

005675

2eq.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA**

**CARACTERIZACION DEL TEQUILA  
POR CROMATOGRAFIA DE GASES**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:**

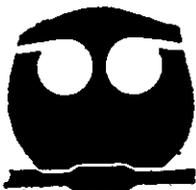
**MAESTRIA EN CIENCIA DE ALIMENTOS**

**(QUIMICA DE ALIMENTOS)**

**P R E S E N T A :**

**Q. A. MARIA DEL CARMEN SANTILLAN VALVERDE**

**ASESOR: M. EN C. SANTIAGO CAPELLA VIZCAINO.**



**MEXICO, D. F.**

**1998**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

248077



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está 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: Dra. Sara Esther Valdés Martínez  
Primer vocal: M. en C. Mariano García Garibay  
Secretario: M. en C. Francisco Rojo Callejas  
Primer suplente: M. en C. María de los Ángeles Valdivia López  
Segundo suplente: M. en C. Fca. Aida Iturba Chiñas

Lugar donde se desarrolló el tema: Laboratorio de Cromatografía de Gases del Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, UNAM.

Asesor del tema:

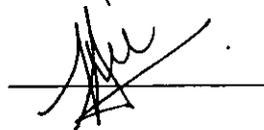
M. en C. Santiago Capella Vizcaino



A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Santiago', is written over a horizontal line.

Sustentante:

Q.A. María del Carmen Santillán Valverde



A handwritten signature in black ink, appearing to read 'María', is written over a horizontal line.

*CON TODO MI AMOR Y ADMIRACION*

*A MI ESPOSO*

*ENRIQUE RUDIÑO PIÑERA*

## AGRADECIMIENTOS

A la empresa "Tequila Herradura", por su colaboración

Al M. en C. Santiago Capella por compartir sus conocimientos y amistad durante el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Sara Valdés por su gran apoyo en el desarrollo de este trabajo.

A los Maestras Angeles Valdivia y Fanny Iturbe, y a los Maestros Mariano García Garibay y Francisco Rojo por sus importantes aportaciones a esta investigación.

A las Maestra Carmen Labastida y a la Dra. Araceli Peña por sus contribuciones en los experimentos de Cromatografía de Gases.

A la Maestra Victoria Coutiño y a las Químicas Mónica Franco y Desiré Quijano por su colaboración en el estudio de Evaluación Sensorial.

Al futuro Dr. en Ciencias Bioquímicas Enrique Rudiño Piñera por su apoyo, comprensión y paciencia durante los últimos tres años.

## INDICE

	Página
<b>RESUMEN</b>	1
<b>INTRODUCCIÓN</b>	2
<b>ANTECEDENTES</b>	3
<b>EL TEQUILA</b>	3
Historia	3
Normatividad y control	6
Elaboración del Tequila	11
<b>ESTUDIOS REALIZADOS EN BEBIDAS ALCOHÓLICAS</b>	13
<b>CROMATOGRAFÍA DE GASES CAPILAR</b>	20
<b>TÉCNICAS PREPARATIVAS</b>	21
<b>PARTE EXPERIMENTAL</b>	26
<b>OBJETIVOS</b>	26
<b>METODOLOGÍA</b>	28
Selección de la técnica de extracción	28
Identificación de compuestos	31
Análisis de muestras comerciales	33
Análisis de azúcares en tequilas	34
Análisis sensorial	36
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	38
Extracción líquido-líquido	38
Microextracción líquido-líquido	40
Extracción en fase sólida	40
Microextracción en fase sólida	42
Identificación de compuestos	48
Estudio de las bebidas comerciales.	54

Identificación de azúcares en tequila	69
Análisis sensorial	70
CONCLUSIONES	78
BIBLIOGRAFÍA	81

i

## NDICE DE TABLAS

	Página
1. Compuestos extraídos en base al tipo de disolvente	38
2. Relación disolvente-muestra y efecto de la fuerza iónica	38
3. Compuestos identificados en las bebidas estudiadas	53
4. Varianza del porcentaje de los ésteres en las muestras	55
5. Valores propios y porciento de varianza de los factores estimados	56
6. Matriz factorial	57
7. Matriz rotada	58
8. Intervalos de las relaciones de los ésteres 16 y 18,2 en todas las muestras	66
9. Presencia de carbohidratos en algunas bebidas alcohólicas	69
10. Definiciones de descriptores	71
11. Referencias que se utilizaron para definir los descriptores	72
12. Pruebas de homogeneidad de la varianza	73
13. Conclusiones del análisis de varianza para cada descriptor	74
14. Pruebas de comparación de medias	77

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
1. Fracción no extraída en función del número de extracciones sucesivas empleando la técnica de ELL	39
2. Relación de áreas de los compuestos mayoritarios eluidos con diclorometano y con acetato de etilo	41
3. Fracción no extraída en función del número de extracciones sucesivas empleando la técnica de EFS	42
4. Relación de áreas de los compuestos mayoritarios extraídos por las dos técnicas (EFS, $\mu$ EFS)	43
5. Efecto del tiempo de extracción	45
6. Efecto de la concentración de NaCl	45
7. Efecto de concentración de etanol	47
8. Número de compuesto extraídos en función de la concentración de etanol	47

9. Cromatograma obtenido de una $\mu$ EFS	49
10.Extracciones sucesivas en la técnica de $\mu$ EFS	50
11.Desviación estándar relativa y absoluta para distintos compuestos (técnica de $\mu$ EFS)	50
12.Compuestos mayoritarios en el tequila 100% agave detectados con la técnica de $\mu$ EFS	52
13.Representación de los pesos de los tres vectores rotados para cada variable	58
14.Proyección de las variables de acuerdo a la matriz rotada (factores 1 y 2)	59
15.Proyección de las muestras de acuerdo a la matriz rotada (factores 1 y 2)	60
16.Proyección de las muestras de acuerdo a la matriz rotada (factores 1 y 3)	60
17.Representación gráfica del éster 18,2 en función del éster 16 para los Tequilas blancos	63
18.Representación gráfica del éster 18,2 en función del éster 16 para los Tequilas reposados	64
19.Representación gráfica del éster 18,2 en función del éster 16 para los Tequilas añejos	64
20.Representación gráfica del éster 18,2 en función del éster 16 para los Tequilas abocados y otras bebidas alcohólicas estudiadas	65
21.Representación gráfica del éster 15 en función del éster 16	67
22.Representación gráfica del éster 18,1 en función del éster 16	67

## CARACTERIZACIÓN DEL TEQUILA POR CROMATOGRFÍA DE GASES

### RESUMEN

En los últimos años se han incrementado notablemente los niveles de producción y exportación de Tequila en México. Este producto está protegido bajo una denominación de origen y una norma oficial, sin embargo, dicha norma no cuenta con especificaciones suficientes tanto para establecer diferencias de composición entre un Tequila y otras bebidas alcohólicas, como entre los distintos tipos y categorías de Tequilas que la misma norma define.

El presente trabajo se realizó con el objetivo de desarrollar una técnica analítica que permitiera identificar compuestos que por su presencia y/o concentración, se pudieran relacionar con el origen del Tequila, es decir determinar a partir de que materia prima se elaboró.

Se evaluaron distintas técnicas preparativas y se seleccionó la Microextracción en fase sólida, ya que presentó ventajas particularmente en cuanto a tiempos de análisis, seguridad y volumen de muestra empleado. Una vez definidas las condiciones de trabajo se realizó un análisis de muestras de tequilas que contaban con la garantía de ser de origen 100% agave, con estas técnicas y dichas muestras se lograron separar por cromatografía de gases capilar (CGC) más de 200 compuestos. Dado el extenso material de análisis se decidió enfocarse solo a la identificación los compuestos semivolátiles, que tenían la particularidad de estar en mayor concentración, éstos fueron identificados tanto por un sistema acoplado de cromatografía de gases con un detector de espectrometría de masas, como por su tiempo de retención con estándares. Finalmente se evaluaron alrededor de 40 tequilas de distintas marcas y tipos, los resultados fueron analizados por un análisis estadístico multivariado. Se encontró que el hexadecanoato de etilo y el  $\Delta^9$ - $\Delta^{12}$ -octadecadienoato de etilo parecen tener relación con la materia prima con la que se elaboran los tequilas, y el último parece disminuir cuando los Tequilas son sometidos a procesos de reposo y añejamiento.

Se realizaron otros análisis paralelos a los mencionados arriba, uno fue la determinación de azúcares residuales en el tequila, y un estudio sensorial que permitió definir un vocabulario para describir al tequila.

# CARACTERIZACIÓN DEL TEQUILA POR CROMATOGRAFÍA DE GASES

## INTRODUCCIÓN

El Tequila es una bebida alcohólica destilada, que se obtiene de la fermentación y destilación del jugo de la piña de una variedad de maguey que recibe el nombre científico de *Agave Tequilana Weber*, variedad azul<sup>(1,2,3)</sup>.

Esta bebida es un producto típico de nuestro país, conocido prácticamente en todo el mundo<sup>(1,4)</sup>. Desde mayo de 1997 está protegido a nivel mundial con una Denominación de Origen<sup>(5,6,7)</sup>.

Independientemente de que el Tequila ya esté a salvo de la competencia desleal de otros países, aún existe el riesgo de fraudes debido a que dentro de la Norma Oficial Mexicana que define a este producto (NOM-006-SCFI-1994), no se establecen análisis que permitan determinar una diferencia entre el Tequila y otras bebidas alcohólicas, ni diferencias entre los diversos tipos de Tequila señalados en dicha norma; por ejemplo, no existe la manera de diferenciar, mediante algún tipo de análisis fisicoquímico, entre el "Tequila 100% agave", que se elabora a partir de agave *Tequilana Weber* únicamente, y el "Tequila" que se puede elaborar hasta con un 49% de azúcares diferentes a los provenientes del agave. Es importante señalar que esta deficiencia no es por negligencia, sino por falta de conocimiento detallado de la composición de la bebida misma.

Curiosamente por publicidad o por moda, el consumo de este producto ha aumentado en últimos años tanto en México como en el extranjero. En los últimos cinco años los volúmenes de exportación de Tequila han ido en orden creciente y se han potenciado en los últimos dos<sup>(8,9)</sup>. Para ilustrar con algunas cifras, en 1997 la producción de Tequila fue de 82.6 millones de litros frente a 31.3 millones de Tequila 100% agave; el volumen exportado de Tequila fue de 58.9 millones de litros (96%) y el de Tequila 100% agave de 2.4 millones de litros (4%), en total 61.3 millones de litros enviados al extranjero, el equivalente

a un 53% de la producción total. La tasa de crecimiento del Tequila en el periodo comprendido de 1996 a 1997 fue de 7%, pero para el Tequila 100% agave fue de 46%<sup>(8,10)</sup>. Esto confirma la tendencia a producir mas Tequila 100% agave<sup>(10)</sup> y la necesidad de asugurar su calidad.

Alrededor de la producción de Tequila se encuentran latentes y en desarrollo varias líneas de investigación, como estudios referentes a los microorganismos participantes en la fermentación, influencia de la materia prima, condiciones de proceso y composición tanto del producto terminado como del producto en diferentes etapas de su elaboración<sup>(12)</sup>.

Este trabajo se enfoca al desarrollo de una técnica analítica que permita conocer la composición del producto con el fin de tener herramientas para establecer una definición, no solamente textual sino química, de las distintas categorías y tipos de Tequila, que en un futuro pueda servir como una herramienta para detectar y de ser posible evitar fraudes; teniendo así un mejor control de este producto, que actualmente representa ingresos importantes para nuestro país.

## **ANTECEDENTES**

### **EL TEQUILA**

#### **Historia**

El Tequila es un aguardiente que se obtiene de la fermentación y destilación del jugo de la piña del Agave *Tequilana Weber*<sup>(1,2,3)</sup>. Se sabe que la palabra Tequila proviene del nombre geográfico, tanto del cerro como de la ciudad del mismo nombre, ubicados en el estado de Jalisco.

Los datos más antiguos que registran la existencia de una bebida llamada Tequila datan de la época prehispánica, aunque hasta la llegada de los españoles es cuando se conoce la técnica de destilación en México y es hasta

1742 donde Don Matías de la Mota y Padilla, en su "Historia de la Conquista del Reino de la Nueva Galicia", habla de distintas bebidas elaboradas con magueyes, entre ellas el pulque y otra denominada "vino mezcal" <sup>(12)</sup>. En 1758, por orden del corregidor de Nueva Galicia, se le conceden tierras a José Antonio Cuervo en la finca de Villaslada, Jalisco, para la recolección del agave y el procesamiento del Tequila. En 1795 José María Guadalupe Cuervo recibió del rey de España Carlos IV la primera concesión para cultivar agave azul, en vez de recolectar el que crecía en el campo, es en ese siglo cuando se inicia la exportación de Tequila a Estados Unidos<sup>(2,12)</sup>. A principios del siglo XIX inician su historia varias casas tequileras, algunas de ellas han perdurado (Cuervo, Herradura, Sauza). En 1887 Lázaro Pérez escribe el primer ensayo técnico sobre el cultivo del mezcal tequilero y la fabricación de aguardiente de agave, donde menciona que este aguardiente se denomina vino-mezcal, vino Tequila o simplemente Tequila<sup>(11)</sup>.

Los vinos de mesa de varios países así como otras bebidas están protegidos con denominaciones de origen que datan de principios de siglo. La industria tequilera de Jalisco inició en 1943 gestiones ante diversas Secretarías de Estado para obtener la exclusividad del nombre "Tequila". El 16 de agosto de 1944 la Secretaría de Salubridad y Asistencia (Oficio Núm. 240/1073) expresó "su conformidad para que el nombre Tequila sea aplicado exclusivamente al aguardiente potable obtenido por destilación de agave que se produce en el Municipio de Tequila y otras regiones del Estado de Jalisco" y pidió a la entonces Secretaría de la Economía Nacional que resolviera el asunto. Sin embargo, esta dependencia no tuvo base legal para actuar en tal sentido, según lo comunicaron 12 años después (oficio Núm. 26187 del 22 de noviembre de 1956) a la Secretaria General de Gobierno del Estado de Jalisco, aunque reconociendo que la palabra Tequila correspondía a las llamadas "designaciones de origen". En 1965 debido al aumento de la participación del Tequila en los mercados internacionales, otros países empezaron a usurpar el nombre, argumentando que se trataba de una denominación genérica, pues ni

siquiera México había protegido el nombre. El 31 de octubre de 1958, México había suscrito el tratado internacional conocido con el nombre de Arreglo de Lisboa, relativo a las denominaciones de origen y a su protección internacional, el cual fue ratificado por la Cámara de Senadores el 28 de diciembre de 1962; la adhesión se depositó el 21 de febrero de 1964 y fue promulgado por el Presidente de la República el 9 de abril de ese año, adquiriendo el carácter de ley constitucional. Fue hasta el 30 de diciembre de 1972 cuando se expidió el decreto que reformó y adicionó la Ley de Propiedad Industrial con el Capítulo X del Título Tercero, relativo a las denominación de origen. Esta disposición fue publicada en el Diario Oficial el jueves 4 de enero de 1973. El 27 de abril, de 1973 la Cámara Regional de la Industria Tequila presentó una solicitud correspondiente ante el Secretario de Industria y Comercio, para que se emitiera la Declaratoria General de Protección a la Denominación de Origen Tequila, esta solicitud fue acordada favorablemente el 22 de noviembre de 1974. Como resultado de esta declaratoria Estados Unidos de Norteamérica fue el primer país en reconocer que el Tequila es un producto distintivo y exclusivo de México que no puede adquirir en ninguna otra parte<sup>(2, 3, 13)</sup>. El 13 de octubre de 1993 se publicó en el diario oficial de la Federación la norma oficial Mexicana NOM-006-SCFI-1993 BEBIDAS ALCOHÓLICAS-TEQUILA-ESPECIFICACIONES y entró en vigor el día siguiente de su expedición<sup>(3,14)</sup>. El día 27 de mayo de 1997 la Unidad Europea reconoce la Denominación de origen del Tequila<sup>(5)</sup>. Finalmente el 3 de diciembre de 1997 se publicó una versión definitiva de la norma oficial mexicana NOM-006-SFCI-1994, BEBIDAS ALCOHÓLICAS-TEQUILA-ESPECIFICACIONES. Donde cita que con motivo de la Declaración General de Protección a la denominación de origen "Tequila", el Estado Mexicano se constituyó como único titular de dicha denominación, en virtud de corresponder a un producto distintivo de México. Otro punto refiere que es preciso proporcionar a los sectores económicos involucrados en la producción y comercialización del Tequila, las herramientas necesarias para

controlar la inocuidad y propiedad sobre el producto que elaboran o comercializan<sup>(6,7)</sup>.

### **Normatividad y control**

A continuación se reproducirán algunas de las definiciones, clasificaciones, especificaciones y métodos de prueba de la NOM-006-SCFI-1994.

### **DEFINICIONES Y CLASIFICACIÓN**

“Tequila. Bebida alcohólica regional obtenida por destilación y rectificación de mostos, preparados directa y originalmente del material extraído, dentro de las instalaciones de la fábrica; derivado de la molienda de las cabezas maduras de agave, previa o posteriormente hidrolizadas o cocidas, y sometidos a fermentación alcohólica con levaduras, cultivadas o no, siendo susceptible de ser enriquecido por otros azúcares hasta en un proporción no mayor de 49%, en la inteligencia de que no están permitidas las mezclas en frío. El Tequila es un líquido que, de acuerdo a su tipo, es incoloro o amarillento cuando es madurado en recipientes de madera de roble o encino, o cuando se aboque sin madurarlo.

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

- Tequila 100% agave o Tequila 100% puro de agave. Es aquel producto que se obtiene de la destilación y rectificación de mostos, preparados directa y originalmente del material extraído, dentro de las instalaciones de la fábrica, derivado de la molienda de las cabezas maduras de agave, previa o posteriormente hidrolizadas o cocidas, y sometidos a fermentación alcohólica con levaduras, cultivadas o no. Para que este producto sea considerado como “Tequila 100% de agave” o “Tequila 100% puro de agave”, debe ser

embotellado en la planta de envasado que controle el propio fabricante, misma que debe estar ubicada dentro de la zona de denominación de origen.

- Tequila. Es aquel producto que proviene de la destilación y rectificación de mostos, en cuya formulación se han adicionado hasta una proporción no mayor del 49% de azúcares distintos a los derivados de la molienda extraídos dentro de las instalaciones de la fábrica, de las cabezas maduras del agave, previa o posteriormente hidrolizadas o cocidas y sometidos a fermentación alcohólica con levaduras, cultivadas o no, en la inteligencia que no están permitidas las mezclas en frío.

Tipos. De acuerdo a las características adquiridas en procesos posteriores a la destilación y rectificación, el Tequila se clasifica en cuatro tipos:

- Tequila blanco. Producto cuya graduación alcohólica comercial debe, en su caso, ajustarse con agua de dilución.
- Tequila joven u oro. Producto susceptible de ser abocado, cuya graduación alcohólica comercial debe, en su caso ajustarse con agua de dilución. El resultado de las mezclas de Tequila blanco con Tequilas reposados y/o añejos se considera como Tequila joven u oro. El Abocado es el procedimiento para suavizar el sabor del Tequila, mediante la adición de uno o más de los siguientes ingredientes: color caramelo, extracto de roble o encino natural, glicerina o jarabe a base de azúcar. El uso de cualquiera de estos ingredientes no debe ser mayor del 1% en relación al peso total que tiene el Tequila, antes de su envasado, la coloración que resulte de este proceso debe ser amarillenta.
- Tequila reposado. Producto susceptible de ser abocado, que se deja por lo menos dos meses en recipientes de madera de roble o encino, cuya graduación alcohólica comercial debe, en su caso, ajustarse con agua de dilución. En mezclas de diferentes Tequilas reposados, la edad para el Tequila resultante es el promedio ponderado de las edades y volúmenes de sus componentes.

- Tequila añejo. Producto susceptible de ser abocado, que se deja por lo menos 1 año en recipientes de madera de roble o encino, cuya graduación alcohólica comercial debe, en su caso, ajustarse con agua de dilución. En mezclas de diferentes Tequilas añejados, la edad para el Tequila resultante es el promedio ponderado de las edades y volúmenes de sus componentes.

## ESPECIFICACIONES

Del producto. El producto objeto de esta NOM debe cumplir con las especificaciones señaladas en la siguiente tabla. De ser necesario para obtener la graduación comercial requerida, se debe usar agua potable destilada o desmineralizada.

### ESPECIFICACIONES FISICOQUÍMICAS DEL TEQUILA

	Tequila blanco		Tequila joven u oro		Tequila reposado		Tequila añejo	
	mínimo	máximo	mínimo	máximo	mínimo	máximo	mínimo	máximo
Porcentaje de alcohol a 20°C	38.0	55.0	38.0	55.0	38.0	55.0	38.0	55.0
Extracto Seco (g/l)	0	0.20	0	0.20	0	0.20	0	0.20
<b>Valores expresados en mg/100 ml referidos a alcohol anhidro</b>								
Alcoholes superiores (en alcohol amilico)(1)	20	400	20	400	20	400	20	400
Metanol(2)	30	300	30	300	30	300	30	300
Aldehidos	0	40	0	40	0	40	0	40
Esteres	2	270	2	270	2	270	2	270
Furfural(3)	0	1	0	1	0	1	0	1
<b>NOTAS</b>								
Nota 1.	Supeditado a un análisis cromatográfico, se puede elevar el parámetro máximo hasta 500mg/100ml.							
Nota 2.	El parámetro mínimo puede disminuir si el productor de Tequila demuestra a satisfacción del organismo de certificación acreditado, que es viable reducir el contenido de metanol mediante un proceso distinto.							
Nota 3.	Supeditado al análisis, vía húmeda, se puede elevar el parámetro máximo hasta 4 mg/100ml.							

Fuente: NOM-006-SCFI-1994.

Del agave. El agave que se utilice como materia prima para la elaboración de Tequila, debe ser maduro, de la especie *Tequilana Weber*, variedad azul, y haber sido cultivado en la región geográfica descrita en la Declaración.

## MÉTODOS DE PRUEBA, RELATIVOS A LA AUTENTICIDAD DEL TEQUILA

Uso de azúcares. El productor de Tequila debe demostrar, en todo momento que el producto no ha sido adulterado en las operaciones unitarias durante su elaboración, particularmente a partir de la formulación de los mostos. La prueba admisible para tales efectos consiste en un balance materias primas y materiales que determinen la participación mayoritaria o total de los azúcares procedentes del agave, así como en el cálculo de eficiencias de cada operación unitaria y del total de las etapas del proceso de elaboración. Por tal motivo, el productor de Tequila debe llevar un registro actualizado de por lo menos, los documentos siguientes:

- a) Facturas de materia prima y de venta de producto terminado;
- b) Fichas de entradas y salidas de materia prima y producto terminado; e
- c) Inventarios, fichas de entradas y salidas de producto sometido a un proceso de maduración.

En ningún momento el productor de Tequila puede elaborar simultáneamente cualquier otro producto en las instalaciones del productor autorizado por la dependencia competente, a menos de que cuente con líneas de producción claramente diferenciadas a juicio del organismo de certificación acreditado y se notifique a ésta dicha circunstancia con la debida anticipación a la fecha de inicio de la producción simultánea de cualquier otro producto distinto del Tequila.

La comprobación de lo establecido en esta NOM se realiza a través de inspección permanente por parte del organismo de certificación de producto acreditado, independientemente que puede ser corroborado por cualquier autoridad federal competente o por una unidad de verificación acreditada.

Este requisito se cumple a través del uso ininterrumpido de sistemas aleatorios de inspección previamente aprobados por la Dirección General de Normas (DGN), los cuales, en su caso, deben por lo menos incluir una huella cromatográfica que permita identificar el Tequila de cada productor y garantice la integridad del producto.

Envasado. El envasador de Tequila debe demostrar, en todo momento, que el producto no ha sido adulterado desde su entrega a granel hasta el envasado final del mismo.

El producto que ostente la leyenda "Tequila 100% agave" o "Tequila 100% puro de agave" debe ser embotellado en la planta de envasado del propio fabricante dentro de la zona de denominación de origen. En caso de que la planta no esté ubicada en las instalaciones de la fábrica, el traslado a granel del producto debe ser supervisado por el organismo de certificación de producto acreditado, o en su caso, por una unidad de verificación acreditada, a través de los mecanismos que previamente apruebe la DGN. Se considera que la planta de envasado es del propio fabricante cuando éste mantiene el control total del proceso de envasado.

Para demostrar que el Tequila no ha sufrido adulteraciones durante el proceso de envasado, deben coincidir las comparaciones de áreas y posición de picos cromatográficos de muestreo, realizados en la planta de envase con los obtenidos en la fábrica proveedora de Tequila.

La comprobación en general de cualquier aspecto relacionado de esta NOM que se le aplique a la actividad de envasado se realiza a través de la inspección por lote que tales efectos lleva a cabo la unidad de verificación acreditada que se contrate para supervisar dicho proceso, independientemente que puede ser corroborado por cualquier dependencia."

De las definiciones dadas en las páginas anteriores, con respecto a lo señalado en la NOM-006-SCFI-1994, se puede decir lo siguiente:

- Existe una clara definición de las distintas categorías y tipos de Tequilas existentes,
- Ni las especificaciones ni los métodos de prueba establecen alguna forma de poder diferenciar, a menos que sea administrativamente, dichas categorías y tipos de Tequila.

Como se mencionó en la introducción las deficiencias de esta Norma Oficial no se deben a negligencias sino al desconocimiento de este producto, por lo que es clara la justificación de realizar investigaciones al respecto que generen conocimientos, que en un futuro puedan servir de base para establecer pruebas claras que permitan diferenciar las categorías y tipos de Tequila y que por que no, sirvan como base para el estudio de otras bebidas alcohólicas, ya que el Tequila no es la única bebida de la cual se carece de información.

### **Elaboración del Tequila**

El proceso de elaboración del Tequila se puede dividir en cuatro etapas básicas:

1. Cocimiento del agave. Al corazón del agave se le llama piña. Una plantación bien cuidada de agaves da piñas de 40 a 100 kg, con un promedio de 90 kg<sup>(11,15)</sup>. En la fábrica las piñas se someten a un proceso de cocción que se puede llevar a cabo en hornos de adobe por 48 horas, en hornos de mampostería por 24 horas o en autoclaves metálicas por 6 horas<sup>(11,15,16)</sup>. El objetivo principal del cocimiento es realizar la hidrólisis de la inulina para obtener la mayor cantidad posible de azúcares fermentables, aunque por las condiciones de este proceso también se presentan otras reacciones como la caramelización de azúcares<sup>(16)</sup>, que dependiendo del grado que alcance la reacción puede tener efectos indeseables en el producto final<sup>(17)</sup>.
2. Extracción de azúcares (Molienda del agave). Primero el agave ya cocido, entra en una máquina desgarradora para ser desfibrado y posteriormente

pasa por prensas para poder exprimir los jugos del agave; para lograr una buena extracción se puede adicionar agua. El jugo obtenido se ajusta normalmente a 14° Brix con el fin de obtener una buena fermentación, lo que da origen al mosto que será sometido a fermentación. Si el Tequila no está destinado a ser 100% agave en esta etapa es cuando se adicionan al mosto azúcares de otros origen y con base en éstos se hace el ajuste de °Brix<sup>(11)</sup>. Desafortunadamente no se encontró documentado como se realiza el ajuste cuando el Tequila será 100% agave.

3. Fermentación. La fermentación dura entre uno y seis días dependiendo de condiciones como: cepas de levaduras seleccionadas, desarrollo de un inóculo previo y la temperatura entre otros<sup>(18)</sup>. No es una etapa que se tenga muy controlada y que varía de empresa a empresa ya que principalmente no se cuenta con una cepa o un cultivo estándar para utilizar como inóculo, y se ha demostrado que la levadura influye de manera importante en los compuestos que se obtienen en el producto final, principalmente se ha observado la influencia sobre el perfil de alcoholes superiores<sup>(18)</sup>. La variedad de inóculos que se utilizan es amplia, incluye desde cepas aisladas y controladas, levadura de panificación, e incluso hay empresas que utilizan el pie de cuba que se encuentra en las tinas o tanques de fermentación<sup>(11,16)</sup>.
4. Destilación. Tiene como objetivo separar el contenido alcohólico y otros componentes responsables del olor y sabor, de las levaduras muertas, azúcares no fermentables, minerales, etc. Se realiza en dos etapas, la primera, conocida como "destrozamiento" o "desflemación" que consiste en separar todo el etanol y otros compuestos del resto de sustancias que componen el mosto muerto. Se obtiene un producto llamado "ordinario" que contiene entre 20 y 30% de etanol v/v<sup>(15,19)</sup>. Esta etapa se realiza en tiempos cortos de 1 a 2 horas en alambiques; pocas empresas lo hacen en una columna desflemadora. La segunda etapa; llamada "rectificación", se realiza

en alambiques destinados solo para esta etapa, aquí el "ordinario" se destila preferentemente en forma lenta, en 4 o más horas, con el fin de obtener alcohol y otros compuestos, se obtiene con una concentración final de alcohol que oscila entre 55 y 76% v/v<sup>(15,19)</sup>. Posterior a la destilación se relacionan operaciones que dependen del tipo de Tequila que se desee obtener, por ejemplo, si el Tequila es blanco se hace un ajuste con agua de la graduación alcohólica final para proceder a embotellarlo; pero si se someterá a un proceso de reposo o añejamiento, antes de pasarlo a barricas el contenido alcohólico se ajusta a 55% v/v.

## ESTUDIOS REALIZADOS EN BEBIDAS ALCOHÓLICAS

Las bebidas alcohólicas se pueden clasificar de diferentes maneras, una de ellas es hacerlo con base en los procesos que se involucran en su elaboración; considerando este criterio el Tequila es una bebida fermentada y destilada, acompañándolo en este grupo se encuentran también el brandy, el cognac, el armagnac, el vodka, el whisky, la ginebra y el ron entre otros<sup>(20,21)</sup>. Así que por analogía se pueden considerar todas las bebidas como de un mismo tipo. Algunos autores llaman a este tipo de bebidas "espirituosas"<sup>(22)</sup>.

El componente que tienen en común todas las bebidas alcohólicas, es el etanol, este es obtenido mediante fermentación donde casi siempre predomina como microorganismo productor la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. El sabor y el aroma de las bebidas alcohólicas está dado en gran parte por este alcohol, sin embargo, gran variedad de compuestos orgánicos presentes en cantidades mucho menores con respecto al etanol son también responsables de estos atributos e intervienen de manera importante en las características que hacen diferentes a las bebidas alcohólicas. Estos compuestos orgánicos son alcoholes diferentes al etanol, carbonilos, ácidos orgánicos, ésteres y

compuestos azufrados, que en conjunto reciben el nombre de "congenéricos"<sup>(20,23)</sup>.

Algunas bebidas se caracterizan por tener diferentes congenéricos, pero en realidad lo que hace la distinción entre productos es la proporción de éstos, ya que en general se encuentran los mismos en todas las bebidas alcohólicas, pero en diferentes cantidades.

El origen principal de los congenéricos es la cepa de la levadura y otros microorganismos que se encuentren presentes durante la fermentación. También la materia prima aporta congenéricos, algunos de los cuales permanecen inalterados durante la fermentación. Otros factores que intervienen en la generación de congenéricos son la temperatura de la fermentación, la concentración de oxígeno en el medio, la naturaleza y concentración de la fuente de nitrógeno, el tipo y concentración de azúcares fermentables, aminoácidos y de algunas vitaminas. Además las operaciones posteriores a la fermentación alcohólica también afectan significativamente las concentraciones y proporciones de los congenéricos, éstas son: fermentaciones secundarias, destilación y añejamiento<sup>(20,24)</sup>. Se han llegado a identificar congenéricos cuya presencia y/o concentración en determinadas bebidas alcohólicas destiladas las caracterizan. Los whiskies presentan mayor contenido de lactonas, y algunos compuestos azufrados que se utilizan para diferenciarlos de otras bebidas, el vodka tiene mayor concentración de compuestos volátiles con nitrógeno, en el ron los compuestos derivados del naftaleno y los ésteres, especialmente los etil ésteres derivados de ácidos de 8 a 16 carbonos<sup>(24)</sup>.

Existen otras sustancias que permiten relacionar a la bebida con su origen y/o con su tiempo de añejamiento. Los alcoholes de terpenos y los fenoles se han empleado para diferenciar el origen de los rones y brandies; los aldehídos en los brandies, dependen de la variedad de la uva y del grado de añejamiento<sup>(25)</sup>. En el whisky se ha relacionado el perfil de alcoholes superiores y algunos compuestos volátiles con su autenticidad, origen y tiempo de añejamiento<sup>(26,27,28,29,30)</sup>.

A pesar de la información que proporcionan todos los estudios mencionados, no se le ha dado continuidad a las investigaciones y en la mayoría de los casos no se ha probado su reproducibilidad.

Los métodos cromatográficos se han utilizado con mucha frecuencia y sobre todo en los últimos años para el análisis de bebidas alcohólicas, ya que siempre se ha relacionado la calidad de éstas con sus características sensoriales, principalmente con el aroma y el sabor. Se han realizado investigaciones empleando diversos métodos químicos, pero en últimos años se ha utilizado más la Cromatografía de gases y la líquida a alta presión<sup>(32,33)</sup>. Se han realizado estudios con sistemas acoplados de Cromatografía de gases con un detector de masas e incluso también se han sugerido sistemas acoplados de cromatografía de fluidos supercríticos con detectores de masas<sup>(34)</sup>, aunque no se encontraron resultados al respecto.

El whisky es la bebida alcohólica destilada que más se ha estudiado, especialmente con el fin de asegurar su calidad y autenticidad<sup>(29,32)</sup>. Se han llegado a establecer clasificaciones de whiskies con respecto a su país de origen<sup>(35,36,37)</sup>, materia prima empleada durante su elaboración<sup>(38,39,40)</sup>, métodos de elaboración<sup>(26)</sup>, grado de añejamiento<sup>(27)</sup>, adulteraciones<sup>(32)</sup>, etc., dentro de una misma marca o de un grupo de marcas, en general tienen el inconveniente de requerir comparar los resultados con una gran base de datos. Particularmente en el caso del whisky se han relacionado métodos cromatográficos con tratamientos estadísticos de análisis multivariado, permitiendo establecer correlaciones de los resultados de cromatogramas y el origen y autenticidad de esta bebida<sup>(35,36)</sup>.

La finalidad de los estudios instrumentales se ha diversificado. Si bien el whisky ha sido la bebida destilada más estudiada, dentro del universo de las bebidas alcohólicas el vino ha sido el más estudiado. En el vino se han estudiado técnicas analíticas, al igual que en el whisky, para conocer su perfil de composición en general<sup>(23,41,42)</sup>, la variedad y tipo de uva con la que se elaboraron<sup>(43,44,45)</sup>, su procedencia geográfica<sup>(46,47)</sup>, su proceso de elaboración y

añejamiento<sup>(48,49)</sup>. En otras bebidas fermentadas como la sidra, se han realizado estudios principalmente para conocer la generación de congenéricos durante su elaboración<sup>(50)</sup>. En la cerveza también se han realizado estudios, pero con objetivos de carácter biotecnológico, mas que de análisis instrumental, ya que es una bebida que se tiene más controlada tanto en su proceso como en los microorganismos que se utilizan para su elaboración.

Se han realizado estudios en otras bebidas destiladas además del whisky y cuyos análisis son interesantes considerar, ya que se encuentran en el mismo grupo que el Tequila. En el ron, los pocos estudios que se han realizado se refieren principalmente a una revisión de su composición en general<sup>(37,51,52)</sup> y a los compuestos que se generan durante su añejamiento<sup>(53)</sup>. Con respecto al Cognac, quizás por ser una bebida con Denominación de origen, sólo se encontraron estudios de hace dos décadas referentes a su composición<sup>(37,54)</sup>. Por otro lado, a el vodka se le han realizado investigaciones para determinar tanto la materia prima con la que fueron elaborados, como su país de procedencia<sup>(31,55)</sup>. En resumen, los estudios que representan mayor importancia para esta investigación, son aquellos donde se ha buscado identificar el origen de la materia prima que se empleó para la fermentación y como se mencionó antes, éstos se han realizado principalmente en whiskies, en vinos, y recientemente en vodka. De manera general al inicio de toda esta serie de investigaciones se proponían diferencias entre perfil de alcoholes superiores, ya que por su concentración eran los mas fáciles de detectar; con el tiempo y el avance en los equipos de cromatografía y técnicas de extracción preparativas, se empezó a plantear la idea de diferenciar por perfiles cromatográficos en general sin detectar compuestos, una de las propuestas mas recientes es la de las relaciones de ésteres etílicos para el caso de los vodkas<sup>(55)</sup>.

El Tequila no se ha estudiado lo suficiente y se carece de información tanto de detalles de su proceso como de su composición; y aunque existen muchas líneas de investigación buscando posibles mejoras, en la materia prima, la elaboración y el tratamiento de desechos<sup>(11,13,16)</sup>, como se mencionó antes, es

de vital importancia conocer lo que se intenta medir o modificar, es decir previo a realizar cambios se debe conocer la composición.

El primer estudio del que se tiene referencia realizado en el Tequila data de 1969 por Manjarrez A y M Llama, donde analizan 15 Tequilas y 8 mezcales por cromatografía de gases en columnas empacadas y reportan el perfil volátil de éstos. Para el Tequila consideran al acetaldehído, formiato de etilo, acetato de etilo, acetal, metanol, etanol y a tres alcoholes superiores<sup>(56)</sup>. La siguiente referencia es de 1980 donde Incitti S. y colaboradores mencionan que el Tequila posee mayor proporción de acetato de etilo y alcoholes superiores, pero de pesos moleculares bajos en comparación con los que presentan otras bebidas alcohólicas de este tipo<sup>(25)</sup>. Recientemente, en 1996, se publicó un trabajo donde se realizó un estudio por cromatografía de gases y análisis sensorial, presentando como resultados el perfil de compuestos de Tequila identificados por espectrometría de masas<sup>(57)</sup>, además de que en ningún momento los autores consideraron si el Tequila era 100% agave o si estaba reposado o añejado, pero de cualquier forma ya se cuenta con un patrón de comparación de los compuestos que puedan ser detectados.

El primer estudio que se plantea con el fin de buscar la certificación de origen de una bebida alcohólica en México, fue el de determinar el origen de los alcoholes en los aguardientes de uva y brandies. Existe una norma desde 1985, que se basa en la determinación de un tipo de isótopos estables de carbono en el producto terminado, por espectrometría de masas<sup>(58)</sup>. Es importante aclarar que este método no se puede aplicar para el Tequila, ya que los isótopos estables de carbono provenientes de sus posibles materias primas caña de azúcar y/o agave, son del mismo tipo. En el caso de la certificación del origen del Tequila también se han realizado investigaciones previas. En junio de 1990 los Laboratorios Nacionales de Fomento Industrial (LANFI) en su Dirección de Química y Materiales, presentaron un Informe técnico a la Dirección de Certificación de la Calidad de la Dirección General de Normas, en el que describen dos técnicas desarrolladas que pudieran ser aplicadas para obtener la

certificación de origen del Tequila, estas consistían en Perfiles Cromatográficos y Análisis Isotópico de Deuterio, la primera técnica se abandonó por falta de medios para el análisis estadístico de datos y la segunda aún se encuentra en desarrollo en el Instituto de Física<sup>(59,60)</sup>.

Es importante mencionar el papel que ha tenido la evaluación sensorial en el análisis de bebidas alcohólicas. En primer lugar cabe destacar que aunque las investigaciones previamente mencionadas han repercutido en el avance del análisis instrumental y en el conocimiento de la composición de las bebidas alcohólicas, muchas se han realizado con el fin de relacionar dicha composición con las características sensoriales tan particulares que presentan éstas.

Es bien sabido que por tradición cultural, desde el inicio de nuestra era o tal vez antes, las características sensoriales de las bebidas alcohólicas han sido factores determinantes para marcar su calidad, un ejemplo muy claro es la famosa "Cata " en vinos o cervezas. Existen esquemas de valoración sensorial desde tiempos antiquísimos. Los romanos tenían uno donde aplicaban una unidad conceptual de color-olor-sabor, (color-odor-sapor), Plinio fue el primero en referirla al vino en el año 50 de nuestra era. Durante la Edad Media (siglo XI), dentro de las reglas de salud de la escuela de Salerno, la fórmula color-olor-sabor (COS) incrementa su importancia y hacia el año de 1070 a ésta se le adiciona el examen de nitidez (niton). La tradición de evaluar mediante esta fórmula fue conservada por los monasterios medievales. Este esquema es válido hoy en día y se le han añadido las sensaciones de la superficie cutánea (calor, dolor), las sensaciones táctiles o de movimiento (duro, pegajoso, liso, aceitoso, áspero) que son transmitidas por el movimiento muscular y que son registradas también en el momento de oler o gustar<sup>(61)</sup>; a todo este grupo de apreciaciones se le ha dado el nombre de Cata o degustación de vinos.

En el campo de estudio de las bebidas alcohólicas las características sensoriales tienen un papel importante. Se han hecho investigaciones netamente sensoriales para tipificar bebidas alcohólicas como el vino en algunos

casos siguiendo dinámicas clásicas de la cata<sup>(62,63,64)</sup> y otras más formalmente apegadas a una logística sensorial<sup>(64,66,67,68,69)</sup>. En cervezas se ha buscado también la tipificación general por métodos sensoriales<sup>(70)</sup>, así como la diferenciación de sabores ale y lager<sup>(71)</sup>. En whisky se han determinado umbrales de identificación de algunos congenéricos<sup>(72)</sup> y se han establecido diferencias sensoriales entre whiskies hechos de malta y whiskies de mezclas<sup>(73)</sup>.

Con respecto a relacionar datos instrumentales con sensoriales, se han determinado sustancias responsables del sabor y olor del whisky vía cromatografía de gases, y se ha correlacionado esta información con datos sensoriales, igualmente se han estudiado factores de temperatura que afectan el sabor en esta bebida<sup>(74,75)</sup>. En el caso de las cervezas gracias a los análisis descriptivos y estadísticos se han podido correlacionar análisis físicos, químicos y sensoriales de la cerveza. En base en estas correlaciones se hizo una clasificación de esta bebida<sup>(76)</sup>. La relación entre análisis fisicoquímicos y sensoriales en vinos ha sido estudiada desde los años cincuentas<sup>(77)</sup>, estos estudios se han perfeccionado con nuevas técnicas fisicoquímicas, estadísticas y con el avance del Análisis Sensorial<sup>(45,46,78,79,80,81)</sup>. También se han realizado este tipo de estudios en bebidas como la sidra<sup>(50)</sup>, ron<sup>(52)</sup> e incluso en el Tequila<sup>(57)</sup>, pero sin llegar a una correlación total y clara.

Es importante señalar que la dificultad principal de relacionar datos sensoriales con datos instrumentales consiste en el hecho de que, por ejemplo un sabor específico no necesariamente está relacionado con un compuesto en particular, pueden ser varios y en una combinación de proporciones muy definida, e incluso un compuesto en particular puede generar sabores distintos dependiendo de la concentración en la que se encuentre, por ejemplo las mercaptopiracinas<sup>(82)</sup>.

## CROMATOGRAFÍA DE GASES CAPILAR

La cromatografía de gases (CG) es una técnica analítica de separación que se basa en la separación de compuestos gracias a las interacciones que presentan entre dos fases, donde una de éstas es la fase móvil, que es un gas y la otra una estacionaria, que es un líquido. En la CG clásica, los componentes de la fase móvil son transportados a través de una columna empacada con un soporte de partículas sólidas cubiertas con fase estacionaria. La CG de alta resolución o capilar (CGC) emplea una columna tubular abierta de sílice fundido con una película de fase estacionaria en la pared interna, el uso de estas columnas ofrece un aumento significativo en la capacidad de separación en comparación con la columnas empacadas convencionales.

La CGC tradicionalmente ha sido empleada para separar: mezclas complejas, componentes con características fisicoquímicas muy similares y mezclas que tienen gran número de compuestos<sup>(83)</sup>. Dadas las características de las bebidas alcohólicas, la CGC es la mas conveniente para analizarla.

Combinar la CG con la espectrometría de masas (CGEM), es probablemente la técnica analítica disponible más completa que existe en el análisis de alimentos actualmente<sup>(84)</sup>. Durante más de 30 años la CGEM ha sido utilizada; durante este tiempo la capacidad del espectrómetro de masas y la reproducibilidad de datos analíticos ha aumentado inversamente con respecto al costo de estos sistemas, un sistema moderno de CGME es capaz de analizar matrices complejas en tiempos cortos<sup>(83)</sup>.

Esta técnica está bien establecida en la ciencia de alimentos y tiene aplicaciones principalmente en el área de seguridad de alimentos, por ejemplo análisis de pesticidas y residuos de drogas<sup>(84)</sup>. Otra área donde ha tenido gran aplicación ha sido en la separación e identificación de compuestos volátiles del sabor de los alimentos y como ya se mencionó esta técnica ha tenido un gran impacto en el análisis de bebidas alcohólicas.

La ventaja de tener la información simultánea de un espectro de masas junto con la separación de los compuestos es de gran ayuda, ya que es posible compararlo con el de un estándar y así se puede tener una identificación certera de los compuestos que se están analizando. Es importante destacar un abuso que ocurre en uso de sistemas CGEM, actualmente con el avance de la tecnología, existen paquetes computacionales que tienen una biblioteca de espectros de masas y que en ocasiones son utilizados como única base para la identificación de compuestos en sistemas CGEM, al hacer esto, existe el riesgo de tener errores en la identificación; puede ocurrir que no exista el espectro del compuesto a identificar en la biblioteca, y que el programa lo relacione con otro que no es, también el error puede tener como origen que la comparación de los algoritmos den una correlación más alta con un espectro de un compuesto que no es el problema y una correlación mas baja con el que realmente es.

A pesar de las ventajas que ofrece la CGC y el sistema CGEM, existen limitantes en el análisis de bebidas alcohólicas destiladas, la mas importante es la concentración en la que se encuentran los congenéricos (ppm o ppb) con respecto a la cantidad de alcohol y agua que hay en las muestras, por lo que se tiene que recurrir a alguna técnica preparativa que permita hacer una concentración de los compuestos eliminando al agua y al etanol; sin duda esta limitante es lo que en el inicio de la historia de este tipo de análisis, presentó mayores problemas.

### **TÉCNICAS PREPARATIVAS**

Las técnicas de extracción de aroma en alimentos están basadas en dos propiedades diferentes de sus constituyentes volátiles: volatilidad y afinidad con disolventes no polares y polímeros. Las destilaciones y las trampas del espacio de cabeza, utilizan la volatilidad de los compuestos para remover selectivamente los compuestos volátiles de la muestra. Las extracciones y adsorciones en polímeros usan su hidrofobicidad para los mismo propósitos.

A continuación se tratarán en cuatro grupos las técnicas que habitualmente se utilizan en el área de alimentos para separar y concentrar compuestos relacionados con el sabor, mas adelante se tratarán las cuatro técnicas empleadas en este trabajo, algunas de ellas aún no se han aplicado mucho en el área de alimentos.

Destilaciones. Históricamente la manera mas común de separar volátiles de alimentos fue dispersar el alimento en agua, calentar a punto de ebullición y colectar el condensado resultante, entonces una segunda separación era requerida para remover el agua de los volátiles. Obviamente el calentamiento puede provocar que la composición de compuestos de interés se modifique y se determine un perfil diferente al que originalmente estaba en la muestra<sup>(84)</sup>. Una alternativa es usar otros métodos que involucran presiones reducidas y temperaturas menores. Sin embargo, por las condiciones con las que se maneja la muestra, siempre existe el riesgo de que se altere su composición original o que se contamine<sup>(85)</sup>.

Extracción con disolventes. Si las diferencias de solubilidad entre la muestra y los disolventes son lo suficientemente grandes, los compuestos pueden ser separados efectivamente. Los disolventes comúnmente utilizados son éter, hexano, pentano e isoctano; el procedimiento se puede realizar en un embudo de separación a temperatura ambiente en "batch" o en un proceso continuo. También, dependiendo de las características de los compuestos que se quieran separar la extracción se puede hacer a temperatura elevada en un extractor Soxhlet. En este tipo de extracción es muy importante cuidar el grado de pureza de los disolventes empleados ya que pueden ser fuente de contaminación.

Una de las innovaciones en el área de extracciones que ofrecen grandes ventajas es utilizar el disolvente en forma gas, mediante extracción con fluidos supercríticos<sup>(84,85)</sup>.

Extracciones por adsorción del espacio de cabeza. La adsorción de compuestos que están en concentraciones muy bajas en el espacio de cabeza de la muestra, ha sido una técnica de separación común en análisis de alimentos. Esta técnica que a veces es llamada "Análisis dinámico del espacio de cabeza" o "Método de purga y trampa", representa un avance en el análisis directo del vapor en equilibrio que está sobre la muestra. Este análisis involucra comúnmente la adsorción de moléculas arrastradas por un gas inerte en un polímero orgánico, que sirve como concentrador de estos compuestos que posteriormente serán desorbidos en el Cromatógrafo.

Técnicas de extracción utilizadas en este trabajo:

Extracción líquido-líquido (ELL). Tradicionalmente, el análisis del sabor de bebidas alcohólicas ha sido realizado por una ELL, con un disolvente de bajo punto de evaporación, siguiendo una concentración y finalmente una inyección a un sistema GCEM. Como ya se mencionó, para este tipo de extracción se sugieren diversos disolventes como éter, hexano, pentano e isoctano, pero se han utilizado para el análisis de bebidas alcohólicas otros como mezclas de disolventes un azeótropo pentano:diclorometano (2:1)<sup>(54)</sup>; recientemente se han utilizado otros como el triclorofluorometano (freon 11), n-pentano, tricloro-1,2,2-trifloroetano (freon 113)<sup>(66)</sup>, sobre todo para el análisis de los compuestos más volátiles. Para el análisis de volátiles y semivolátiles se ha probado el diclorometano obteniéndose buenos resultados en Tequila<sup>(57)</sup> y en vino<sup>(67)</sup>.

Microextracción líquido-líquido ( $\mu$ LL). Es una técnica de extracción donde se utilizan volúmenes pequeños de disolvente contra volúmenes grandes de muestra, con el fin de obtener una concentración alta de los compuestos a determinar. Existe un estudio donde se probó para analizar la fracción más volátil en vinos<sup>(68)</sup>.

Extracción en fase sólida (EFS). Es una alternativa más cómoda, rápida y en ocasiones mas barata que la extracción líquido-líquido, ya que se reduce significativamente el uso de disolventes orgánicos, durante la fase preparativa. Las ventajas principales que ofrece la EFS sobre la ELL es la disminución en el volumen de uso de disolventes, poder concentrar en volúmenes pequeños los componentes que originalmente se encuentran a nivel de trazas y por consiguiente poderlos detectar más fácilmente. La EFS se ha utilizado en análisis de vinos para analizar fracciones semivolátiles<sup>(88)</sup>.

Microextracción en fase sólida ( $\mu$ EFS). A pesar de las ventajas mencionadas de EFS sobre la ELL, en ocasiones es una parte del análisis preparativo que consume bastante tiempo y se mantiene la necesidad de tener distintos blancos ya que el uso de disolventes aunque se disminuye, no desaparece<sup>(89,90)</sup>. Con el fin de abatir estos inconvenientes se ha desarrollado en años recientes una nueva técnica de extracción que se realiza prácticamente en un solo paso y elimina el uso de disolventes completamente<sup>(55,89,90)</sup>; el nombre de esta técnica consiste en una fibra de sílica fundida, cubierta con una fase estacionaria, la cual puede ser de diferentes tipos, dicha fibra se encuentra detenida por un soporte parecido a una jeringa. La manera de utilizarla es muy simple, la fibra se sumerge directamente en la muestra que se encuentra dentro de un vial sellado, se deja ahí un tiempo determinado dependiendo de cuanto tarde en realizarse el equilibrio de adsorción, también se puede utilizar para adsorber compuestos volátiles del espacio de cabeza, eliminando el uso del equipo clásico de purga y trampa y el de análisis dinámico del espacio de cabeza<sup>(91)</sup>. El último paso es colocar esta fibra dentro del inyector del equipo de gases a una temperatura determinada para poder desorber los analitos.

Inicialmente el desarrollo de estas fibras se realizó ligado a la aplicación del análisis de compuestos orgánicos en aguas <sup>(90)</sup>, pero en referencias de los últimos tres años se reportan aplicaciones dentro del campo de investigación y análisis de alimentos, como es el caso del análisis general de sabores<sup>(92,93)</sup>, en la

determinación de cafeína en bebidas<sup>(94)</sup>, para el estudio del desarrollo de productos de reacciones de Maillard<sup>(95)</sup>, en el análisis de compuestos volátiles en quesos y en los últimos dos años también se ha probado para investigar sobre los sabores que imparte el corcho a los vinos<sup>(96)</sup>, también se ha probado para la caracterización de vodkas<sup>(55)</sup>, en este último trabajo los autores proponen una caracterización del origen de algunos vodkas con base en su perfil de esterés etílicos de ácidos grasos. Cabe señalar que de acuerdo la bibliografía consultada y a experimentos realizados, esta técnica tiene un potencial importante en el análisis de bebidas alcohólicas.

## PARTE EXPERIMENTAL

### OBJETIVOS

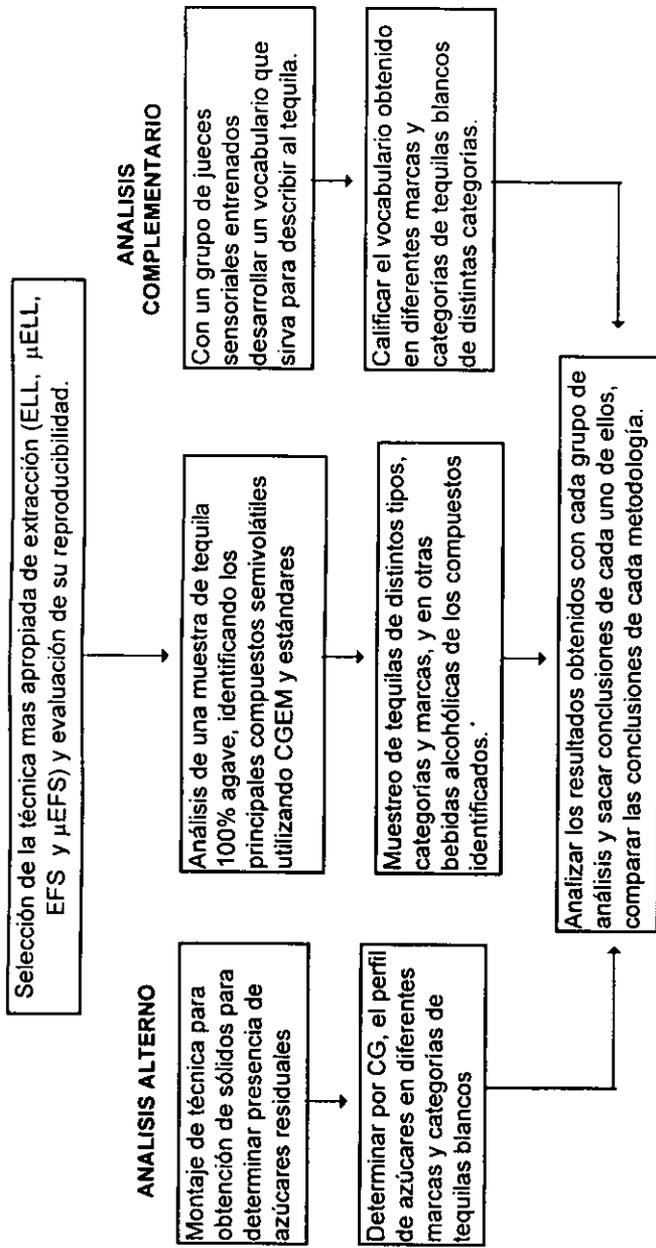
#### OBJETIVO GENERAL

- Desarrollar un esquema analítico que permita identificar compuestos en el Tequila, que por su presencia y/o concentración se puedan relacionar con la materia empleada en su elaboración, con el fin de establecer diferencias entre Tequilas y Tequilas 100% agave.

#### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar distintas técnicas preparativas de extracción para determinar cual es la más apropiada para el análisis del Tequila.
- Identificar instrumentalmente compuestos que por su presencia y/o concentración permitan caracterizar al Tequila.
- Establecer diferencias en la composición de Tequilas con base en la materia prima con la que se elaboraron (Tequilas y Tequilas 100% agave).
- Estudiar el perfil de azúcares residuales en el Tequila y determinar si existe alguna relación entre los azúcares presentes y el tipo de materia prima empleada en la elaboración de la bebida.
- Desarrollar una metodología sensorial descriptiva que permita establecer si existen diferencias sensoriales entre Tequilas y Tequilas 100% agave.

## DIAGRAMA DE BLOQUES



## METODOLOGÍA

A continuación se hará una descripción de toda la metodología en orden cronológico de acuerdo con el diagrama de bloques expuesto en la parte anterior. En cada una de las partes se mencionará tanto el equipo como los reactivos que se utilizaron.

### SELECCIÓN DE LA TÉCNICA DE EXTRACCIÓN

#### Extracción líquido-líquido (ELL):

- ◆ Se evaluó el uso de diferentes disolventes recomendados por la bibliografía, estos fueron: diclorometano, tetracloruro de carbono y un azeótropo pentano-diclorometano (2:1). Todos los disolventes utilizados fueron grado analítico de la marca Baker.
- ◆ Se trabajó con diferentes relaciones de disolvente:muestra.
- ◆ Se observó la influencia de la fuerza iónica utilizando cloruro de sodio grado analítico (Marca Baker).
- ◆ Finalmente en esta etapa se analizó el agotamiento de la muestra mediante un sistema de extracciones múltiples.
- ◆ Todas estas determinaciones se hicieron con un volumen total de 10 ml (disolvente más muestra) en un embudo de separación de 30 ml.

#### Microextracción líquido-líquido ( $\mu$ ELL):

- ◆ Aquí únicamente se evaluó su posible uso para alcanzar los objetivos de este trabajo determinando la relación de disolvente:muestra necesarios utilizando el disolvente elegido en la ELL.
- ◆ Se trabajó con un embudo de separación especial para  $\mu$ ELL con una capacidad de 250 ml.

### Extracción en fase sólida (EFS):

- ◆ Se utilizó un fase reversa de octadecil (C18), y se probaron en columnas (de 5 ml de capacidad) y discos (45 mm de diámetro), ambos marca Supelco, para determinar con cual se obtenían mejores resultados. Se trabajó en ambos casos con diferentes volúmenes de muestra.
- ◆ En base a las recomendaciones hechas en la bibliografía y a los resultados de los experimentos de las ELL se decidió usar el diclorometano como disolvente de desplazamiento, también se probó el acetato de etilo y mezclas de diclorometano:acetato de etilo (1:1), ambos disolventes grado analítico de la marca Baker.
- ◆ Se trabajó en un equipo de extracción de fase sólida con capacidad para un litro marca Supelco.
- ◆ Se estudió al igual que en la ELL un sistema de extracciones sucesivas para observar en que momento se conseguía el agotamiento de la muestra.
- ◆ La técnica utilizada para la extracción fue la siguiente:
  - Acondicionar la fase sólida con metanol (grado analítico, marca Baker) y con una solución de etanol (grado analítico, marca Baker) en agua (grado cromatografía de líquidos de alta resolución) al 8%. Se utilizaron 5 ml en el caso de las columnas y 10 ml en el caso de discos de cada uno.
  - Pasar la muestra diluida (con una concentración final de etanol del 8 %).
  - Eluir con diclorometano, o acetato de etilo o diclorometano:acetato de etilo (1:1), 5 ml en el caso de la columna y 10 ml para el disco. (Como se observaron mejores resultados con el disco la columna solo se probó con el diclorometano).
  - Secar la muestra con sulfato de sodio anhidro (grado analítico marca Baker).
  - Cuando se utilizó disco se evaporó la muestra con nitrógeno gaseoso hasta 2 ml.

#### Microextracción en fase sólida ( $\mu$ EFS):

- ◆ Se determinó el tipo de fibra a utilizar, se probaron tres variaciones de la fase polidimetilsiloxano, 7, 38 y 100  $\mu$ M (marca Supelco).
- ◆ Se estableció el tiempo necesario de desorción de la fibra.
- ◆ Se comparó el número de compuestos extraídos del espacio de cabeza y de la inmersión de la fibra en la muestra.
- ◆ Realizando la extracción con la fibra sumergida en la muestra se observó la influencia de:
  - El volumen de la muestra (siempre utilizando un vial con una capacidad de 8 ml).
  - La concentración de la muestra probando distintas diluciones de la muestra en agua.
  - La influencia de la fuerza iónica del medio probando distintas concentraciones de cloruro de sodio
  - Temperatura
  - Tiempo de extracción
  - El agotamiento de la muestra, mediante extracciones sucesivas.

Todos las determinaciones correspondientes a la selección de la técnica de extracción, se hicieron en el equipo y bajo las condiciones que a continuación se enuncian:

Cromatógrafo 5890A Hewlett Packard con un detector de ionización de flama.

Integrador Hewlett Packard 3396 A

Columna capilar SP1000 de 30m x 0.32 mm x 0.25  $\mu$ m.

Flujos: Split 30 ml/min, Purga 4.2 ml/min

En detector: Nitrógeno 30.0 ml/min, Hidrógeno 33.8 ml/min y Aire 315 ml/min.

Volumen de inyección 1  $\mu$ l.

Purga activada al tiempo cero, en caso de la extracción en fase sólida

Purga activada a 1 minuto, en caso de la microextracción en fase sólida

Temperatura de inyección de 200°C

Temperatura del detector a 220 °C

Programa de temperaturas:

Temperatura inicial 60°C

Tiempo inicial 2 min

Temperatura final 220°C

Tiempo final 30 min

Velocidad de Calentamiento 15°C/min

Temperatura máxima

220°C.

La selección de la mejor técnica de extracción se realizó considerando el número de compuestos extraídos en cada una, también se tomó en cuenta cual utilizaba menor cantidad de tiempo y muestra.

## IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS

Con la técnica elegida,  $\mu$ EFS, y las condiciones determinadas, se utilizó un Cromatógrafo de Gases con un detector de Espectrometría de masas acoplado con las mismas características y con condiciones iguales a las mencionadas arriba.

- ◆ Inicialmente se analizó el perfil total de compuestos, pero como se trataba de un gran número (más de 200), se decidió identificar sólo los compuestos que se encontraban en mayor concentración y que eran semivolátiles, ya que aunque con la técnica de extracción elegida se eliminaba considerablemente la relación de etanol con respecto al resto de los compuestos, éste seguía siendo aproximadamente el 90% del total de la muestra que se inyectaba y además por las características de funcionamiento del sistema CGEM, fue imposible determinar los compuestos más volátiles, es decir, los que eluyen en la proximidad del etanol.

- ◆ Hasta este momento se había trabajado con las condiciones mencionadas arriba, pero dadas las características de los compuestos buscados se decidió hacer un cambio de columna a una menos polar para disminuir el tiempo de análisis y observar si existían compuestos más pesados. Así que se cambiaron las condiciones a las siguientes (la fibra se cambió de 100  $\mu\text{m}$  a 38  $\mu\text{m}$ ):

Cromatógrafo 5890A Hewlett Packard con un detector de ionización de flama., (Análisis cuantitativo).

Integrador Hewlett Packard 3396 A

Cromatógrafo 5890A Hewlett Packard con un detector de Espectrometría de masas 5971, (Análisis cualitativo)

Columna capilar DB5 de 30m x 0.25 mm x 0.25  $\mu\text{m}$ .

Flujos: Split 30 ml/min, Purga 4.0 ml/min

En detector: Nitrógeno 31.6 ml/min, Hidrógeno 30.0 ml/min y Aire 400 ml/min.

Purga activada a 1 minuto, tiempo de desorción de la fibra 1 minuto.

Temperatura de inyección de 250°C

Temperatura del detector a 300 °C

Programa de temperaturas:

Temperatura inicial 40°C	Tiempo inicial 1 min
Temperatura final 300°C	Tiempo final 5 min
Velocidad de Calentamiento 15°C/min	Temperatura máxima 320°C.

- ◆ Con el sistema CGEM, se identificaron los 12 compuestos principales y se procedió a compararlos con estándares. Debido a que no se contaba los estándares de dichos compuestos (todos ésteres etílicos de ácidos grasos), se sintetizaron éstos, a partir de sus correspondientes ácidos grasos (todos marca SIGMA), mediante la siguiente técnica:

- Pesar en un vial de reacción de 1 a 5 mg del ácido graso

- Adicionar 2 ml de una solución de ácido clorhídrico (grado analítico, marca Baker) en etanol 0.5 N anhidro y 0.25 ml de benceno (grado analítico, marca Baker).
  - Calentar a reflujo durante 0.5 horas.
  - Enfriar a temperatura ambiente y lavar con 5 ml de agua destilada.
  - Extraer con 2 ml de isooctano (grado analítico, marca Baker).
- ◆ Con base en los espectros de masas generados y a los tiempos de retención obtenidos se identificaron 12 ésteres etílicos de ácidos grasos en muestras de Tequilas blancos 100% agave.

## ANÁLISIS DE MUESTRAS COMERCIALES

Como un análisis preliminar, se buscaron los ésteres etílicos de ácidos grasos en algunas muestras de Tequila blanco de distintas categorías y otras bebidas alcohólicas destiladas, como rones y aguardientes, se observó que había diferencia tanto en la presencia como en la concentración de los compuestos buscados.

Se analizó el perfil de ésteres etílicos de ácidos grasos en las muestras que se mencionan adelante, utilizando como estándar interno el nonanoato de etilo para normalizar las áreas y comparar la proporción de ésteres.

Muestras que garantizaban ser de origen 100% agave:

- 4 Tequilas blancos
- 2 Tequilas reposados
- 2 Tequilas añejos

Muestras comerciales de las cuales no se tenía garantía alguna de origen:

- 3 Tequilas blancos que declaraban ser 100% agave
- 4 Tequilas blancos
- 9 Tequilas reposados que declaraban ser 100% agave
- 9 Tequilas reposados
- 4 Tequilas añejos

- 4 Tequilas abocados
- 1 aguardiente de caña
- 1 ron blanco nacional
- 1 ron añejo de Jamaica
- 1 ron añejo de Puerto Rico
- 1 brandy nacional
- 1 "Bacanora de Sonora" (Bebida fabricada a partir de agave silvestre de Sonora<sup>(4)</sup>).

## ANALISIS DE AZUCARES EN TEQUILAS

Como técnica alterna se diseñó una a través de la cual se buscó de manera cualitativa, glucosa, fructosa y sacarosa en algunas muestras de Tequilas blancos y de aguardientes de caña. (Los azúcares que se utilizaron como estándares fueron de la marca Sigma.) La técnica utilizada se describe a continuación:

Para obtener los sólidos:

- ◆ Destilación de un litro de muestra
- ◆ Liofilización de la fase acuosa hasta sequedad.

Derivatización de los azúcares (técnica tomada de la referencia 97):

- ◆ Pesar de 5 a 30 mg de muestra en un vial de reacción
- ◆ Adicionar 500  $\mu$ l de una solución al 2.5% de clorhidrato de hidroxilamina en piridina y agitar.
- ◆ Calentar a 80°C por 15 minutos y dejar enfriar a temperatura ambiente.
- ◆ Adicionar 450  $\mu$ l de Hexadimetilsiloxano y 50  $\mu$ l de ácido trifluoroacético.
- ◆ Calentar a 80°C por 15 minutos y dejar enfriar a temperatura ambiente.
- ◆ Destapar el vial para evaporar el  $\text{NH}_3$ .
- ◆ Enfriar a temperatura ambiente y evaporar con Nitrógeno gaseoso.

- ◆ El derivado que se obtiene es una trimetilsilil oxima del azúcar que se redisuelve en 5 ml de isooctano para poder analizar por cromatografía de gases.

Las condiciones del equipo con las que se trabajó en este análisis fueron las siguientes:

Cromatógrafo 5890A Hewlett Packard Series II con un detector de ionización de flama, con un sistema de inyección "Dentro de la columna"

Integrador Hewlett Packard 3396 A

Columna capilar SP54 de 10m x 0.25 mm x 0.25  $\mu$ m.

En detector: Nitrógeno 30.5 ml/min, Hidrógeno 30.0 ml/min y Aire 310 ml/min.

Volumen de inyección 1  $\mu$ l.

Temperatura de inyección de 40°C

Temperatura del detector a 350 °C

Programa de temperaturas :

Temperatura inicial 40°C	Tiempo inicial 0 min
1ª Velocidad de Calentamiento 15°C/min	
2ª Temperatura 150°C	Tiempo final 0 min
2ª Velocidad de Calentamiento 4°C/min	
3ª Temperatura final 170°C	Tiempo final 0 min
3ª Velocidad de Calentamiento 8°C/min	
Temperatura final 350°C	Tiempo final 10 min
Temperatura máxima 350°C.	

## ANALISIS SENSORIAL

### Definición del vocabulario

A partir del vocabulario que ya habían generado 6 jueces sensoriales descriptivos (entrenados especialmente para evaluar Tequila) se definieron 20 descriptores de sabor para el Tequila considerando el orden en que se percibían en las muestra. El vocabulario que los jueces generaron durante el entrenamiento fue a partir de varias marcas y tipos de Tequila (al 20% para evitar saturación). Aunque el interés de este estudio era solo evaluar Tequilas blancos donde la diferencia fuera solo el origen de la materia prima (100% agave o mixto), era importante partir de un lenguaje general que tipificara al Tequila.

### Evaluación de muestras

Después de definir todos los descriptores se realizó la evaluación final de las siguientes muestras:

- 1 Tequila blanco que garantizaba ser 100% agave
- 1 Tequila blanco comercial que ostentaba en su etiqueta la leyenda 100% agave
- 2 Tequilas blancos comerciales
- 1 ron blanco de origen nacional
- 1 aguardiente de caña blanco

Las muestras se dieron a los jueces diluidas al 20% para evitar saturación. Esta concentración fue determinada en una investigación previa con el mismo grupo de jueces<sup>(98)</sup>.

Para evaluar las muestras los jueces utilizaron una escala estructurada de nueve puntos para cada descriptor, como la que se presenta a manera de ejemplo a continuación:

	Ligero			Moderado			Muy intenso		
Amargo	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Dulce	1	2	3	4	5	6	7	8	9

La razón de utilizar una escala estructurada en lugar de una no estructurada como se recomienda en la metodología del Análisis descriptivo cuantitativo, fue porque los jueces presentaban menor coeficiente de variación en sus respuestas, es importante señalar que esta decisión así como la dilución de las muestras, aunque no formaron parte de la presente investigación si no de otra que fue el entrenamiento descriptivo<sup>(98)</sup>.

Las muestras se presentaron a los jueces debidamente aleatorizadas y codificadas con números de tres dígitos, el orden en que las evaluaron fue diferente para todos. Se evaluaron tres muestras por día alrededor de la una de la tarde.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Extracción líquido-líquido

Se seleccionó como mejor disolvente al diclorometano. Ya que como se aprecia en la tabla 1, es con el que se extraen más compuestos. Estos resultados y los siguientes, están basados en el número de compuestos que pudieron ser detectados con las condiciones cromatográficas señaladas en la metodología.

**Tabla 1. Compuestos extraídos en base al tipo de disolvente**

Disolvente	Número de picos en el cromatograma
Ninguno	14
Tetracloruro de carbono	5
Diclorometano	103
Azeótropo pentano:diclorometano 2:1	44

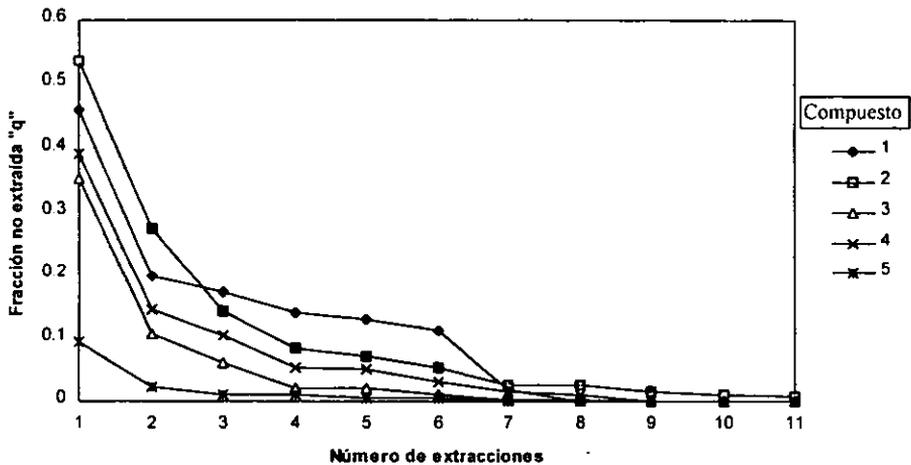
**Tabla 2. Relación disolvente-muestra y efecto de la fuerza iónica**

Relación disolvente:muestra	Número de picos en el cromatograma
1:3	28
1:5	36
1:10	80
1:10 con 1% de Cloruro de Sodio	103

La relación de disolvente-muestra seleccionada fue de 1:10. De la misma manera se observó que se obtenían mejores resultados aumentando la fuerza iónica del medio con cloruro de sodio al 1%, como se puede observar en tabla 2. Tanto el incremento de volumen de muestra en la relación, como la influencia de la fuerza iónica aumentan la cantidad de compuestos extraídos. Cabe destacar el efecto que tiene la adición de electrolitos, al aumentar la fuerza iónica en la

fase acuosa se favorece el desplazamiento de los compuestos de interés a la fase orgánica debido a las propiedades que éstos presentan, ya que como se mencionó en los antecedentes son principalmente alcoholes, carbonilos, ácidos orgánicos y ésteres entre otros.

**Figura 1. Fracción no extraída en función del número de extracciones sucesivas empleando la técnica de ELL**



**Nota:** "q" se refiere a la fracción de compuesto no extraída. Considerando que  $q=1$  cuando el compuesto no fue extraído y  $q=0$  cuando fue extraído por completo.

Para evaluar cuantas extracciones eran necesarias para agotar la muestra, se tomaron como referencia los cinco compuestos que aparecen en mayor concentración y se observó que se requerían aproximadamente 6 extracciones, como se puede observar en la figura 1. Los compuestos considerados en dicha gráfica son los que se encuentran en mayor concentración y son los últimos que se agotan, es decir, cuando éstos ya se encuentran en concentraciones muy bajas, los que están en menor concentración ya no se observan o se encuentran en concentraciones tales que el equipo empleado ya no los detecta, por ejemplo el compuesto marcado como número 5, es de los que están en menor proporción dentro del grupo de los

compuestos que presentan mayores áreas. Si se analiza la figura 1 se puede notar que éste compuesto es extraído en un 90% desde la primera extracción y prácticamente se agota en la segunda, por lo que se puede concluir que compuestos de concentraciones mucho más bajas se agotan desde la primera extracción.

### Microextracción líquido-líquido

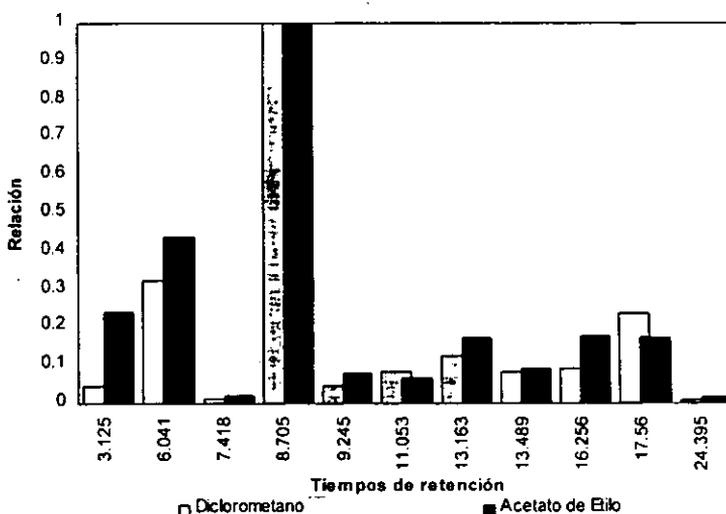
Debido a la solubilidad que el diclorometano presenta en el etanol, resultó muy difícil manejar la muestra debido a que se formaban emulsiones. Además fue poco eficiente porque se requerían relaciones de alrededor de 1:10 (10 mililitros de disolvente por 100 mililitros de muestra) para lograr la separación de fases y finalmente se obtenían rendimientos semejantes a los de las ELL.

### Extracción en fase sólida

Al definir el tipo de sistema de extracción en fase sólida, discos o columnas, que se utilizaría, se consideraron las ventajas y desventajas que cada uno presenta. Las columnas requieren menor cantidad de disolvente para eluir y no hay que concentrar con nitrógeno, pero es más tardada la extracción por que el flujo de la muestra es más lento. La extracción con disco es mucho más rápida además de que permite pasar un mayor volumen de muestra en menos tiempo y por lo tanto tener una concentración mayor; las únicas limitantes que presenta es el tener que eliminar el exceso de disolvente, y como consecuencia se pierden los compuestos más volátiles que el disolvente empleado. La decisión final fue utilizar discos después de tomar en cuenta las siguientes consideraciones: en los cromatogramas se observó que el grueso de los compuestos tienen un punto de ebullición mayor al del disolvente, además se sabe por la bibliografía consultada que los compuestos más volátiles no son exclusivos de alguna bebida alcohólica si no que pueden estar en todas.

A pesar de que con el diclorometano como disolvente de extracción en la EFS, se obtenían rendimientos mejores que con la ELL, se detectó que compuestos polares y pesados no eran completamente eluidos del disco de C18 debido a la diferencia de polaridad de ambos, por tales razones se decidió emplear un disolvente más polar como el acetato de etilo y se obtuvieron mayores rendimientos de extracción como se observa en la figura 2.

**Figura 2. Relación de áreas de los compuestos mayoritarios eluidos con Diclorometano y con Acetato Etilo**



Nota: Las relaciones fueron hechas con base en el mismo compuesto; en los dos casos fue el compuesto que tenía mayor área (tiempo de retención de 8.705).

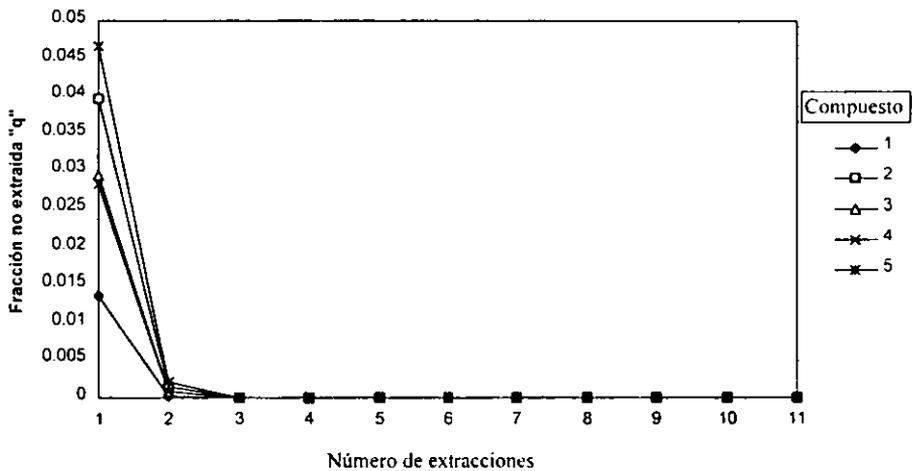
Se observó que aunque globalmente se extraían más compuestos con el acetato de etilo (alrededor de 50), en el disco se quedaban algunos que solo era posible eluir con diclorometano. Para realizar una extracción más completa se probó una mezcla de diclorometano:acetato de etilo (1:1), aprovechando que son miscibles y se obtuvieron mejores resultados. De cualquier forma se

realizaron extracciones sucesiva para determinar cuantas eran necesarias para agotar la muestra y se determinó que los compuestos mayoritarios se agotan después de la segunda extracción, aunque después de la primera se extraen alrededor del 96% (ver figura 3), por lo que se concluye que esta técnica es mas cuantitativa que la ELL además de que es posible extraer alrededor de 120 compuestos más.

### Microextracción en fase sólida

Con la fibra de 100  $\mu\text{m}$  se observaron tres veces mas compuestos que con la de 8  $\mu\text{m}$  y con la de 38 $\mu\text{m}$  un número intermedio; lo cual es lógico por la capacidad que cada una tiene.

**Figura 3. Fracción no extraída en función del número de extracciones sucesivas empleando la técnica de EFS**



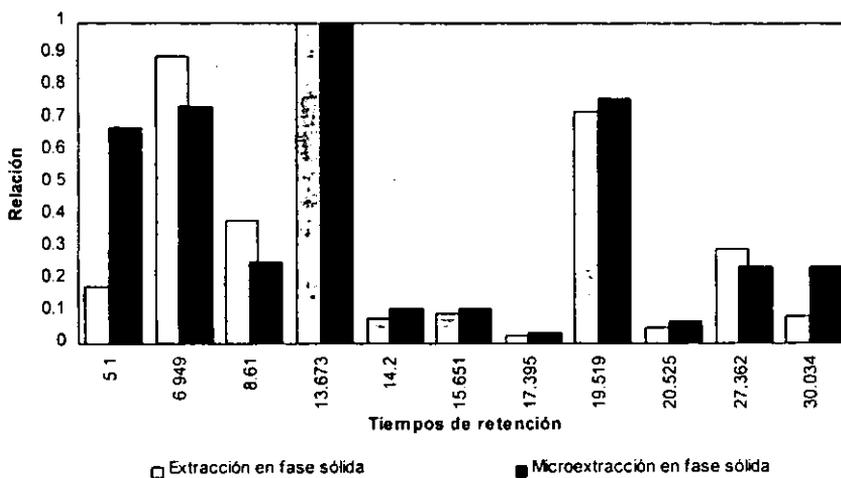
**Nota:** "q" se refiere a la fracción de compuesto no extraída. Considerando que q=1 cuando el compuesto no fue extraído y q=0 cuando fue extraído por completo.

El estudio de la  $\mu\text{EFS}$ , implicó estudiar varias variables para llegar a las condiciones finales pero aún desde observaciones preliminares se consiguieron

resultados similares a los obtenidos con la EFS, tanto a nivel de compuestos extraídos, eficiencias de extracción y agotamiento de muestras. Una ventaja adicional interesante de la  $\mu$ EFS es que además de que se extraen los mismos compuestos con relaciones similares que con la EFS, como se puede observar en la figura 4, no se pierden compuestos volátiles como en el caso de segunda técnica, debido al tratamiento al que se somete la muestra.

La  $\mu$ EFS es una técnica reciente y que se ha utilizado poco en el análisis de bebidas alcohólicas, por ello se estudiaron los efectos de distintas variables para establecer las condiciones mas adecuadas de trabajo. Como se verá en los resultados que a continuación se presentan, no hay un sólo comportamiento de los compuestos en general para cada variable sino que se dividen en dos o más, dependiendo seguramente de la naturaleza de los compuestos y de las interacciones que éstos puedan tener tanto con la fase de la fibra como con la muestra misma.

**Figura 4. Relación de áreas de los compuestos mayoritarios extraídos por las dos técnicas (EFS,  $\mu$ EFS)**

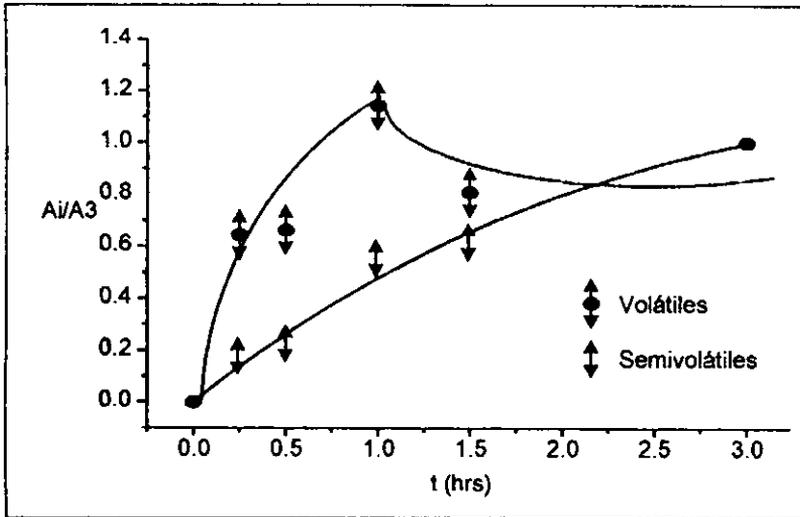


Nota: Las relaciones fueron hechas con base en el mismo compuesto en las dos muestras, en los dos casos fue el compuesto que tiene la mayor área (compuesto con tiempo de retención de 13.673).

En la figura 5 se describe el efecto del tiempo de extracción. Se observaron dos comportamientos distintos, uno que se refiere a los compuestos más volátiles y que presentan tiempos de retención pequeños y el otro que involucra a compuestos con tiempos de retención mayores y que obviamente son menos volátiles. Hasta antes de una hora, la extracción de los más volátiles es rápida, mientras que para los otros, aunque aumenta progresivamente, es más lenta, debido a que las características de difusión de los primeros compuestos es más favorable hacia la fibra que para los otros. Sin embargo, después de la primera hora, la extracción de los compuestos más volátiles continúa aumentando, y la de los menos volátiles disminuye, este fenómeno se relacionó con fugas del sistema, considerando que la fase líquida está en agitación constante, y con calentamiento, y bajo estas condiciones es lógico que los compuestos más volátiles emigren hacia la fase vapor del sistema y se fuguen. Aunque después de tres horas no se llegó a un equilibrio en la difusión entre la fibra y la fase líquida, el tiempo que se determinó como óptimo y práctico para la extracción fue de dos horas.

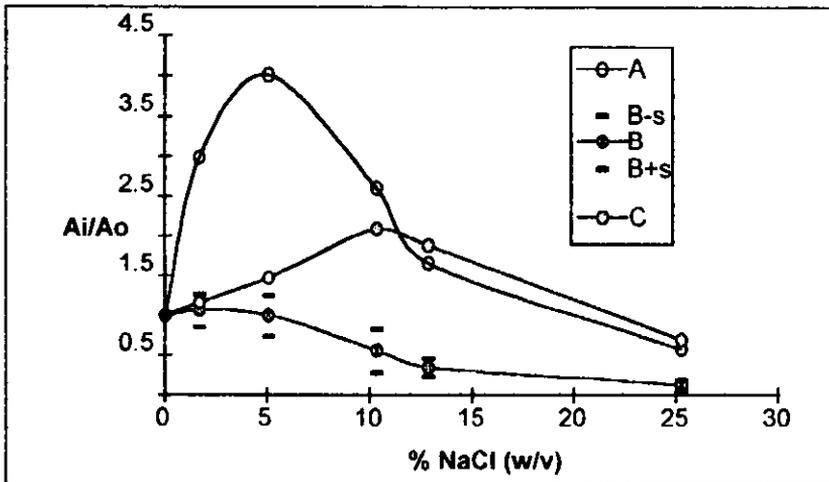
Para medir el efecto de la fuerza iónica se estudiaron distintas concentraciones de NaCl que fluctuaron desde 0 hasta 25% w/v. Como se observa en la figura 6, la mayoría de los compuestos presenta un comportamiento similar (B), donde las áreas mayores se obtienen a concentraciones de sal entre 2.5 y 5% w/v, con un máximo cercano a 2.5% w/v, por lo que se decidió trabajar con esta concentración. Es importante señalar que sólo pocos compuestos presentaron comportamientos distintos, también en la figura 6, se destacan dos que fueron extremos (A y C), en los cuales las áreas relativas crecen mucho más y tienen máximos distintos en comparación con el comportamiento que presentan la mayoría de los compuestos.

Figura 5. Efecto del tiempo de extracción



NOTA: Las áreas son relativas a las áreas de los compuestos a las tres horas de extracción, los compuestos volátiles corresponden al promedio de seis picos y los semivolátiles al promedio de ocho picos. La doble flecha indica la desviación estándar.

Figura 6. Efecto de la concentración del NaCl



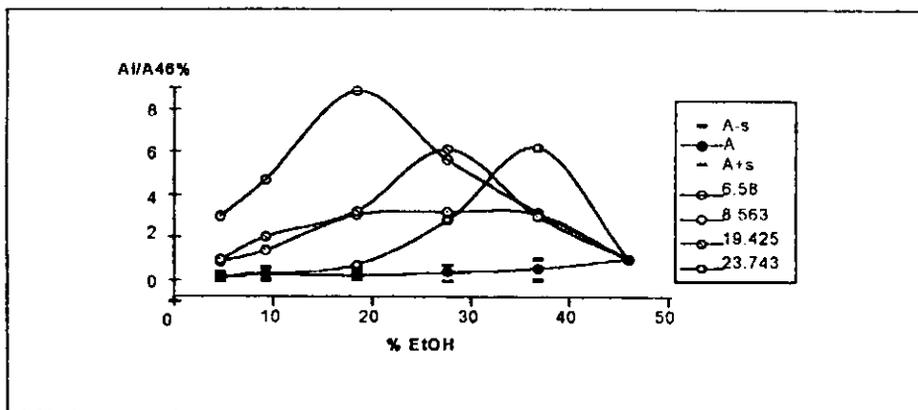
NOTA: A y C se refieren a un solo compuesto. B es el promedio de doce compuestos de comportamiento similar y las barras en B indican la desviación estándar de estos compuestos

El efecto que tiene la concentración de etanol es similar al que presenta el NaCl. Se probaron distintas concentraciones de Tequila que comprendían desde un 5% de etanol hasta un 46% v/v (Tequila concentrado con máximo contenido de etanol). Como se puede ver en la figura 7 la concentración de etanol no tiene un efecto apreciable para la mayoría de los compuestos, es decir, las áreas no varían con respecto a la concentración de etanol, sin embargo, como en el caso de la fuerza iónica, se destacó en esta figura el comportamiento de cuatro compuestos, que presentan máximos en función de la concentración de etanol, es decir, la difusión de estos compuestos a la fibra de extracción es modificada por la concentración de etanol, a cierta concentración de etanol se facilita el mojado de la fibra y así la difusión, pero al aumentar esta concentración, la difusión hacia la fibra de los compuestos que son más afines al etanol se disminuye.

Como complemento al estudio de la concentración de etanol, se observó como influía la concentración de etanol en el total de compuestos extraídos.

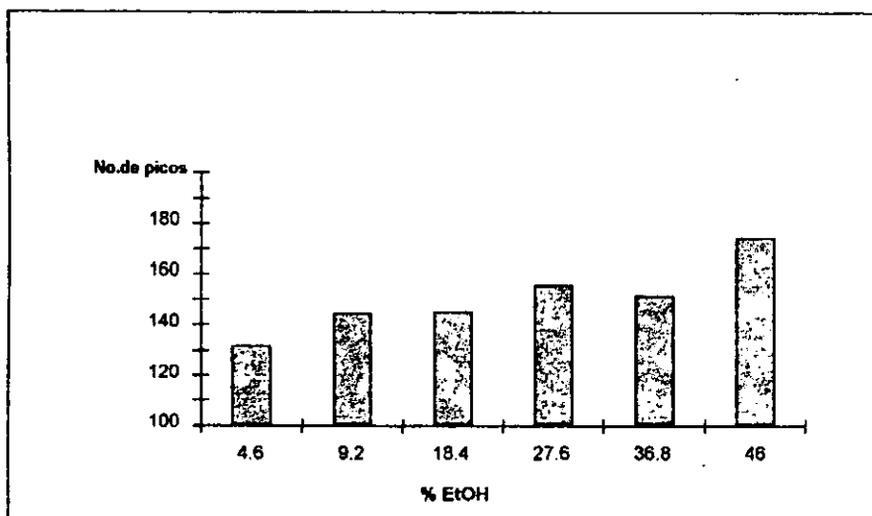
En la figura 8, se muestra que conforme aumenta la concentración de etanol aumenta el número de picos en los cromatogramas, por lo que se decidió trabajar con las muestras concentradas. Tomando en cuenta que existen en el mercado Tequilas con distintas concentraciones de etanol (de 38 a 46% v/v), se consideró la muestra con la concentración mínima (38% v/v) y el resto se diluyeron, para estandarizar las muestras y en consecuencia las condiciones de extracción.

Figura 7. Efecto de la concentración de etanol



NOTA: Las curvas señaladas con números se refieren a compuestos solos. La curva A es el promedio de diez compuestos con comportamiento similar y las barras indican su desviación estándar.

Figura 8. Número de compuestos extraídos en función de la concentración de etanol



También se observó que la temperatura modifica la extracción, para observar este efecto se probaron temperaturas desde los 25°C hasta los 60°C y se observó que después de los 35°C no aumenta la extracción de compuestos.

En la figura 9 se muestra un cromatograma obtenido de la  $\mu$ EFS con la condiciones determinadas como óptimas, que representan la separación de mas de 200 compuestos del Tequila.

Con las condiciones establecidas de tiempo, temperatura y concentraciones de sal y etanol, se realizó un estudio de extracciones múltiples que se muestra en la figura 10, donde se expone el comportamiento promedio de los compuestos mayoritarios y se observa que después de la primera extracción se disminuyen las áreas relativas aproximadamente en mas de un 10%, manteniéndose después de la segunda extracción con un comportamiento constante, este fenómeno es debido al efecto que tiene la alta concentración de etanol en el medio, como ya se discutió antes. La alta concentración de etanol no permite que los compuestos difundan por completo hacia la fibra evitando que se extraigan por completo. Este experimento se realizó igual que los anteriores con 8 ml de muestra y con agitación constante, así que se decidió modificar el volumen de la muestra llevándolo hasta 500 $\mu$ l (sin agitación debido al volumen tan pequeño), y se observó un comportamiento similar por lo que podemos decir que con la técnica de  $\mu$ EFS las extracciones no son cuantitativas; es difícil que se agote la muestra con varias extracciones, aún manejando volúmenes pequeños la fracción no extraída se mantiene constante. Con el conocimiento de esta limitante se decidió hacer un estudio acerca de la reproducibilidad de esta técnica.

## IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS

A este nivel de la investigación, ya se tenían identificados por espectrometría de masas los compuestos más abundantes en una muestra de origen 100% agave, por lo que el estudio de reproducibilidad de la  $\mu$ EFS se hizo

Figura 9. Cromatograma obtenido de una  $\mu$ EFS

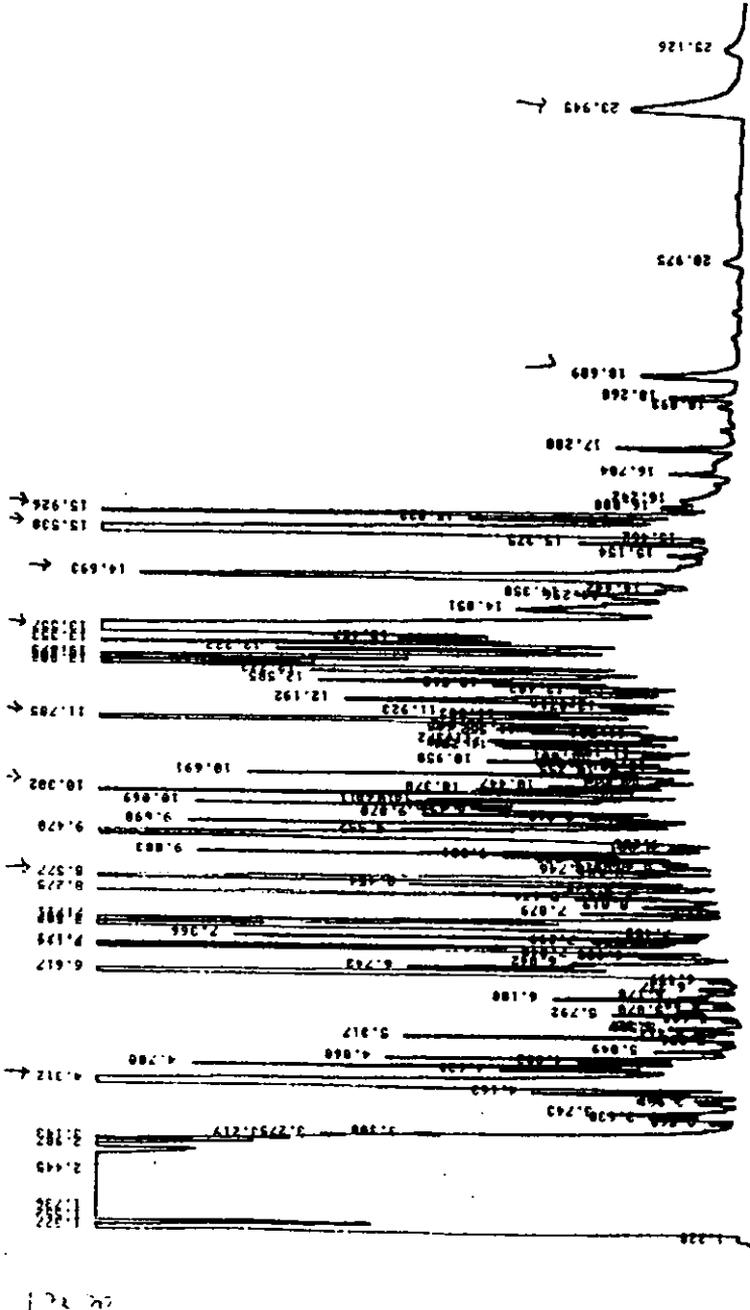
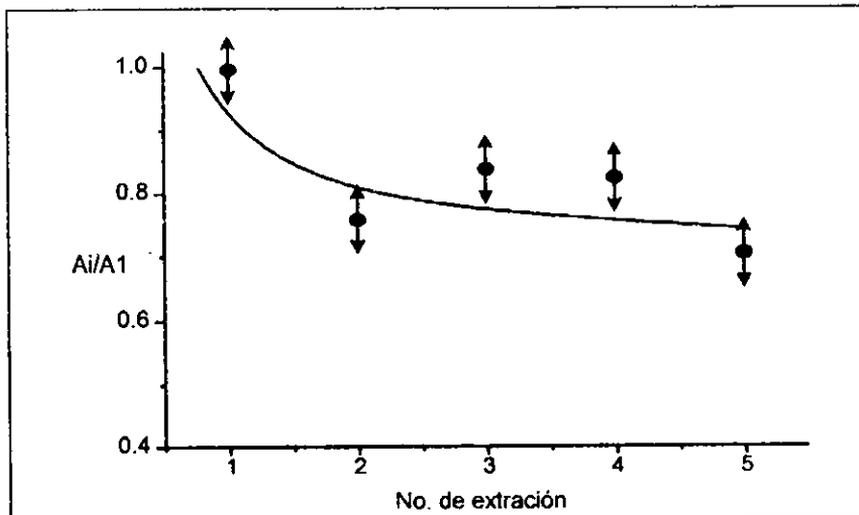
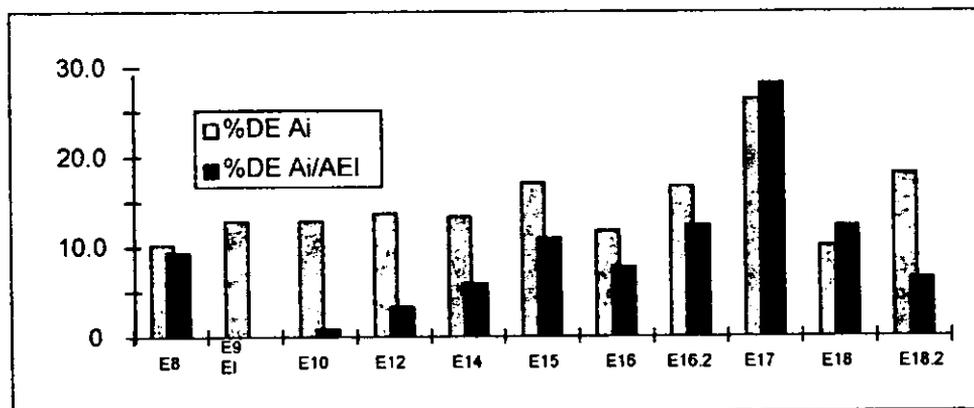


Figura 10. Extracciones sucesivas en la técnica de  $\mu$ EFS



NOTA: Las áreas son relativas a la primera extracción. La curva se refiere al comportamiento promedio de 10 compuestos y la doble flecha indica su desviación estándar.

Figura 11. Desviación estándar relativas y absolutas para distintos compuestos (técnica de  $\mu$ EFS)



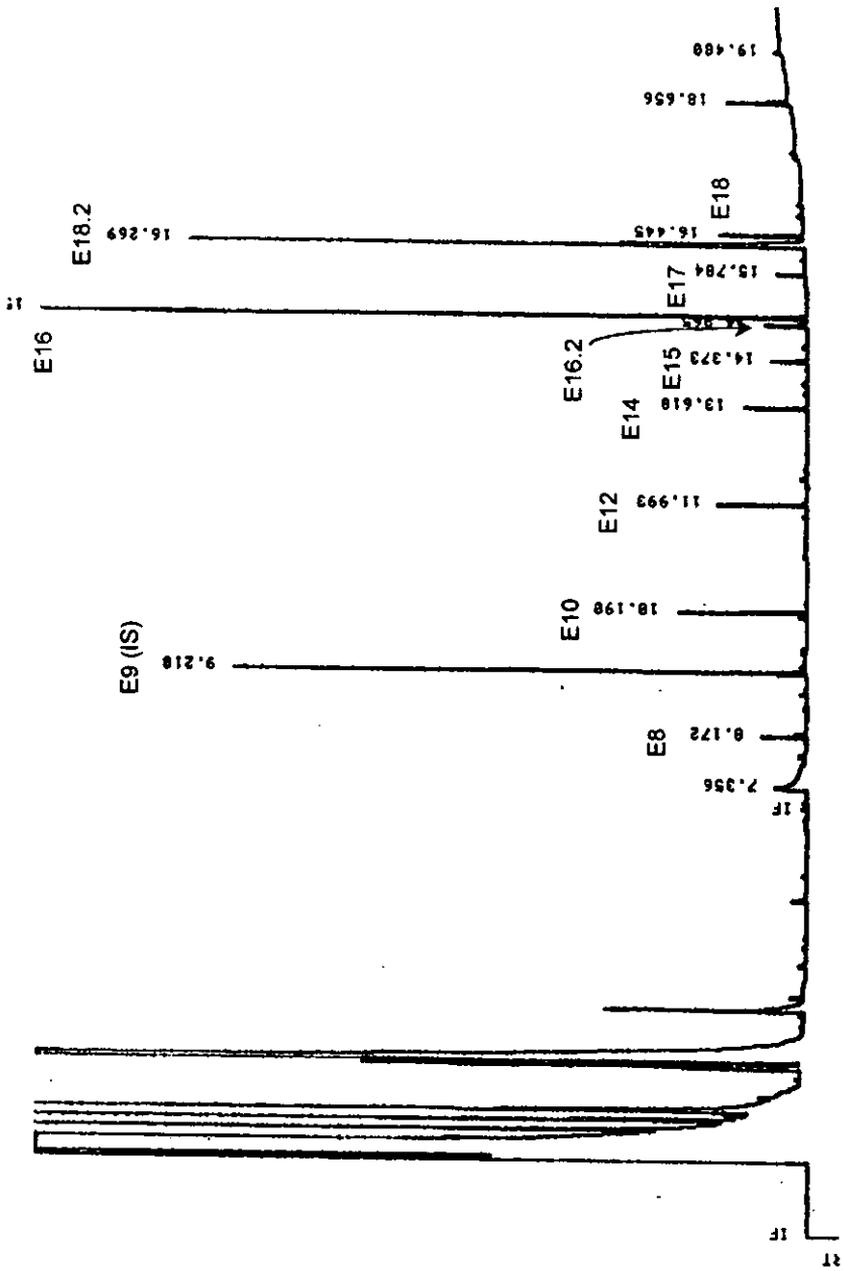
NOTA: Se realizaron cinco repeticiones. Los porcentajes de desviación estándar representadas en las barras oscuras son relativas al éster 9 que se utilizó como estándar interno.

solo con base en éstos para poder descartar mas variables. Para eliminar a la mayoría de los compuestos del cromatograma y dejar principalmente a los que eran de interés para este estudio, se modificaron algunas condiciones, como el espesor de fase de la fibra, la cual se cambió de 100 a 38  $\mu\text{m}$  y la introducción de la muestra se hizo en "Split" en lugar de "Splitless", también se modificó la atenuación. La observación que surgió de este estudio fue, que a pesar de que con esta técnica las extracciones no pueden ser cuantitativas por pequeño que sea el volumen de muestra que se utiliza, se obtiene una reproducibilidad aceptable con una desviación estándar relativa promedio menor al 10% (ver figura 11).

En la figura 12 se encuentran señalados los 10 compuestos identificados como mayoritarios en un Tequila 100% agave. Todos los que se señalan son ésteres etílicos de ácidos grasos que van desde el octanoato de etilo hasta el octadecanoato de etilo. Cabe destacar que aunque se encontraron ésteres etílicos de ácidos grasos noes como el pentadecanoato de etilo (E15) y heptadecanoato de etilo (E17), éstos no habian sido reportados en otros estudios, si se habian reportado ésteres etílicos de ácidos grasos más pequeños; la razón de su existencia puede ser que sean sintetizados por algunos de los microorganismos que estén presentes en la fermentación y que éstos en su ruta de síntesis de ácidos grasos en lugar de partir de Acetil Coenzima A, utilicen Propionil Coenzima A<sup>(99)</sup> y de como resultado final ácidos grasos con un número de átomos de carbono noes que al combinarse con parte del etanol, producto de la fermentación, sean transformados a ésteres etílicos.

Antes de hacer el estudio de las 47 bebidas, se analizaron algunos tequilas y aguardientes comerciales y se identificaron en algunas de éstas dos ésteres etílicos más de los que se encuentran en el Tequila blanco 100% agave (E16,1 y E18,1). El análisis de las 47 bebidas mencionadas en la metodología se realizó identificando con base en los tiempos de retención, los doce

Figura 12. Compuestos mayoritarios en el tequila 100% agave detectados con la técnica de  $\mu$ EFS



compuestos que se mencionan en la tabla 3 junto con la codificación que tendrán a partir de este momento en el resto del trabajo.

Una vez identificados los compuestos por su espectro de masas y por su tiempo de retención con respecto a estándares, se realizó un estudio con las 47 bebidas comerciales que se señalan en la metodología. Después de haber comprobado la reproducibilidad de la técnica y por el tiempo que implicaba este estudio se decidió hacerlo únicamente por duplicado. Las muestras se codificaron y se aleatorizaron por completo, ya con los resultados de las dos repeticiones se corroboró que tanto los compuestos como sus áreas relativas (con base en el estándar interno) fueran similares, se sacaron promedios y el porcentaje de cada compuesto (del total de ésteres) representaba en cada muestra. Como no se considera práctico incluir todas las concentraciones de todos los ésteres etílicos en todas las muestras, sólo se mencionará que dichas concentraciones fluctuaron desde  $2.37 \times 10^{-2} \mu\text{g/mL}$  de octadecanoato de etilo (E18) en un Tequila abocado (concentración mínima), hasta  $34.76 \mu\text{g/mL}$  de hexadecanoato de etilo (E16) en un Tequila blanco 100% agave (concentración máxima).

**Tabla 3. Compuestos identificados en las bebidas estudiadas**

Compuesto	Codificación
octanoato de etilo	E 8
decanoato de etilo	E 10
dodecanoato de etilo	E 12
tetradecanoato de etilo	E 14
pentadecanoato de etilo	E 15
hexadecanoato de etilo	E 16
$\Delta 9$ -hexadecenoato de etilo	E 16,1
$\Delta 9$ - $\Delta 12$ -hexadecadienoato de etilo	E 16,2
heptadecanoato de etilo	E 17
octadecanoato de etilo	E 18
$\Delta 9$ -octadecenoato de etilo	E 18,1
$\Delta 9$ - $\Delta 12$ -octadecadienoato de etilo	E 18,2

**Nota:** Los compuestos sombreados son los que no se encontraron en el Tequila blanco 100% agave.

## ESTUDIO DE LAS BEBIDAS COMERCIALES

El análisis estadístico multivariado o multivariable tiene como objetivo encontrar las bases numéricas para clasificar variables en un número mínimo de grupos que no se traslapen. Permite considerar cambios de un número considerable de propiedades de manera simultánea, en las cuales cada unidad experimental está caracterizada por varias variables<sup>(100)</sup>. Los resultados de las muestras de bebidas alcohólicas que se estudiaron, cumplen con las características antes mencionadas, cada una está caracterizada por distintas variables, que en este caso son las proporciones de los distintos ésteres etílicos, que se cuantificaron en cada muestra.

Existen distintos métodos de análisis multivariado, uno de ellos es el análisis de factor o factorial, el cual intenta explicar, según un modelo lineal un conjunto extenso de variables observables mediante un número reducido de variables hipotéticas llamadas factores, los factores que se plantean no son directamente observables, obedecen a conceptos más abstractos que las variables originales<sup>(101)</sup>. El razonamiento bajo el que se rige este método es el siguiente: si se tiene un conjunto de fenómenos (variables) y si cada una de estos varía de manera independiente a las demás, entonces habrá tantas dimensiones de variación como fenómenos. Por el contrario, si los fenómenos no varían independientemente se encuentra que las dimensiones de variación serán menores que fenómenos<sup>(102)</sup>. En términos prácticos, en el análisis de factor la varianza explica un número grande de variables originales a través de un reducido número de factores, se asume que cada variable original se puede expresar como una combinación lineal de esos factores más un término residual que refleja el intervalo en el cual ésta es independiente de las otras variables<sup>(103,104)</sup>.

Se decidió utilizar el análisis de factor, fue por que al analizar las proporciones de ésteres etílicos (variables) de manera independiente no se pudo llegar a ninguna conclusión clara, así que se decidió probar si generando

variables nuevas (factores) a partir de las existentes, se puede encontrar alguna relación entre las nuevas variables y características de las muestras como: por ejemplo, el origen de la materia prima de las muestras y el grado de añejamiento de éstas.

Las concentraciones que presentaban los compuestos en las muestras variaban en un intervalo muy amplio, y al aplicar el análisis multivariado no se observaban tampoco conclusiones claras, por lo que se decidió normalizar los resultados, calculando los porcentajes de los compuestos en cada muestra, como ya se explicó.

En el análisis multivariado se considera que las variables que aportan mayor varianza al experimento son las responsables de las diferencias entre las muestras, así que se calculó la varianza que cada éster etílico tiene en el grupo de muestras (tabla 4).

**Tabla 4. Varianza del porcentaje de los ésteres en las muestras**

<b>Compuesto</b>	<b>Varianza</b>
Ester 8	22.3898
Ester 10	148.6859
Ester 12	325.8001
Ester 14	10.2901
Ester 15	28.7213
Ester 16,2	17.1154
Ester 16,1	35.2400
Ester 16	193.3868
Ester 17	22.1776
Ester 18,2	143.1033
Ester 18,1	21.2321
Ester 18	0.49445

Se seleccionaron los cuatro compuestos que tenían mayor varianza (E10, E12, E16, E18,2) y otros tres más (E15, E16,2, 18,1), que representaban concentraciones importantes en algunas muestras (cercanas al 100%). El resto

se eliminaron ya que aparecían en trazas y presentaban varianzas muy bajas. El análisis estadístico se realizó en el paquete "STATGRAPHICS", versión 6.

En la tabla 5 se encuentran los valores propios o "autovalores" para cada factor calculado, así como su porcentaje de varianza y el porcentaje de varianza acumulada para todos los factores. Vale la pena repetir que cada factor es una nueva variable independiente de cada variable original (ésteres etílicos).

**Tabla 5. Valores propios y porcentaje de varianza de los factores estimados**

<b>Factor</b>	<b>Valor propio</b>	<b>Porcentaje de varianza</b>	<b>Porcentaje de varianza acumulada</b>
1	2.71534	38.8	38.8
2	1.41095	20.2	58.9
3	0.92107	13.2	72.1
4	0.85169	12.2	84.3
5	0.74227	10.6	94.9
6	0.30420	4.3	99.2
7	0.05449	0.8	100.2

Para tener una menor dispersión en los resultados de un análisis de factor, se deben considerar el menor número de factores posibles, solo seleccionando los que aportan mayor varianza. En este caso se seleccionaron los tres factores de mayor peso, que representan más del 70% de la varianza, para la elección también se consideró el criterio de Káiser<sup>(103)</sup>, que recomienda utilizar sólo los que representan más del 1% de la varianza. En la tabla 6 se encuentra la matriz factorial calculada de acuerdo a estos tres factores. Cada variable aporta un valor para cada factor, algunas variables tiene un valor de mayor peso (valor absoluto alto) para un factor determinado, esto significa que su variación esta relacionada solamente con un factor, es decir, únicamente con una de las nuevas variables calculadas; pero otras tienden a ser bi o tri polares es decir su variación tiene que ver con dos o tres de las nuevas variables.

**Tabla 6. Matriz Factorial**

Variable	factor 1	factor 2	factor 3
E 10	0.76846	0.02952	0.14131
E 12	0.74995	0.19401	-0.06208
E15	-0.06291	-0.82906	-0.00051
E16,2	-0.17899	0.65455	-0.38424
E 16	-0.84848	-0.30338	-0.05433
E18,2	-0.78968	-0.32607	-0.22741
E18,1	-0.42766	0.24145	0.83363

Para facilitar la interpretación de los resultados, existe un segundo paso en el tratamiento de datos, al que se le llama rotación de los factores seleccionados. La rotación es un procedimiento por el cual, se trata de encontrar una estructura tal que las variables aparezcan como una función de un mínimo de factores. Los resultados generados de un análisis factorial tienen una representación gráfica en un espacio de coordenadas cartesianas, las rotaciones tienen como objetivo hacer que los valores en la horizontal o en la vertical de los ejes se aproximen lo máximo posible a cero, al hacer esto con un factor, se maximiza a la vez otro factor y así se puede asociar cada variable con un solo factor y observar cuales están relacionadas entre sí (dependen del mismo factor) o no tienen relación (dependen de distintos factores).

Existen varios métodos de rotación entre los que destacan dos:

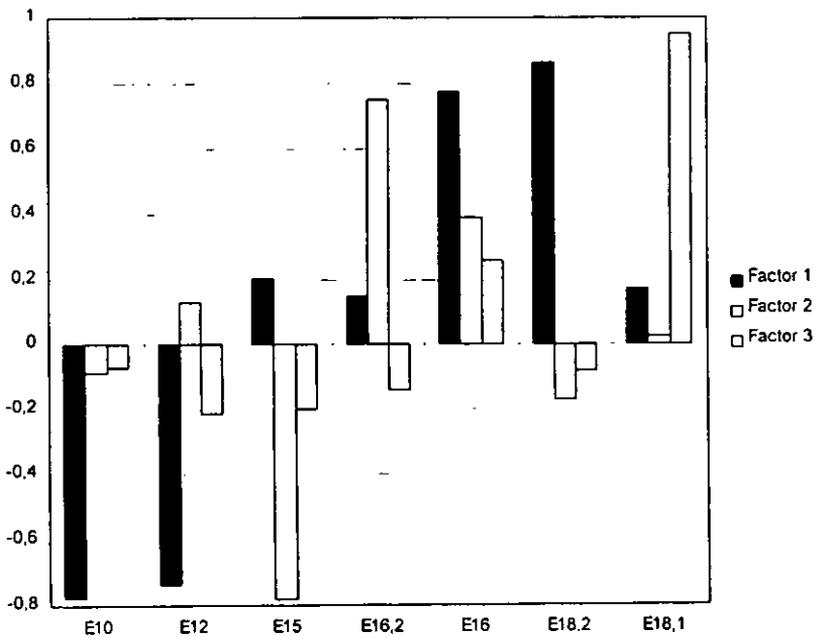
- VARIMAX: Es un procedimiento adecuado cuando el número de factores es pequeño.
- QUARTIMAX: Es apropiado cuando el número de factores es elevado<sup>(105, 106)</sup>.

A la matriz factorial obtenida (tabla 6), se le aplicó una rotación Varimax, la matriz rotada obtenida se muestran en la tabla 7; los factores de más peso que se presentan en la tabla 7 varían de -1 a +1 y se interpretan de la misma manera que un coeficiente de correlación, expresan la correlación entre las distintas variables y los factores. En la figura 13 se encuentran representados de otra manera para facilitar su interpretación.

**Tabla 7. Matriz Rotada**

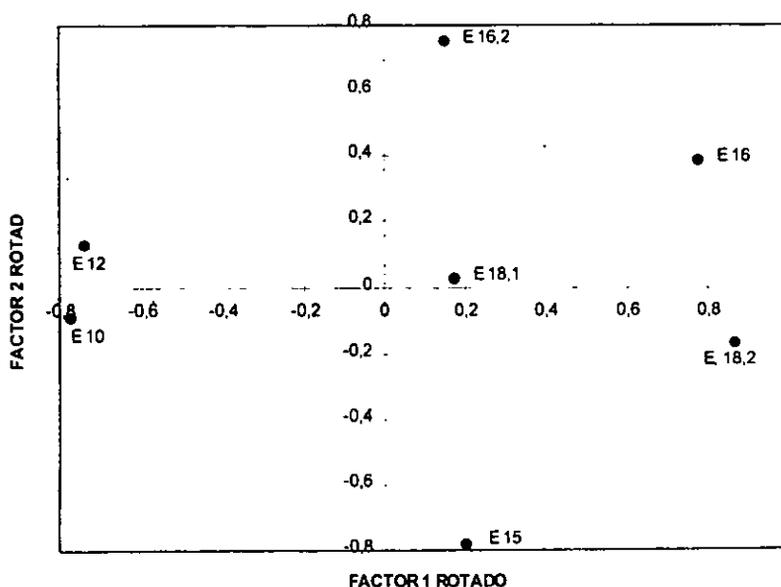
Variable	factor 1 rotado	factor 2 rotado	factor 3 rotado
E 10	-0.77384	-0.08755	-0.06982
E 12	-0.73656	0.13050	-0.21062
E15	0.20058	-0.78209	-0.19851
E16,2	0.15020	0.75271	-0.13777
E 16	0.77391	0.38619	0.25849
E18,2	0.86437	-0.16703	-0.08119
E18,1	0.17456	0.02540	0.95133

**Figura 13. Representación de los pesos de los tres factores rotados para cada variable**



En la figura 14 están representadas las proyecciones de las siete variables de acuerdo a los dos primeros factores rotados, al igual que en la figura 13, en ésta se puede observar el peso que tiene cada variable en cada factor, así como también cuales están relacionadas. Es conveniente para el análisis de resultados observar la proyección de los datos de cada muestra en función de los factores rotados. En la figura 15 se encuentran la proyección de las muestras de acuerdo a los dos primeros factores rotados y en la figura 16, en función de los factores 1 y 3 rotados.

**Figura 14. Proyección de las variables de acuerdo a la matriz rotada (factores 1 y 2)**



**NOTA:** La letra "E" significa éster y los números después de cada letra E corresponden a las codificaciones señaladas en la tabla 3.

Figura 15. Proyección de las muestras de acuerdo a la matriz rotada (factores 1 y 2)

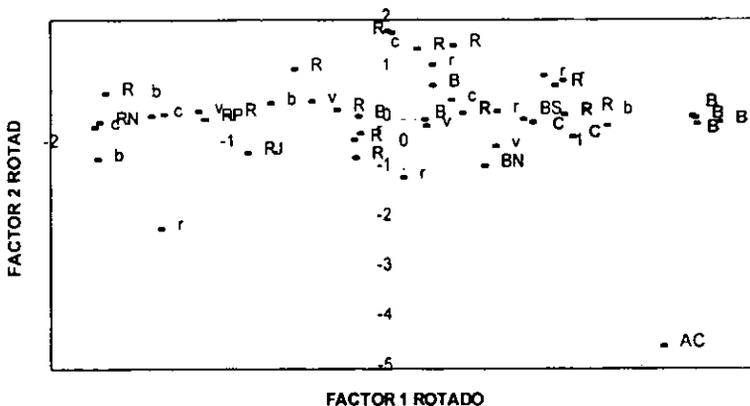
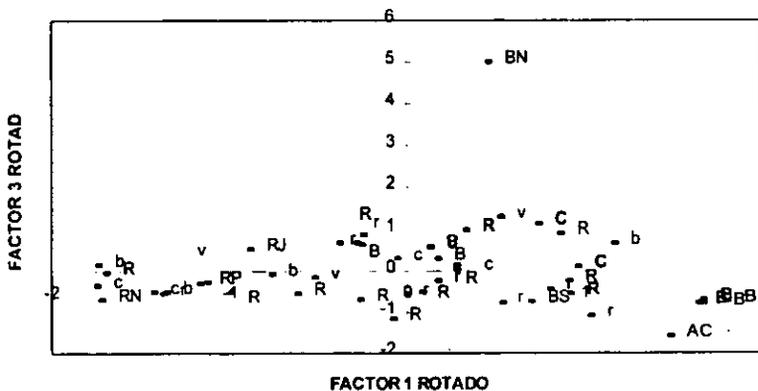


Figura 16. Proyección de las muestras de acuerdo a la matriz rotada (factores 1 y 3)



NOTA: En las figuras 15 y 16, las letras B, R, C y V, se refieren a Tequilas blancos, reposados, añejos y abocados respectivamente, cuando aparecen en minúsculas representan a Tequilas comerciales, con mayúsculas representan tequilas comerciales 100% agave y estas mismas letras en negritas señalan a Tequilas de los que se tenía la garantía de que eran 100% agave. Los rones nacional, puertorriqueño y jamaquino están marcados como RN, RP y RJ, respectivamente. Las iniciales AC se refieren al aguardiente de caña, BN al brandy nacional y BS al "Bacanora" de Sonora.

Al reunir los resultados que nos ofrecen las figuras 13, 14, 15 y 16 se puede observar que el primer factor que representa casi el 40% de la variación, está relacionado con los ésteres 16, 18.2, 10 y 12, aunque con estos últimos dos de manera negativa. Los ésteres 16 y 18.2, definen principalmente la proyección de los Tequilas que se tenía la garantía de que eran 100% agave, (a partir de este momento nos referiremos a estos sólo como 100% agave). También en esta zona se encuentran otros Tequilas comerciales que declaraban en su etiqueta ser 100% agave y otros que no, pero no se puede concluir con base en éstos, ya que se desconoce la proporción de agave que se utilizó en su elaboración. Hay una separación mas o menos clara de los Tequilas blancos 100% agave del resto, pero no así de los reposados y añejos 100% agave. Los ésteres 10 y 12 están mas relacionados con los rones que se analizaron y con algunos otros Tequilas comerciales que se encuentran completamente del lado opuesto a los Tequilas 100% agave. Dentro del grupo de las bebidas que se encuentran definidas por el factor 1 está el "Bacanora", que sin ser un Tequila presenta un perfil de ésteres etílicos similar a los Tequilas 100% agave, esta bebida se fabrica a partir de un agave silvestre diferente al *Tequilana weber*, por lo que se puede concluir que el perfil de estos compuestos no podría servir para diferenciar a un Tequila hecho de agave *Tequilana weber* de otro hecho de otro agave, sin embargo, el perfil de ésteres que se estudió parece estar relacionado con la materia prima, esto significa que los ésteres 16 y 18.2 están relacionados con las bebidas que parten de agave como única materia prima, y los ésteres 10 y 12 están relacionados con las bebidas que se elaboran con mostos donde la fuente de carbono principal es la sacarosa, como en el caso de los rones. El segundo factor rotado, que representa casi el 20% de la variación, está representado por los ésteres 16.2 y el 15, el primero de manera positiva y no está relacionado con ningún grupo de muestras el segundo que se proyecta negativamente parece definir al aguardiente de caña. Cabe destacar que esta bebida tuvo un porcentaje muy alto de este éster, aunque la concentración de él en ésta es bajo,  $2.81 \times 10^{-2} \mu\text{g/ml}$ , comparado con las concentraciones del

mismo presentadas en otras bebidas; en este caso la concentración del éster 15 no es útil para diferenciar al aguardiente de las otras bebidas, pero su proporción sí sirve para hacer esta discriminación. El tercer factor rotado que corresponde a más del 10% de la variación está representado por el éster 18.1 y como se puede observar en la figura 16, este compuesto define únicamente al Brandy Nacional. El resto de las bebidas que ahí se proyectan están definidas por el factor 1.

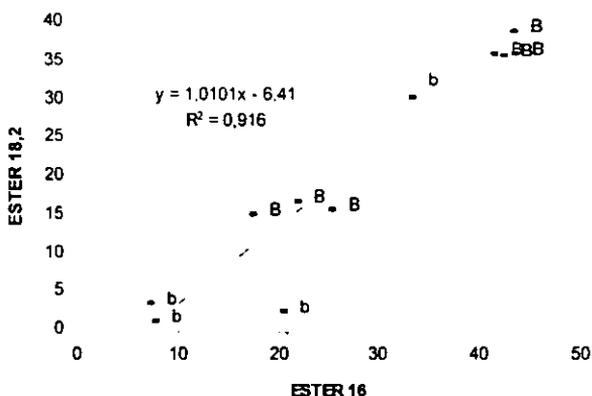
Para comprobar los resultados obtenidos del análisis de factor, se observó el comportamiento de las muestras, para los compuestos que de acuerdo a este análisis tienen influencia en la clasificación de las muestras. Es importante mencionar que la mayoría de las muestras analizadas pertenecen tanto a marcas como a casas productoras distintas a excepción de las muestras 100% agave no comerciales, que fueron proporcionadas por un mismo productor.

En primer lugar se observó como se comportaba cada grupo de muestras en función de los ésteres 16 y 18,2.

En la figura 17 se encuentra representada la dispersión de los Tequilas blancos en función de los ésteres 16 y 18,2, y claramente se puede notar que la distribución se ajusta a una recta con un coeficiente de correlación alto ( $r=0.96$ ), y una pendiente muy cercana a 1 ( $m=1.0101$ ).

En la misma figura se destaca que los Tequilas 100% agave, presentan proporciones altas de ambos ésteres; los 100% agave comerciales tienen proporciones intermedias y los comerciales que no declaraban en su etiqueta ser 100% agave tienen proporciones bajas, a excepción de uno que se encuentra cercano a los 100% agave. Lo anterior revela que para los Tequilas blancos, las proporciones de los ésteres 16 y 18,2 pueden estar relacionadas con el origen de la materia prima, conforme aumentan las proporciones de ésteres aumenta la tendencia a que la materia prima sea sólo agave.

Figura 17. Representación gráfica del éster 18,2 en función del éster 16 para los Tequilas blancos

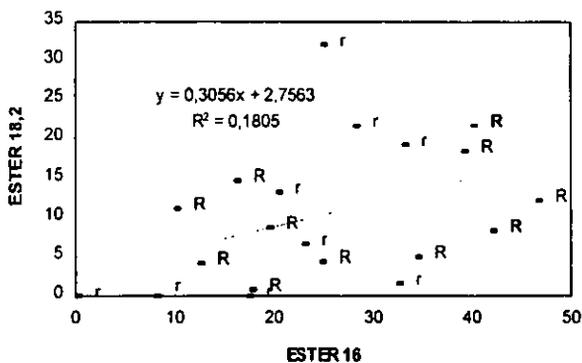


Nota: Las letras minúsculas se refieren a Tequilas blancos comerciales, las mayúsculas a Tequilas blancos 100% agave comerciales y las mayúsculas en negritas a Tequilas blancos 100% agave.

En cuanto a los Tequilas reposados (figura 18), se observa una dispersión muy alta, el coeficiente correlación es muy bajo ( $r = 0.4249$ ), y no existe ninguna separación aparente de las distintas categorías de las muestras estudiadas. Únicamente los Tequilas 100% agave y algunos 100% agave comerciales tienden a estar del lado derecho de la gráfica, presentando proporciones altas del éster 16.

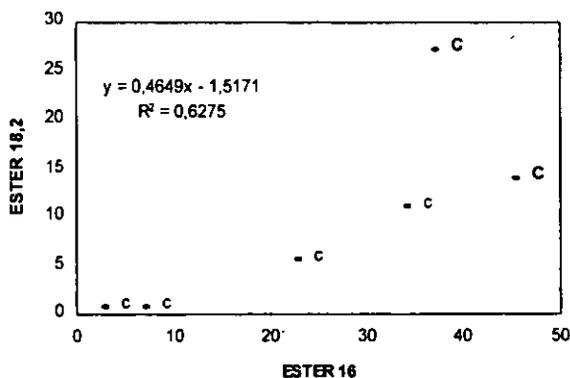
Los Tequilas añejos (figura 19), presentan una distribución semejante a la de los blancos, donde las muestras 100% agave tienen altas proporciones de los ésteres 16 y 18,2, y los comerciales proporciones bajas. En este caso no se contó con muestras 100% agave comerciales. Probablemente la distribución de los Tequilas reposados sería parecida a las de los blancos y añejos, de no haber introducido tantas muestras de marcas relativamente nuevas.

Figura 18. Representación gráfica del éster 18,2 en función del éster 16 para los Tequilas reposados



Nota: Las letras minúsculas se refieren a Tequilas reposados comerciales, las mayúsculas a Tequilas reposados 100% agave comerciales y las mayúsculas en negritas a Tequilas reposados 100% agave.

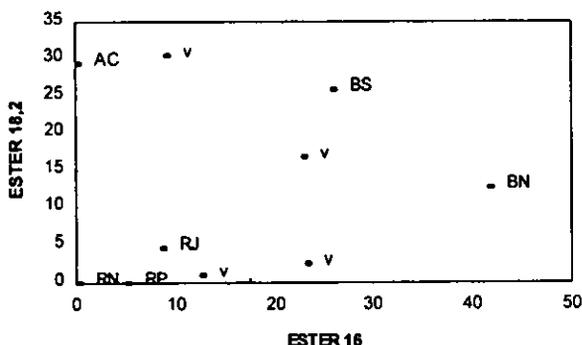
Figura 19. Representación gráfica del éster 18,2 en función del éster 16 para los Tequilas añejos



Nota: Las letras minúsculas se refieren a Tequilas añejos comerciales y las mayúsculas en negritas a Tequilas añejos 100% agave.

En la figura 20, está representada la dispersión de los Tequilas abocados y de las otras bebidas analizadas, también en función de los ésteres 16 y 18,2. Para los Tequilas abocados no existe una distribución clara, aunque coinciden en tener un porcentaje de éster 16 entre 10 y 30%, pero varían en cuanto al éster 18,2. Los rones y el aguardiente presentan menos del 10% el éster 16, el aguardiente se distingue de los rones por tener un alto porcentaje del éster 18,2 en comparación con los rones. El "Bacanora de Sonora" tiene una proporción de éster 18,2 similar a los Tequilas blancos 100% agave, pero una más baja de éster 16 que éstos. El brandy nacional presenta un comportamiento similar a las Tequilas 100% agave sometidos a procesos de reposo o añejamiento.

**Figura 20. Representación gráfica del éster 18,2 en función del éster 16 para los Tequilas abocados y otras bebidas alcohólicas estudiadas**



Nota: La "v" representa a los Tequilas abocados. Los rones nacional, puertorriqueño y jamaicano, están marcados como RN, RP y RJ, respectivamente. Las iniciales AC se refieren al aguardiente de caña, BN al brandy nacional y BS al "Bacanora" de Sonora.

En comparación con los Tequilas blancos, la pendiente de la tendencia de la distribución de los reposados, es mucho más baja y muy parecida a la que presentan los añejos. Esto significa que las relaciones de los ésteres 16/18,2 tienden a aproximarse a uno cuando los Tequilas son blancos, pero cuando son

sometidos a algún proceso de añejamiento la pendiente disminuye, esto implica que el porcentaje del éster 18,2 disminuye, cambiando la relación (aumentándola si se divide la proporción del éster 16 entre la del 18,2). En la tabla 8, se encuentran los intervalos de las relaciones de estos dos ésteres para todas las bebidas analizadas. Todos los Tequilas blancos 100% agave, comerciales o no tienen una relación de éstos ésteres cercana a uno, al igual que el "Bacanora". El resto de las bebidas presentan intervalos más amplios que van desde cero hasta 19. Los intervalos no disminuyen cuando las bebidas son 100% agave, pero considerando esta relación como única información no se puede discriminar al Tequila de otras bebidas, ya que por ejemplo, la relación de estos ésteres que presenta el brandy nacional, o uno de los rones añejos, bien podrían caer dentro de la categoría de Tequila reposado.

**Tabla 8. Intervalos de las relaciones de los ésteres 16 y 18,2 en todas muestras analizadas**

<b>Bebida</b>	<b>Blancos</b>	<b>Reposados</b>	<b>Añejos</b>	<b>Abocados</b>
Tequilas comerciales	1.08-7.11	0.0-18.48	3.07-9.13	0.20-12.57
Tequilas comerciales 100% agave	1.11-1.52	0.0-19.26	*	*
Tequilas 100% agave	1.10-1.19	1.84-5.09	1.35-3.20	*
Aguardiente de caña	0.0	*	*	*
Rones	0.0	*	0.0-1.89	*
Brandy Nacional	*	*	3.32	*
"Bacanora" de Sonora	1.01	*	*	*

Nota: El \* indica que no se analizaron muestras correspondientes a esa categoría. En los casos del aguardiente de caña, ron blanco y brandy nacional añejo no se marca un intervalo sino un sólo dato, debido a que sólo se analizó una muestra.

Otros ésteres analizados fueron el 15 y el 18,1, por estar relacionados con los factores 2 y 3. De acuerdo al análisis de factor el éster 15 parece definir al aguardiente de caña y el 18,1 al brandy nacional, para corroborarlo, se graficaron estos dos por separado contra el éster 16, que como se ha observado en las figuras anteriores parece estar relacionado con el origen la materia prima.

Figura 21. Representación gráfica del éster 15 en función del éster 16

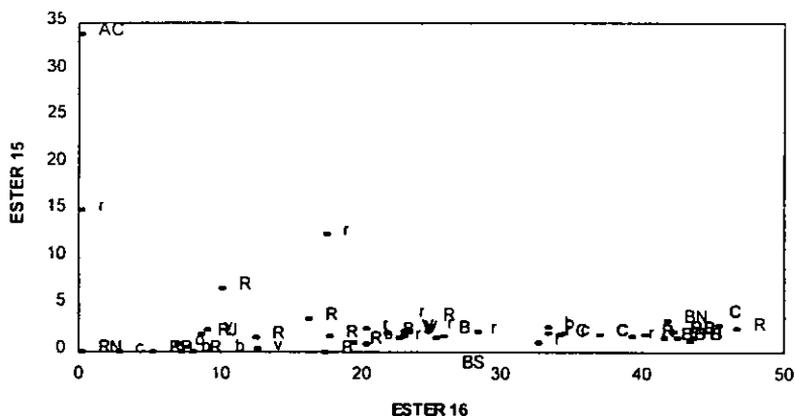
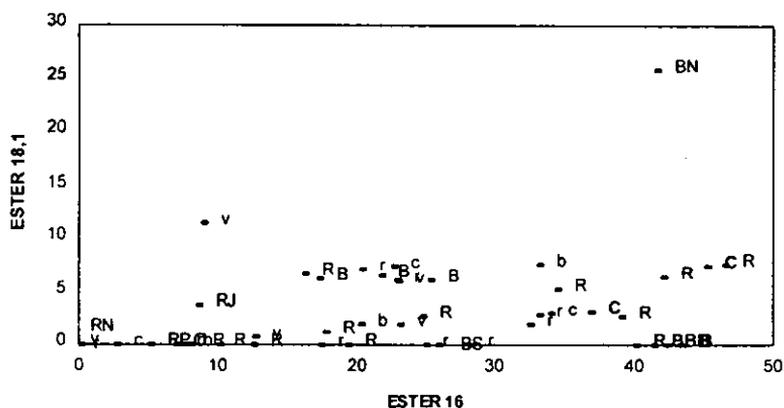


Figura 22. Representación gráfica del éster 18,1 en función del éster 16



NOTA: En las figuras 15 y 16, las letras B, R, C y V, se refieren a Tequilas blancos, reposados, añejos y abocados respectivamente, cuando aparecen en minúsculas representan a Tequilas comerciales, con mayúsculas representan Tequilas comerciales 100% agave y estas mismas letras en negritas señalan a Tequilas de los que se tenía la garantía de que eran 100% agave. Los rones nacional, puertorriqueño y jamaicano están marcados como RN, RP y RJ, respectivamente. Las iniciales AC se refieren al aguardiente de caña, BN al brandy nacional y BS al "Bacanora" de Sonora.

En la figura 21 se observa una separación clara del aguardiente de caña del resto de las bebidas, dada por la concentración del éster 15, no podemos asegurar que éste compuesto sea característico de los aguardientes de caña ya que solo se analizó una muestra de este tipo, lo que si se puede afirmar es que algunos Tequilas reposados, presentan un porcentaje relativamente alto de éste, en comparación con el resto de todos los Tequilas. Esto indica que estos Tequilas reposados fueron elaborados con materias primas o procesos muy distintos a los otros.

El brandy nacional puede ser discriminado fácilmente de todas las bebidas analizadas, considerando el alto porcentaje de éster 18,1 que presenta (figura 22). Aunque por las razones mencionadas en el párrafo anterior, tampoco puede ser una aseveración definitiva.

## IDENTIFICACIÓN DE AZÚCARES EN TEQUILA

Buscando una alternativa más de análisis para cubrir el objetivo general de este trabajo, de manera paralela al estudio de compuestos volátiles se decidió evaluar la posibilidad de utilizar la identificación de azúcares residuales en el producto terminado para determinar el origen de la materia prima con la que había sido elaborado. Se realizó solo un estudio preliminar en seis bebidas:

- 1 Tequila blanco 100% agave
- 3 Tequilas blancos
- 1 aguardiente de caña
- 1 ron blanco

Debido a la baja cantidad de sólidos que contiene el Tequila, fue difícil hacer este estudio cuantitativo, sobre todo por que al liofilizar el residuo acuoso que quedaba después de la destilación (ver metodología), era muy difícil recuperar cuantitativamente todos los sólidos. Sin embargo, con las cantidades recuperadas fue posible identificar los carbohidratos que se presenta en la tabla 9.

**Tabla 9. Presencia de carbohidratos en algunas bebidas alcohólicas**

Muestra	Carbohidrato		
	Fructosa	Glucosa	Sacarosa
Tequila 100% agave	*	-	-
Tequila 1	*	*	-
Tequila 2	*	*	*
Tequila 3	*	*	*
Aguardiente de caña	*	*	*
Ron blanco	*	*	-

NOTA: El símbolo \* indica presencia del azúcar y el - indica ausencia.

Es importante señalar aunque no se mencionan cantidades, por las razones ya expuestas, los azúcares que se encontraron en los Tequilas probablemente se encuentren en concentraciones del orden de microgramos por litro a diferencia del ron y aguardiente donde están en concentraciones de

miligramos por litro. Se abandonó este estudio debido a diversos factores, en primer lugar el tratamiento de la muestra era demasiado tardado y difícil, además se requerían de grandes cantidades de muestra, aproximadamente de un litro de Tequila, a diferencia del estudio de volátiles con la  $\mu$ EFS, donde bastaban 8 ml de muestra para hacer una determinación. En segundo lugar revisando el proceso de elaboración del Tequila, la cantidad de azúcares remanentes en el producto depende de la eficiencia de la destilación, y como cada empresa realiza las dos destilaciones que requiere el Tequila por métodos y en tiempos distintos, esto podría introducir mas variables al estudio. En tercer lugar, tampoco se tiene control de los azúcares que utilizan como adjuntos los industriales que elaboran Tequila no 100% agave, así que no se podría tener un estándar de los compuestos que deberían o no estar. Finalmente en último lugar, en algún momento se pensó que el agave al estar constituido por inulina principalmente<sup>(17)</sup>, los azúcares remanentes en un Tequila 100% agave, deberían ser principalmente fructosa y algunos oligosacáridos de fructosa, sin embargo, el tamaño de los oligosacáridos que se pudieran encontrar o la cantidad de la fructosa va a depender principalmente de la destilación, de la eficiencia de la fermentación y del tipo y tiempo de cocimiento de la piña, y también existe la posibilidad de que al mosto se le adicione jarabe alto en fructosa como adjunto. Sólo contando con técnicas preparativas mas eficientes, que permitieran tener cuantitativamente una cantidad mayor de sólidos en poco tiempo, se podría sugerir este estudio, como un complemento del análisis de volátiles para determinar el origen de un Tequila.

## ANÁLISIS SENSORIAL

### Definición del vocabulario

Aunque el interés de este estudio era evaluar Tequilas blancos donde la diferencia fuera solo el origen de la materia prima (100% agave o mixto), resulta

importante partir de un lenguaje general que tipifique al Tequila. Ya que como se dijo en los antecedentes la calidad de las bebidas alcohólicas ha sido evaluada tradicionalmente por métodos sensoriales y no se encontró mucha información al respecto para el Tequila. En la tabla 10 se encuentran las definiciones a las que llegaron los jueces entrenados para este estudio.

**Tabla 10. Definiciones de descriptores**

Descriptor	Definición
Amargo	Gusto básico percibido por cafeína en solución
Dulce	Gusto básico dado por fructosa en solución, frutal
Ácido	Gusto básico percibido por ácido cítrico en solución
Alcohol	Alcohol de caña, amargo, dulce que provoca una sensación de hormigueo en la lengua
Madera	Sabor que dan diferentes árboles cuando la madera ya está seca
Barro	Sabor de agua almacenada en recipiente de barro, como a humedad con notas terrosas
Mantequilla	Grasa butírica rancia, dulce
Seco	Como la sensación que da el whisky Cutty Sarck
Fruta cítrica	Nota cítrica que recuerda a cualquier fruta cítrica, mezcla de jugo de naranja, limón, toronja y mandarina en volúmenes iguales.
Menta	Sensación de frescura que da el sabor a menta de Taste Maker
Plástico	Nota que da el aroma del plástico de PVC
Hierba Fresca	Sabor que recuerda el aroma de la parte externa de la sávila
Hierva Seca	Sabor que dan las hojas y hierbas secas para cocinar, hierbas de olor (tomillo, laurel, mejorana, albaca)
Fermentado	Sabor que recuerda el aroma que da la levadura para panificación
Quemado	Sabor a tortilla quemada
Fruta	Sabor afrutado de pera y sabor que recuerda el aroma que da la cáscara de manzana roja
Espicias	Mezcla de especias tales como comino, orégano, clavo, pimienta, en igual proporción
Resabio Amargo	Sensación que queda después de que se ha detectado el gusto amargo
Resabio Dulce	Sensación que queda después de que se ha detectado el gusto dulce
Resabio Ácido	Sensación que queda después de que se ha detectado el gusto ácido

NOTA: LOS DESCRIPTORES SE ENCUENTRAN EN EL ORDEN EN QUE LOS JUECES LOS FUERON DEFINIENDO

En algunos casos fue necesario hacer uso de referencias para lograr que los jueces identificaran los diferentes atributos, éstas se crearon en función de lo que los jueces sugerían y lo que nos parecía pertinente para ayudarlos; éstas se

muestran en la tabla 11 y es importante aclarar que no fueron las únicas sino las definitivas que coincidieron con lo que los jueces encontraban en el Tequila.

**Tabla 11. Referencias que se utilizaron para definir los descriptores**

Descriptor	Definición
Amargo	Solución de cafeína 0.03% w/v en solución de Tequila blanco al 20%
Dulce	Solución de fructosa al 0.2% w/v
Ácido	Solución en ácido cítrico 0.04% w/v en solución de Tequila blanco al 20% w/v.
Alcohol	Solución de destilado de Ron Bacardi blanco al 8%
Barro	Agua almacenada un día en un recipiente de barro
Mantequilla	Mantequilla rancia
Seco	Dilución de whisky Cutty Sark al 50%
Fruta cítrica	Mezcla de jugo de toronja, mandarina, naranja y limón en igual volumen
Menta	Esencia de menta "Taste maker" diluida al 0.1%
Plástico	Botella de plástico PVC
Hierba Fresca	Sávila fresca recién cortada
Hierba Seca	Hierbas de olor juntas
Fermentado	Levadura para panificación
Quemado	Tortilla quemada
Fruta	Pera fresca y manzana roja
Espicias	Mezcla de pimienta, clavo, comino y orégano en igual peso , todos molidos

#### Evaluación de muestras

#### Pruebas de Homogeneidad de la varianza

Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza para cada atributo después de corroborar si existía homogeneidad en la varianza. A continuación se presenta la tabla 12 donde se exponen los resultados de las pruebas de Homogeneidad de varianza (Pruebas de Bartlett y Hartley<sup>(10)</sup>), y se observa en todos los casos que la varianza es homogénea por lo que se concluye que si se puede analizar por un análisis de varianza sin la necesidad de tener que transformar los datos.

**Tabla 12. Pruebas de Homogeneidad de la varianza**

Descriptor	Prueba de Bartlett		Prueba de Hartley		Decisión
	Exp	Tablas	Exp	Tablas	
Amargo	1.12544	15.086	3.94118	60	Varianza Homogénea
Dulce	1.05088	15.086	2.42824	60	Varianza Homogénea
Ácido	1.01144	15.086	1.56406	60	Varianza Homogénea
Alcohol	1.20518	15.086	8.34211	60	Varianza Homogénea
Madera	1.02033	15.086	1.77962	60	Varianza Homogénea
Barro	1.01875	15.086	1.8221	60	Varianza Homogénea
Mantequilla	1.1544	15.086	5.75	60	Varianza Homogénea
Seco	1.09802	15.086	3.46756	60	Varianza Homogénea
Fruta citrica	1.05037	15.086	2.66049	60	Varianza Homogénea
Menta	1.01163	15.086	1.64056	60	Varianza Homogénea
Plástico	1.0547	15.086	3.86888	60	Varianza Homogénea
Hierba Fresca	1.01451	15.086	1.73622	60	Varianza Homogénea
Hierva Seca	1.03921	15.086	2.49747	60	Varianza Homogénea
Fermentado	1.05413	15.086	2.73913	60	Varianza Homogénea
Quemado	1.01884	15.086	1.74709	60	Varianza Homogénea
Fruta	1.01962	15.086	1.66356	60	Varianza Homogénea
Especias	1.02325	15.086	1.80217	60	Varianza Homogénea
Resabio Amargo	1.0438	15.086	2.68.465	60	Varianza Homogénea
Resabio Dulce	1.02909	15.086	2.17143	60	Varianza Homogénea
Resabio Ácido	1.01486	15.086	1.64683	60	Varianza Homogénea

Como cada análisis de varianza se analizó por separado se evaluó el efecto que representaban las repeticiones y los jueces, en ninguno de los atributos se encontró que las repeticiones tuvieran efecto, pero sin embargo, en todos se encontró que los jueces tenían efecto, al menos significativo; esto quiere decir que aunque los jueces son reproducibles en sus evaluaciones por separado, entre ellos utilizan la escala de diferente manera o en diferentes intervalos, es decir, algunos dan siempre calificaciones muy bajas y otros muy altos y no se considera que sea por desconocimiento o mal entendimiento del descriptor, por que si no este efecto también se habría observado en las repeticiones. Se considera que el problema radica en el manejo de la escala ya que algunos jueces tienen delimitadas sus escalas de intensidades de diferente manera.

Para cada descriptor se probaron tres diseños: el diseño completamente aleatorio, diseño en bloques y el cuadrado latino. Mediante el cálculo de

eficiencia relativa se determinó el mejor diseño para evaluar la diferencia entre las muestras para cada descriptor. Los resultados del diseño elegido y de los resultados de los valores de F de cada análisis de varianza, se encuentran en la tabla 13, se consideraron niveles de significancia de 0.05 y 0.01 para determinar si entre cada fuente de variación existía diferencia significativa o altamente significativa, o simplemente si no existía diferencia.

**Tabla 13. Conclusiones del Análisis de Varianza para cada descriptor**

Descriptor	Diseño Elegido	Conclusión		
		Muestras	Jueces	Repeticiones
Amargo	Cuadrado latino	**	**	N.S.
Dulce	Cuadrado latino	N.S.	**	N.S.
Acido	Cuadrado latino	**	**	N.S.
Alcohol	Diseño en Bloques	**	**	///////
Madera	Diseño en Bloques	**	**	///////
Barro	Cuadrado latino	*	**	N.S.
Mantequilla	Diseño en Bloques	**	**	///////
Seco	Cuadrado latino	N.S.	**	N.S.
Fruta cítrica	Diseño en Bloques	**	**	///////
Menta	Diseño en Bloques	*	**	///////
Plástico	Diseño en Bloques	N.S.	**	///////
Hierba Fresca	Diseño en Bloques	N.S.	**	///////
Hierba Seca	Diseño en Bloques	*	**	///////
Fermentado	Diseño en Bloques	*	**	///////
Quemado	Diseño en Bloques	**	**	///////
Fruta	Diseño en Bloques	N.S.	**	///////
Especias	Diseño en Bloques	N.S.	**	///////
Resabio Amargo	Diseño en Bloques	*	**	///////
Resabio Dulce	Diseño en Bloques	N.S.	**	///////
Resabio Ácido	Cuadrado latino	**	**	N.S.

NOTA: En el cuadrado latino se involucran con fuentes de variación muestras, jueces y repeticiones; en el diseño en bloques se consideran como fuentes de variación muestras y jueces. SIMBOLOGÍA: \* Denota que hay diferencia significativa, \*\* denota diferencia altamente significativa; N.S. equivale a que no existe diferencia significativa; las líneas diagonales se utilizaron en los casos en que las muestra no se consideraron como fuente de variación.

Con base en la tabla 13 podemos concluir que para la evaluación de todos los atributos tratados existe diferencia altamente significativa entre jueces, esto significa que al menos dos de los jueces utilizan la escala de diferente manera con la probabilidad de equivocarse una vez en cien. Si se quisiera desarrollar una prueba definitiva con este grupo de jueces, sería necesario entrenarlos más en el uso de escalas y estandarizarlos para que todos ocupen

la misma parte de la escala al evaluar una misma intensidad. Aunque los jueces no están calibrados igual, son reproducibles en sus datos, ya que no existe diferencia significativa entre repeticiones, como ya se mencionó; es decir, las repeticiones no tienen efecto en los resultados y se puede decir que los jueces entienden individualmente cada descriptor, aunque grupalmente manejan las intensidades de diferente manera, es como si se obtuvieran resultados de equipos con diferente sensibilidad y algunos detectaron trazas y otros menos sensibles no; posiblemente algunos jueces tengan umbrales más bajos y otros más altos para las sustancias que producen los estímulos involucrados en cada descriptor y es por eso que cada quien plantea su escala sensorial de diferente manera, por ejemplo, alguien que tenga un umbral muy bajo para la nota de madera cuando la perciba en la muestra, posiblemente la califique más alto que una persona que tenga un umbral alto. De cualquier forma el hecho de que exista diferencia altamente significativa en la manera de evaluar entre los jueces no es determinante para que no se puedan analizar los datos entre muestras, ya que al considerar el análisis de varianza en bloques se le está restando al error la variación con la que contribuyen los jueces.

En las muestras se encontró que no existe diferencia significativa en los descriptores dulce, seco, plástica, hierba fresca, fruta, especias y resabio dulce; esto significa que las bebidas analizadas son iguales en estos descriptores y que no son características ni propios del Tequila, ya que se encontraron con la misma intensidad en todas las muestras que incluyen dos aguardientes de caña; posiblemente estas notas sean comunes en ron y Tequila, pero eso solo se sabría si se hicieran las mismas determinaciones involucrando otro tipo de bebidas.

En los descriptores barro, menta, hierba seca, fermentado y resabio amargo existe diferencia significativa entre las marcas, al menos una de las marcas es diferente en la intensidad de estos descriptores. En amargo, ácido, alcohol, madera, mantequilla, fruta cítrica, quemado y resabio ácido existe

diferencia altamente significativa entre las muestras, al menos dos de las muestras son diferentes en las intensidad de estos descriptores.

Se realizaron pruebas de comparación de medias para determinar entre que muestras había diferencia significativa en los descriptores que se encontró diferencia significativa y altamente significativa en los análisis de varianza; en cada caso se utilizaron seis pruebas de comparación múltiple de medias: LSD, Sheffe, Tukey, Bonfferoni, NKS y Duncan; todas se aplicaron con un nivel de significancia de 0.05, ya que al estar analizando datos generados por humanos y la sensibilidad de éstos puede variar por tantas razones como estado de salud, estrés, alimentos ingeridos previamente e incluso el estado de ánimo, no se puede ser tan exigente en el nivel de confianza<sup>(82)</sup>.

En la tabla 14 se encuentra la prueba elegida para cada descriptor y la conclusión a la que se llegó en cada caso.

De la pruebas de comparación múltiple de medias se puede decir que el aguardiente y el ron blanco presentaron menor intensidad en los descriptores: barro, mantequilla, fermentado y quemado, los cuales podrían ser característicos del Tequila en general. Madera, barro, quemado y resabio amargo podrían ser descriptores característicos de los Tequilas 100% agave, ya que ambos Tequilas tanto del que tenían la certeza de que era 100% agave como del que no lo era presentaron estos atributos con mayor intensidad; el descriptor mantequilla podría ser característico de los Tequilas mixtos.

En cuanto a las notas amargo, alcohol, madera, menta, resabio amargo y resabio ácido el aguardiente presenta menor intensidad, por lo que estos descriptores podrían ser característicos de los Tequilas y de los aguardientes de caña añejados como el ron. Sólo un Tequila presenta diferencias significativas muy particulares con respecto al resto de los Tequilas, y de todas las muestras en general este resultó ser mas intenso en: ácido, fruta cítrica y hierva seca, posiblemente estas diferencias se deban mas al proceso que a la materia prima.

**Tabla 14. Pruebas de comparación de medias**

Descriptor	Prueba	Resultados					
Amargo	Duncan	Aguardiente	Mixto2	Mixto1	Ronbco	100%A1	100%A2
Acido	Duncan	Aguardiente	Ronbco	100%A2	100%A1	Mixto1	Mixto2
Alcohol	LSD	Aguardiente	Mixto1	100%A2	Mixto2	100%A1	Ronbco
Madera	Duncan	Aguardiente	Mixto2	Ronbco	Mixto1	100%A2	100%A1
Barro	LSD	Aguardiente	Ronbco	Mixto2	Mixto1	100%A1	100%A2
Mantequilla	Duncan	Ronbco	Aguardiente	100%A2	100%A1	Mixto2	Mixto1
Fruta citrica	Duncan	100%A2	Aguardiente	Ronbco	Mixto1	100%A1	Mixto2
Menta	LSD	Aguardiente	100%A2	Mixto2	Ronbco	Mixto1	100%A1
Hierva Seca	Duncan	100%A1	Mixto1	Aguardiente	Ronbco	100%A2	Mixto2
Fermentado	Duncan	Ronbco	Aguardiente	100%A1	Mixto1	Mixto2	100%A2
Quemado	LSD	Ronbco	Aguardiente	Mixto1	Mixto2	100%A1	100%A2
Resabio Amargo	LSD	Aguardiente	Mixto2	Mixto1	Ronbco	100%A1	100%A2
Resabio Acido	Duncan	Aguardiente	Mixto2	Mixto1	Ronbco	100%A1	100%A2

Nota: Aguardiente se refiere al aguardiente de caña, Ronbco al ron blanco, 100%A 1 y 2 a los Tequilas 100% el 1 del que se tenía garantía de su origen y el 2 al comercial, y Mixto 1 y 2 a los Tequilas mixtos que se evaluaron.

## CONCLUSIONES

De las técnicas de extracción probadas la que tiene mejor recuperación es la de extracción en fase sólida, aunque tiene los inconvenientes de ser la más tardada y con la que se pierden los compuestos más volátiles. Particularmente presenta la ventaja sobre la extracción líquido-líquido de utilizar menor cantidad de disolventes.

En la técnica de extracción en fase sólida es mejor utilizar una mezcla de dos disolventes de distintas polaridades para la extracción que uno solo.

La técnica de microextracción en fase sólida presenta las siguientes ventajas sobre las otras técnicas probadas: evita el uso de disolventes, disminuye el tiempo de análisis, el volumen de muestra y la manipulación de la muestra; permite observar compuestos más volátiles que con las otras técnicas se pierden. El único inconveniente que presenta es que no se pueden hacer extracciones cuantitativas, sin embargo, tiene una reproducibilidad aceptable cuando se emplea un estándar interno.

El Tequila es una mezcla compleja que incluye compuestos con características distintas, por lo que es difícil establecer condiciones específicas con la microextracción en fase sólida, para poder extraer todos sus componentes en la misma proporción.

Los compuestos de la fracción semivolátil del Tequila que se pudieron extraer en mayor proporción con la microextracción en fase sólida son ésteres etílicos de ácidos grasos; el perfil de éstos permitió establecer diferencias entre Tequilas 100% agave, Tequilas y otras bebidas que son elaboradas con materias primas distintas a los agaves, como por ejemplo el ron o el brandy.

Particularmente el hexadecanoato de etilo parece estar relacionado directamente con el origen de la materia prima, y se observa que los Tequilas elaborados solo con agave poseen mayor porcentaje de este compuesto, mientras que bebidas elaboradas con azúcar de caña (aguardiente y rones) tienen bajo porcentaje de éste.

Aunque el brandy nacional que se analizó tiene porcentajes de hexadecanoato de etilo similares a los Tequilas su alto porcentaje de  $\Delta 9$ -octadecenoato de etilo lo hace distinto al resto de las bebidas.

El  $\Delta 9$ - $\Delta 12$ -octadecadienoato de etilo parece estar relacionado tanto en los Tequilas como en los aguardientes de caña con el grado de añejamiento que poseen y la relación es inversa: conforme aumenta el grado de añejamiento en estas bebidas, disminuye el porcentaje de este compuesto en las mismas.

El  $\Delta 9$ - $\Delta 12$ -octadecadienoato de etilo también parece estar relacionado con la materia prima empleada en la elaboración de los Tequilas, siendo los Tequilas 100% agave los que presentan un mayor porcentaje de éste.

La mayoría de los Tequilas blancos analizados, sin importar el origen de su materia prima presentan una relación muy similar de hexadecanoato de etilo y  $\Delta 9$ - $\Delta 12$ -octadecadienoato de etilo.

En los Tequilas reposados y añejos la relación de hexadecanoato de etilo y  $\Delta 9$ - $\Delta 12$ -octadecadienoato de etilo aumenta con respecto a los blancos, también se incrementa cuando los Tequilas no son 100% agave.

Con la metodología empleada la identificación de azúcares residuales en los sólidos del Tequila es poco viable para establecer el origen de la materia prima del Tequila.

Los Tequilas presentan aproximadamente el 10% de sólidos que presentan otras bebidas como el ron y el aguardiente.

Se pudo definir un vocabulario sensorial que da indicios de que es posible diferenciar por metodología sensorial al Tequila de otras bebidas y a Tequilas 100% agave de los que no lo son. Para tener resultados sensoriales definitivos se recomienda continuar con el entrenamiento de jueces.

De acuerdo al estudio evaluación sensorial preliminar realizado, se puede concluir que los descriptores:

- Barro, mantequilla, fermentado y quemado parecen ser característicos de los Tequilas en general.

- Madera, barro, quemado y resabio amargo parecen ser característicos de los Tequilas blancos 100% agave.
- Mantequilla parece ser característicos de los Tequilas no 100% agave blancos.
- Amargo, alcohol, madera, menta, resabio amargo y resabio ácido podrían ser característicos de bebidas alcohólicas sometidas a algún proceso de reposo o añejamiento.

## BIBLIOGRAFIA

1. Rico, B. F. (1995), "El tequila, una bebida mexicana de fama internacional." *Bebidas Mexicanas*. 4 (1), 14.
2. Enciclopedia de México. (1988), Compañía Editora de Enciclopedias de México S.A.. de C.V. SEP. Tomo XIII, 7656-7660.
3. Diario Oficial de la Federación, (1993), Norma Oficial Mexicana. NOM-006-SCFI-1993. Bebidas alcohólicas -Tequila- Especificaciones. México, D. F., Diario Oficial 13 de octubre de 1993.
4. Guía México Desconocido. (1994), "Bebidas Nacionales". Jilguero, S.A. de C.V. (18), 39-41.
5. Alvarez, M, "La Unión Europea dará hoy al tequila denominación de origen. Queda prohibido imitar...", Sección A (Negocios), *Reforma*, 27 de mayo de 1997, 34A.
6. Bebidas Mexicanas, (1998), "Actualización de la Normativa vigente sobre el tequila", *Beb. Mex.*, 7 (1), 38-44.
7. Diario Oficial de la Federación, (1997), Norma Oficial Mexicana. NOM-006-SCFI-1994. Bebidas Alcohólicas -Tequila- Especificaciones. México, D. F., Diario Oficial 3 de septiembre de 1997.
8. Datos de la Exportación Definitiva del Tequila. Fracción País. Fuente: Banco de México
9. CONCAMIN, (1996), "Vida Industrial: El Tequila, México exporta Tequila". *Rev. Industria* Septiembre. 14-29.
10. Garduño, A. (1998), "Consejo Regulador del Tequila A. C" *Beb. Mex.*, 7 (1), 58-59.
11. Alvarez, C J, (1996), "¿Gusta usted un Tequila?", *Inf. Cient. Tecn.*, CONACYT. 18 (232), 44-51.
12. Bebidas Mexicanas, (1996), "La historia del Tequila se entrelaza con la historia de México", *Beb. Mex.*, 5 (1), 4-6.
13. Garduño, A. (1996), "Defensa de la Denominación de Origen del Tequila", *Beb. Mex.*, 5 (1), 7-9.
14. González, FR, (1996), "Consejo Regulador del Tequila, A. C.", *Beb. Mex.*, 5 (1), 33-37
15. Garduño, A. (1996), "Proceso de elaboración del Tequila", *Beb. Mex.*, 5 (1), 10-13.
16. Cedeño, CM, (1995), "Tequila Production". *Crit. Rev. Biotech.*, 15 (1), 1-11.
17. Tellez, MP, (1998), "El cocimiento una etapa importante en la producción del Tequila", *Beb. Mex.*, 7 (1), 19-20.
18. Pinal, ZL y A Gschaeler, (1998), "La etapa de fermentación y la generación de compuestos organolépticos", *Beb. Mex.*, 7 (1), 10-13.
19. Prado, RR y HA Vega (1998), "Importancia de la destilación en la elaboración del Tequila", *Beb. Mex.*, 7 (1), 14-15.
20. García, G M y A López-Munguía, (1993), Bebidas alcohólicas no destiladas, *Biología Alimentaria*, Limusa. México. García, G M, A López-Munguía y R Quintero (Ed) 263-269.
21. Rico, B F, (1995), "Las bebidas alcohólicas (Definición, clasificación y descripción). *Beb. Mex.*, 4 (1), 13.
22. Morrison, WW, (1958), "Wines and Spirits." Penguni Books. Australia., 260-261.
23. Nykänen, L, (1986), "Formation and Occurrence of Flavor Compounds in Wine and Distilled Alcoholic Beverages." *Am. J. Enol. Vitic.*, 37 (1), 84-96.
24. Marfon, LD y A J Maceol, (1986), "The Flavor of Beverages". Elsevier. New York.
25. Incitti, S, A Tommasini y E Palucci, (1980), "Determination of minor volatiles constituents of spirits". *Riv. Soc. Ital. Scien. Aliment.*, 9 (1), 43-50.
26. Aylott, RI, AH, Clyne, AP Fox y DA Walker, (1994), "Analytical strategies to confirm Scotch Whisky authenticity"., *Analyst* (London), 119 (8), 1741-1747.
27. Caceres, I M, A Lopez, L Villanua y J M Caceres, (1981), "Comparative analytical study of imported whysky according to source and years of ageing".; *Anal. Bormat.*, 33 (2), 157-174.
28. Herranz, A, Pde la Serna, C Barro, PJ Martín y MD Cabezudo, (1989), "Aplication of the statistical multivariate analysis to the differentiation of whiskies of different brands". *F. Chem.*, 31 (1) 73-81.

29. Saxberg, BEH, DL Diewer, JL Booker y BR Kowalsky, (1978), "Pattern recognition and blind assay techniques applied to forensic separation of whiskies". *Anal. Chem. Acta.*, 103 (3), 201-212.
30. Sugisak, H y M Yamada, (1975), "Analysis of Whiskies". *J. Soc. Brew. Japan.*, 70 (9) 656-658.
31. Jarosz, M y J Milewskj, (1974), "Some physical and chemical indices of vodka produce in Poland and the URSS". *Przemysl Fermentacyjny i Rolny.*, 18 (3) 13-14.
32. Aylott, RI, G C Cochrane, J N Done, WM Mackenzie y D A Walker, (1987), "Quality assurance in chromatographic whisky analysis". *Anal. Proc.*, 24 (6) 166-167.
33. Schoeneman, RL y RH Dyer, (1968), "Analytical profile of cistern room whiskies". *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 51 (5), 973-987.
34. Raynor, MW, JP Kithinji, IL Davies y KD Bartle, (1991), "Chromatography with supercritical fluids", *Alcoholic Beverages*, Piggot (Ed), 75-83.
35. Hedley, LM y JK Hardy, (1989), "Classification of whiskies by principal component analysis". *Journal of F. Scien.*, 54 (5), pp. 1351-1354, 1358.
36. Martin-Alvarez, PJ, MD Cabezudo, J Sanz, A Herranz, P Serna y C Barro, (1988), "Application of several statistical classification techniques to the differentiation of whisky brands". *J. Scien Food Agric.*, 45 (4), 347-358.
37. Rijke D y R Ter Heide, (1983), "Flavour Compounds in Rum, Cognac and Whisky", *Flavour of Distilled Beverages: Origin and Development*, J. Piggot (Ed), (Ellis Horwood Ltd., Chichester), 192-201.
38. Carter-Tijmstra, JE, (1986), "Whisky flavour compound analysis by gas Chromatography", In Proceedings of the second Aviemore conference on malting, brewing and distilling, held at the Aviemore Centre, Aviemore, Inverness-shire, 413-418.
39. Jounela-Eriksson, P, (1978), "The aroma composition of distilled beverages and the perceived aroma of whisky" *Flavor of foods and beverages*, G Charalambuos, G E Inglett (ED), Academic Press, 339-394.
40. Carter-Tijmstra, JE, (1991), "GC profiles and malt whisky flavour", *Alcoholic Beverages*, Piggot (Ed), 185-192.
41. Etiévant, P y S Issanchou, (1985), "El sabor del vino". *Mundo Científico.*, 8 (76), 36-75.
42. Falque, E, P Darriet, E Fernández y D Dubourdieu, (1995), "Compuestos Aromaticos de un vino por Acoplamiento CG-EM Snifging". *Alimentaria*, Julio-Agostos, 81-85.
43. Noble, AC, (1990) "Use of principal component analysis of wine headspace volatiles in varietal classification", International symposium of oenology on the correlation between the biochemical properties of grape, the techniques of wine-making, and the volatile components of wines. Abril 16-18.
44. Sato, M, N Ramarathnam, Y Suzuki, T Ohkubo, M Takeuchi y H Ochi, (1996), "Varietal differences in the phenolic content and superoxide radical scavenging potential of wines from different sources", *J. Agri, Food Chem.*, 44, 37-41.
45. Ferreira, V, P Fernández, J P Gracia y J F Cacho, (1995), "Identification of Volatiles Constituents in Wines from *Vitis vinifera* var Vidadillo and Sensory Contribution of The Different Wine Flavour Fractions" *J. Sci. Food Agric.*, 69, 299-310.
46. García-Jares, CM, MS García-Martin, N Carro-Mariño y R Cela-Torrijos, (1995). "GC-MS Identification of Volatiles Components of Galician (Northwestern Spain) White Wines. Application to Differentiate Rías Baixas Wines from Wines Produced in Nearby Geographical Regions". *J. Sci. Food Agric.*, 69, 175-184.
47. Pazo, M, C Traveso, P Sánchez y A Vamonde. (1994), "Aplicación de técnicas multivariantes a la identificación de vinos blancos monovarietales de Galicia". *Alimentaria*, Junio, 47-52.
48. Palacios, A T, J Vila, F Caldeón, M J Callejo, B Colomo y J A Suárez, (1995), "Fracción Aromática de vinos tintos con crianza biológica", *Alimentaria*, Julio-Agosto, 57-79.
49. Sanchez, MT, MI López, MJ López y F Tarralbo, (1994), "Evolución durante la maduración del Potencial aromático de vinos blancos jóvenes. (Estudio de la variedad "Moscatel"). *Alimentaria*, Septiembre, 67-69.

50. Jarvis, B, MJ Forster, y WP Kinsella, (1995), "Factors affecting the development of cider flavor". *J. Appl. Bact.* Symposium Supplement, 79, 5S - 18S.
51. Nykänen L Y I Nykänen, (1983), "Rum Flavour", *Flavour of Distilled Beverages: Origin and Development*, J. Piggot (Ed), (Ellis Horwood Ltd., Chichester), 49-63.
52. Pino, J A. (1996), "Los componentes volátiles del aroma del ron". *Alimentaria*, Enero-Febrero, 79-85.
53. Levy, D J y A M Marañón, (1995). "Análisis Estadístico de la variación de los parámetros de los ronones cubanos durante el añejamiento". *Alimentaria*, Enero-Febrero, 87-89.
54. Heide T. (1983), "Recent advances in the knowledge of alcoholic beverages. Food Flavour Symposium. France, Centre de Perfectionnement des Cadres des Industries Agricoles et Alimentaires. Naarden Int. NV, Netherlands, 27-45.
55. Lay-Keow Ng, M Hupé, J Harnois y D Moccia, (1996), "Characterisation of Commercial Vodkas by Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography / Mass Spectrometry Analysis". *J. Sci, Food Agri.*, 70, 380-388.
56. Manjarrez, A y M Llama, (1969), "Cuantificación de los componentes volátiles en tequilas y mezcales por cromatografía en fase de vapor". *Rev. Soc. Quím. Mex.*, enero, 1A-5A.
57. Benn, S M y T L Peppard, (1996) "Characterization of Tequila Flavor by Instrumental and Sensory Analysis". *J. Agric. Food Chem.*, 44 (2), 557-566.
58. Diario Oficial de la Federación, (1985). Norma Oficial Mexicana. NOM-V-25-1985. "Bebidas Alcohólicas destiladas - Brandy- Determinaciones del origen de los alcoholes en los aguardientes de uva y brandies - Espectrometría de masas - Método de Prueba.
59. Laboratorios Nacionales de Fomento Industrial. Dirección de Química y Materiales. (1990), "Método de prueba para certificar el origen de los Tequilas": Perfiles Cromatográficos y Análisis Isotópico de Deuterio. Informe Técnico. Junio de 1990.
60. Laboratorios Nacionales de Fomento Industrial. Dirección de Química y Materiales. (1991), "Método de prueba para certificar el origen de los Tequilas": Estudio de Variables. Septiembre de 1991.
61. Troost, G, (1985), "Tecnología del vino", Ediciones Omega S. A., Barcelona España, 716-750.
62. Amerine, MA, (1954), "Técnicas y problemas en el examen organoléptico de los vinos". *Agricultura*, 23 (272), 702-707.
63. Baker, GA, (1954), "Organoleptic fatings and analytical data for wines analyzed into orthogonal factors", *Food Research*, 19 (6), 575-580.
64. Ough, CS y GA Baker, (1961), "Small panel sensory evaluations of wines by scoring", *Hilgardia*, 30 (19), 587-619.
65. Noble AC, RA Arnold, BM Masuda, SD Pecore, JO Schmidt y PM Stern, (1984), "Progress Towards a Standardized System of Wine Aroma Terminology", *Am J. Enol. Vitic.*, 35 (2), 107-109.
66. Guinard JX, RM Pangborn y MJ Lewis, (1986), "The time-course of astringency in wine upon repeated ingestion". *Am. J. Enol. Vitic.*, 37 (3), 184-189.
67. Dominguez, RME, (1995), "Desarrollo y entrenamiento de un grupo de jueces sensoriales analíticos para la tipificación del vino Mexicano", Tesis UNAM, Fac. Química, México D. F., 30-40, 71-79.
68. Martínez, PJC y MC Santillán, (1995), "Desarrollo de una prueba sensorial descriptiva para la tipificación del vino Mexicano", Tesis UNAM, Fac. Química, México D. F. 46-64.
69. Francis, IL, MA Sefton y PJ Williams, (1992), "A study by sensory descriptives analysis of the effects of oak origin, seasoning, and heating on the aromas of oak model wine extracts", *Am. J. Enol. Vitic.*, 43 (1), 23-30.
70. Mcreedy JM, JC Sonnemann y SJ Lehmann, (1974), "Sensory profiling of beer by a modified QDA Method", *Food Technol.*, Nov, 36-41.
71. Clapperton JF y JR Piggott, (1979), "Differentiation of Ale and lager Flavours by principal components analysis of flavour characterization data", *J. Inst. Brew.*, 85, 271-274.
72. Perry, DR, (1991), "Odour intensities of whisky compounds", *Alcoholic Beverages*, Piggot (Ed), 200-207.

73. Chadwick, SJD, HAG Dudley, (1983), "Can malt whisky be discriminates from blended whisky?. The proog. Amofification of Sor Ronald Fisher's hypothetical tea tasting experiment", *British Med. J.*, 287, 24-31.
74. Jounela-Briksson, P, (1977), Sensory aspects of flavour in alcoholic beverages- the strength and quality of whisky aroma", Olafsson and Taste VI Paris Magnon, J L y P Mac Lead (Ed) Information retrieval Ltd, London, 409-419.
75. Sean, JS, D Howie, SM Burtles, AA Williams y MJ Lewis. (1981), "Sensory and instrumental studies of scotch whisky flavour", In *The Quality of Foods and Beverages. Chemistry and Technology*. Vol I. Charalambous G y G E Inglett (Ed), Academic Press, Inc., New York., 201-223.
76. Moll M y R Flayeux, (1978), "Relationship between physical and chemical analysis and taste testing results with beers", In the *Flavour of Foods an Beverages. Chemistry and Technology*, Charalambous G y G E Inglett (Ed), Academic Press, Inc., New York., 329-337.
77. Amerine, ER, (1954), "Los reultados de la cata del vino y del análisis químico", Primeros estudios para conocer su relación en vinos típicos españoles. Ministerio de Agricultura, Instituto Nacional de Investigaciones Agronómicas, Cuaderno No. 121. Trabajo contenido en el Boletín, No. 31, diciembre 1954.
78. Noble, AC, (1978), "Sensory and instrumental evaluation of wine aroma", In the *Analysis of Foods and Beverages. Headspace Techniques.*, Charalambous G y G E Inglett (Ed), Academic Press, Inc., New York., 203-228.
79. Jackson MG, CF Timberlake, P Bridle y L Vallis, (1978), "Red wine quality: Correlations between colour, aroma an flavour and pigment and other parameters of young Beoujolais"; *J. Sci. Fd. Agric.*, 29, 715-727.
80. Gonzalez-Mendoza, LA, F Díaz-Rodríguez, M Pomar-García y E Arriaga-Alvarez, (1994), "Caracterización de los compuestos olorosos del aroma de vinos de Tnerife mediante la tecnica sensorial del "sniffing", *Alimentaria*, junio, 53-56.
81. Arrhenius, SP, LP McCloskey y M Sylvan. (1996), "Chemical markers for aroma of *Vitis vinifera* Var Chardonnay regional wines", *J. Agric. Food Chem.*, 44, 1085-1090
82. Pedrero, DL y RM Pangborn, (1989), "Evaluación sensorial de los alimentos. Métodos Analíticos", Alhambra S. A. México, D.F., 90.
83. Sandra, P, (1989), "High Resolutio Gas Chromatography", Hewlett-Packard, KJ, Hyver (De).
84. Gordon, MH, (1990), "Principles and applications of gas chromatography in food analysis", Ellis Horwood Limites, England.
85. Etiévant, PX, (1996), "Artifacts and contaminantes in the analysis of food flavor", *Critic. Rev. Food Scien. Nutrit.*, 36 (7), 733-745.
86. Mangas, J, R Rodriguez, J Moreno y D Blanco, (1996), "Volatiles in distillates of cider aged in american oak wood", *J. Agric. Food Chem.*, 44, 268-273.
87. Baek, HH, KR Cadwallader, E Marroquin y JL Silva. (1997), "Identification of Predominant aroma compounds in Muscadine grape juice", *J. Food Scien.*, 62 (2), 249-252.
88. Ferreira, V, M Sharman, JF Cacho y J Dennis, (1996), "New and efficient microextraction / solid-phase extraction method for the gas chromatographic analysis of wine volatiles", *J. Chromat. A.*, 731, 247-259.
89. Zhang, Z, MJ Yang y J Pawliszyn, (1994), "Solid-Phase Microextraction". *Anal. Chem.*, 66 (17) 844A-853A.
90. Arthur, CL y J Pawliszyn, (1990), "Solid Phase Microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers", *Anal. Chem.*, 62, 2145-2148.
91. Zhouyaim, Z y J Pawliszyn, (1993), "Headspace Solid-Phase Microextraction", *Anal. Chem.*, 65, 1843-1852.
92. Yang, X y T Peppard, (1994), "Solid-phase microextraction for flavor analysis", *J. Agric. Food Chem.*, 49, 1925-1930.
93. Steffen, A y J Pawliszyn, (1996), "Analysis of flavor volatiles using headspace solid-phase microextraction", *J. Agric. Food Chem.*, 44, 2187-2193.

94. Steven, B, H Miller, D Miller, J Pawliszyn y CL Arthur, (1992), "Solventless determination of caffeine in beverages using solid-phase microextraction with fused-silica fibers", *J. Chromatogr. Sci.*, 30, 184-191.
95. Coleman, WM, (1996), "A study of the behavior of Maillard Reaction Products Analyzed by Solid-Phase Microextraction- Gas Chromatography- Mass Selective Detection", *J. Chromat. Sci.*, 34, 213-218.
96. Fischer, C y U Fisher, (1997), "Analysis of cork taint in wine and cork material at olfactory subthreshold levels by solid phase microextraction", *J. Agric. Food Chem.* 45, 1995-1997.
97. Peña, A, S Capella y C González, (1995), "Characterization and Identification of the mucilage extracted from Orchid Bulbs (*Bletia campanulata*) by High Temperature Capillary Gas Chromatography (HT-CGC)", *J. High Resol. Chromat.*, 18, 713-717.
98. Franco, M y D Quijano, (1997), "Desarrollo del perfil de sabor del Tequila", Tesis UNAM, Fac. Química, México D. F.
99. Pinhas, ZM, "Fermented Beverages and their flavors - 1 Wine" Flavor Microbiology (Charles C. Thumas, Illinois 1981a) 173-174.
100. Davis, JC, (1973), "Statistics and data analysis in geology", Wiley International Edition New York, NY, Chap. 4,7.
101. Cuadras, CM, (1991), "Métodos de análisis multivariante", Promociones y Publicaciones Universitarias S. A., Bcelona, España, pp 143-232.
102. Pauda, J. (1975), "Paquete estadístico para las ciencias sociales (SPSS): oferta y condiciones para su utilización e interpretación de resultados", El Colegio de México, pp 61-74.
103. Bisquerra AR, (1989), "Introducción conceptual al análisis multivariable", Volumen 1, Promociones y Publicaciones Universitarias, S. A., Barcelona, España, pp 287-329.
104. Comrey, AL, (1985), "Manual de análisis factorial", Ediciones Cátedra, Madrid, España, pp 15-34, 225-250, 263-288.
105. Ennis, DM, H Boelens, H Haring y P Bowman, (1982), "Multivariate analysis in Sensory Evaluation", *Food Tech*, 11, 83-90.
106. Peinado, JM, (1996), "Statgraphics, Conceptos y Aplicaciones, versión 7 y anteriores", Paraninfo, Madrid, España, pp 325-246.