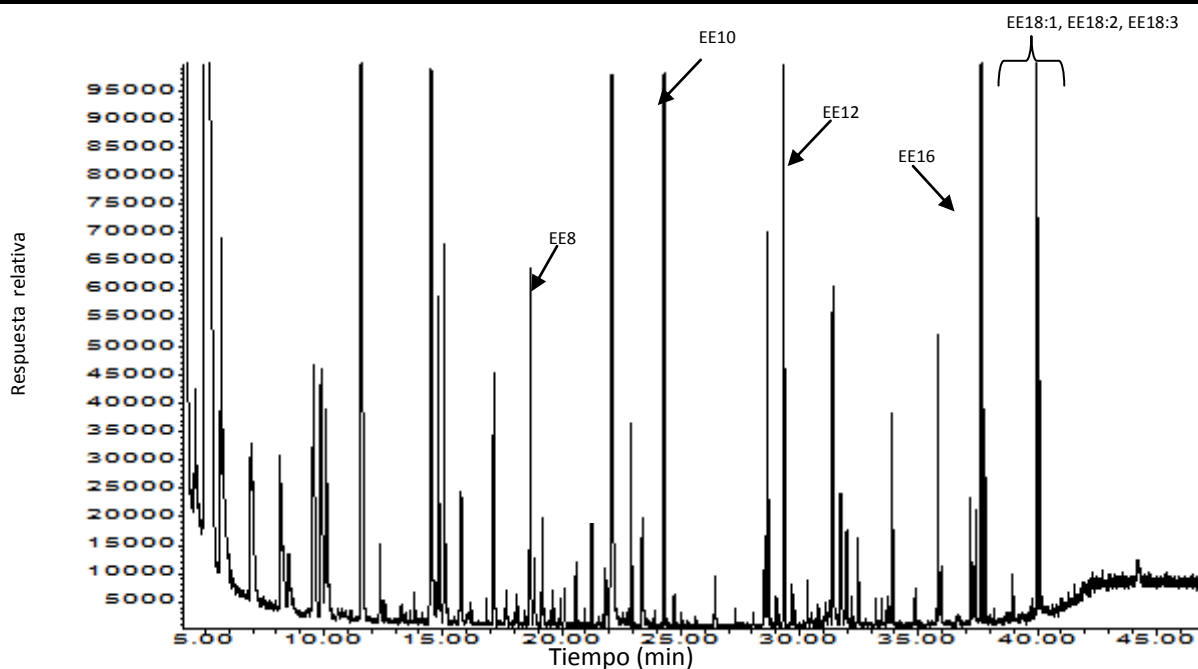


Figura 28. Cromatograma Iónico Total análisis por SBSES-CG-EM del Tequila Viuda de Romero

3.6. Análisis cuantitativo

La Tabla 8 presenta la cuantificación de los ésteres etílicos en el mezcal, en general la mayor concentración de ésteres etílicos mayor fue en el Mezcal Enmascarado con excepción del EE16 y EE18:2 que se encuentran, en mayor cantidad en el Real Minero y EE18 que se encuentra en mayor concentración en el mezcal Dioseño, esto se muestra en las Figuras 15-22; el EE14 solo se cuantificó en Dioseño y Real Minero, siendo mayor en este último (121.2 ± 8.7 ppm). El EE15 solo se cuantificó en Real Minero y su concentración fue de 71.8 ± 3.6 ppm. EE16 se cuantificó en tres muestras, de las cuales el Enmascarado y Dioseño presentaron una concentración similar; 241.1 ± 4.1 y 243.6 ± 7.1 ppm respectivamente, mientras que el Real Minero presenta una concentración de aproximadamente el doble (618.5 ± 34.4 ppm) que en el Enmascarado y Dioseño. El EE18 se cuantificó en todas las muestras, cuantificándose en un rango de concentraciones de 21.8 ppm- 36.1 ppm, siendo este último valor la mayor concentración cuantificada en el mezcal Dioseño. El EE18:2 cuantificado en todas las muestras, presentando la mayor concentración en el mezcal Real Minero con

531.2 ppm y el de menor concentración el mezcal Divino con 37.2 ppm. El EE18:3 se cuantificó en tres mezcales, presentando mayor concentración el Real Minero (122.45±6.18ppm) y menor concentración el Diosesño (96.95±3.8ppm) y Laguna Seca (55.36±2.25 ppm).

Tabla 8. Concentración (ppm) de ésteres etílicos en Mezcal (n=3)

	Enmascarado	Divino	Diosesño	Real minero	Laguna Seca
EE8	247.8±14.0 % c.v. 5.6	6.9±1.0 % c.v. 14.4	69.7±2.1 % c.v. 3.0	47.1±3.9 % c.v. 8.4	49.9±2.4 % c.v. 4.8
EE10	747.2±18.2 % c.v. 2.4	56.6±6.3 % c.v. 11.2	248.9±5.0 % c.v. 2.0	190.1±14.7 % c.v. 7.5	268.5±9.7 % c.v. 3.6
EE12	413.8±9.9 % c.v. 2.3	24.4±1.2 % c.v. 5.0	185.5±3.7 % c.v. 2.0	195.7±14.8 % c.v. 7.5	183.4±8.7 % c.v. 4.7
EE14	NI	NC	59.2±1.7 % c.v. 2.3	121.2±8.7 % c.v. 7.2	NC
EE15	NC	NI	NI	65.2±4.35 % c.v. 6.67	NC
EE16	241.1±4.18 % c.v. 1.7	NI	243.6±7.1 % c.v. 2.9	618.5±34.4 % c.v. 5.5	NC
EE18	22.1±0.8 % c.v. 3.8	19.8±0.8 % c.v. 3.8	36.1±0.8 % c.v. 2.4	24.3±0.3 % c.v. 1.4	21.8±0.6 % c.v. 2.9
EE18:2	235.0±5.2 % c.v. 2.2	37.2±1.1 % c.v. 2.9	154.3±6.26 % c.v. 4.062	531.2±28.1 % c.v. 5.3	124.7±5.8 % c.v. 4.7
EE18:3	NC	NC	96.9±3.9 % c.v. 4	122.4±6.1 % c.v. 5.0	55.3±22.2 % c.v. 4.0

NI: No Identificado NC: No cuantificado

La Tabla 9 presenta la cuantificación de los ésteres etílicos en el tequila, en general; la mayor concentración de ésteres etílicos fueron cuantificados en el tequila Herradura, con excepción del EE8 y EE10 que están en mayor concentración en el Hornitos con 200.6±8.3 y 654.6±78.2 ppm; esto se puede observar en las Figuras 23-27. El EE6 se cuantificó en Hornitos y Orendain este último presentando la mayor concentración (29.2±0.7ppm). EE8 se cuantifico en todas la muestras siendo la muestra de tequila Hornitos en donde se encontró la mayor concentración con 200.6±8.3 ppm; EE10 se cuantifico en cuatro de las muestras, siendo el tequila Hornitos el que presenta la mayor concentración de éste con 654.6±78.2 ppm; EE12 se cuantificó en todas las muestras, cuantificándose las concentraciones más altas en los mezcales Herradura y

Hornitos con 360.3 ± 5.2 y 136.6 ± 20.1 ppm respectivamente. Las concentraciones cuantificadas para el EE14 son bajas (3.75 en Hornitos y 0.7 en Viuda de Romero) con excepción de la cuantificada en Herradura ya que presentó 178.1 ppm, el EE15 sólo se cuantificó en el Herradura presentando una concentración de 62.4ppm, el EE16 se cuantificó en menos de 28 ppm en dos de las muestras, mientras que la mayor concentración se cuantifico en Herradura con 1120.4 ppm, El EE18 sólo se cuantifico en Herradura presentando una concentración de 53.1 ppm. El EE18:2 y EE18:3 solo se cuantificaron en Herradura y Catador siendo Herradura el que presentó mayor concentración de estos el EE18:2 y EE18:3 que no se cuantificaron fue debido a que se encontraban por debajo del intervalo de las curvas de calibración.

Tabla 9. Concentración (ppm) de los compuestos mayoritarios en Tequila (n=3)

	Herradura	Catador	Hornitos	Viuda de Romero	Orendain
EE6	NC	NC	111.3 ± 2.0 % c.v. 1.83	NC	29.2 ± 0.7 % c. v. 2.6
EE8	122.2 ± 6.3 % c.v. 5.2	45.5 ± 7.0 % c. v. 15.5	200.6 ± 8.32 % c.v. 4.1	4.3 ± 0.6 % c.v.14.7	11.9 ± 0.73 % c. v. 6.1
EE10	420.7 ± 12.2 % c.v. 2.9	6.06 ± 7.1 % c.v. 11.8	654.6 ± 78.2 % c.v. 11.9	4.1 ± 0.7 % c. v. 18.2	NC
EE12	360.3 ± 5.2 % c.v. 1.4	31.2 ± 1.1 % c.v. 3.6	136.2 ± 20.1 % c.v. 14.7	4.2 ± 0.3 % c. v. 7.6	1.3 ± 0.1 % c. v. 14.7
EE14	178.14 ± 7.2 % c.v. 4.0	NC	3.7 ± 0.6 % c.v. 17.9	0.7 ± 0.2 % c. v. 38.5	NI
EE15	62.4 ± 3.4 % c.v. 5.5	NC	NI	NC	NI
EE16	1120.4 ± 57.2 % c.v. 5.1	100.8 ± 3.3 % c.v. 3.3.	20.1 ± 0.9 % c.v. 4.5	NC	27.4 ± 0.6 % c. v. 2.3
EE18:1	53.1 ± 4.29 % c.v. 8.7	NC	NI	NC	NI
EE18:2	733.1 ± 4.3 % c.v. 5.9	35.2 ± 1.7 % c.v. 5.0	NI	NC	18.6 ± 0.1 %c.v. 0.8
EE18:3	90.5 ± 5.1 % c.v. 5.6	48.3 ± 4.0 % c.v. 8.4	NI	NC	NI

NI: No Identificado NC: No cuantificado

CONCLUSIONES

Se desarrolló un método analítico utilizando, por primera vez, la extracción con barra magnética (Stir Bar Sorptive Extracción, SBSE) seguida de CG-EM para el análisis de compuestos orgánicos volátiles y semivolátiles en mezcal y tequila.

Se comprobó que la SBSE es una técnica eficiente, que minimiza el contacto de la muestra con el analista y no requiere el uso de grandes cantidades de disolventes para extraer compuestos volátiles y semivolátiles de la muestra.

Debido al tamaño de la capa de polímero que recubre la barra magnética, la cantidad de compuestos extraídos es mayor con respecto a la microextracción en fase sólida (SPME).

Se identificaron en general en mezcal y tequila: alcoholes, ésteres etílicos, ácidos grasos, terpenos, ésteres metílicos y aldehídos entre otros.

El método desarrollado presentó buena precisión ($CV < 10\%$), buena linealidad, en el intervalo de concentración estudiada para ésteres etílicos $r > 0.99$.

Los ésteres etílicos identificados en el mezcal y tequila fueron desde EE6 hasta EE18 siendo EE10, EE12, EE16 y EE18:2 los de mayor concentración en el mezcal y EE10 y EE16 en tequila.

En mezcal y tequila se identificaron terpenos, el mayor número de estos (36) se encontraron en mezcal y en tequila (16).

BIBLIOGRAFÍA

A. Prieto, O. Z. (2007). Development of a stir bar sorptive extraction and thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry method for the simultaneous determination of several persistent organic pollutants in water samples. *Journal of Chromatography A* , 1174, 40-49.

A. Prieto, O. Z. (2008). Simultaneous speciation of methylmercury and butyltin species in environmental samples by headspace-stir bar sorptive extraction–thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* , 1185, 130-138.

Carlo Bicchi, E. I. (1 de Mayo de 2009). LCGC. Recuperado el 5 de Abril de 2011, de LCGC: <http://chromatographyonline.findanalytichem.com>

Carlo Bicchi, E. L. (1 de Mayo de 2009). LCGC. Recuperado el 13 de Junio de 2011, de <http://chromatographyonline.findanalytichem.com>

Escalante-Minakata P, B. H.-R. (2008). identificación de levaduras y bacterias que participan en la fermentación del mezcal Agave salmiana. *Microbiol Lett APPL* , 629 - 638.

Fiore C, J. A. (2005). Comparación entre las levaduras de la uva y los mostos de agave de los rasgos de interés tecnológico. *Mundial de J Microbiol Biotechnol* , 1141 - 1147 .

Frank David, P. S. (2007). Stir Bar sorptive extraction for trace analysis. *Journal of Chromatography A*, 1152, 54-69.

Gross, J. (2004). Mass spectrometry: a textbook . En J. Gross, *Mass spectrometry: a textbook* . New York : Springer.

Gschaedler Mathis A, R. C. (2004). Fermentación :. Etapa clave en la ELABORACIÓN del tequila Ciencia y Tecnología del Tequila, Avances y Perspectivas. (C. d. Jalisco, Ed.) *CIATEJ* , 32 - 120.

Guadalupe, M. V. (2008). *Cuantificación de alcoholes y aldehidos en Mezcal por cromatografía de gases y microextracción en fase sólida seguido de cromatografía de gases*. México: Tesis de licenciatura, Facultad de Química UNAM.

L. Montero, S. C. (2005). Determination of phenols in lake and ground water samples by stir bar sorptive extraction-thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* , 1071, 163-169.

López, M. (1999). Tequila Aroma. *Flavor Chemistry of Ethnic Foods* , 211-217.

M. Kawaguchi, R. I. (2006). *Journal of Pharmacy Biomedical Analytical* , 40-82.

Mancilla-Margalli, N., & López, M. (2002). Generation of Maillard compounds from inulin during the termal processing of Agave tequilana Weber Var. Azul. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 50, 806-812.

Mancilla-Margalli, N., & López, M. (2006). Water-soluble carbohydrates and fructan structure patterns from Agave and Dasyliirion species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 54, 7832-7839.

Mariano García Garibay, A. L.-M. (2004). Bebidas alcoholicas no destiladas. En A. L.-M. Mariano García Garibay, *Boitecnología Alimentaria* (págs. 263-267). México: Limusa.

Martínez, J., & Estrada, M. (2001). La microbiología del mezcal. *Primer Foro de la agroindustria del mezcal de Oaxaca* .

Nair, H. M. (1981). Cromatografía de gases. En H. M. Nair, *Cromatografía de gases* (págs. 3-9). Washington, D.C.: Organización de los Estados Americanos Programa de Desarrollo Cientifico y Tecnológico .

NOM-006-SCFI-2005. (6 de Enero de 2006). *NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-006-SCFI-2005, BEBIDAS ALCOHOLICAS- TEQUILA-ESPECIFICACIONES* . México, México: Diario Oficial de la Federación.

Nykänen, L., & Suomalainen. (1983). Aroma of beer, wine and distilled alcoholic beverages. *D. Reidel Publishing* , 3-17.

P.T., P. (1991). Gas Chromatography/Mass Espectrometry. En P. P.T., *Encyclopedia of Analytical Chemistry* (pág. 157). San Francisco: Dekker.

Peña Álvarez-A, D. L. (2004). Determination of terpenes in tequila by solid phase microextraction-gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography* , 131 - 136.

Quiroz, J. (1997). Orígenes, elaboración y recetas. En *Mezcal* (pág. 43). Mérida, México: Códice Ediciones mexicanas.

Sánchez, D. G. (1993). Cultura y utilización del maguey. En D. G. Sánchez, *Los agaves en México* (págs. 10-22). México: Universidad Autónoma de Chapingo.

Skoog, D. A. (2001). Principios de Análisis Instrumental . En F. H. Douglas A. Skoog, *Douglas A. Skoog* (págs. 537,568-570). España: Mc Graw-Hill.

Tequila, C. R. (s.f.). *Consejo Regulador del Tequila*. Recuperado el 7 de Mayo de 2011, de Consejo Regulador del Tequila: <http://www.crt.org.mx>

VM León, B. Á. (2003). Analysis of 35 priority semivolatile compounds in water by stir bar sorptive extraction–thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry: I. Method optimisation . *Journal of Chromatography A* , 999, 91-101.

Anexo 1

Curvas de Calibración relativas por SBSE-CG-EM

