



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“CUANTIFICACIÓN DE ALCOHOLES Y ALDEHÍDOS EN
MEZCAL POR CROMATOGRFÍA DE GASES Y
MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA SEGUIDO DE
CROMATOGRFÍA DE GASES”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

MARÍA GUADALUPE MEDINA VALTIERRA



MÉXICO, D.F.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente PROF: FRANCISCA AIDA ITURBE CHIÑAS

Vocal PROF: JOSEFINA ELIZALDE TORRES

Secretario PROF: ARACELI PEÑA ÁLVAREZ

Suplente 1 PROF: LUZ SANDRA SÁNCHEZ DEL ÁNGEL

Suplente 2 PROF: ERIKA MARÍA RAMÍREZ MAYA

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 101, Departamento de Química Analítica, DEPg, Facultad de Química, UNAM.

Asesor del Tema:

Dra. Araceli Patricia Peña Álvarez

Supervisor técnico:

M. en C. Rocío del Carmen Juárez Ciprés

Sustentante:

María Guadalupe Medina Valtierra

Agradecimientos:

Antes que todo quiero agradecer a Dios por permitirme estar aquí y llevar mi vida con toda la libertad, con fallas y aciertos, pero sobre todo por los maravillosos seres que he conocido y que me han acompañado en mi travesía, de otra forma no pudo haber sido mejor. (Agradezco tratando de dar lo mejor de mí como ser humano).

A mi madre, gracias por estar siempre conmigo, por tus consejos, por tus desvelos, por las lecciones y enseñanzas, por ser mi apoyo incondicionalmente, por aceptarme tal como soy. Gracias por permanecer siempre dando lo mejor de ti, aún cuando la tarea de ser padre y madre a la vez no sea nada fácil. (Agradezco utilizando las armas que tú me diste para enfrentarme a la vida sin decir "no puedo"). Gracias por ser mi madre.

A mis hermanas Fabiola y Mary, por los cuidados y el cariño que siempre me han brindado, por la protección, por la confianza y complicidad, por ser mi guía y brindarme los mejores ejemplos de perseverancia y autenticidad, pero sobre todo por formar al lado de mamá y yo lazos inquebrantables de amistad. (Agradezco depositando en ustedes toda mi confianza, con la seguridad de nunca ser defraudada).

Al amor de mi vida, Diego Armando Jiménez Benítez, gracias por llegar en el momento que menos lo esperaba y en el que más lo necesitaba. Gracias por las grandes lecciones de vida que recibí de ti, la más grande de ellas tu partida. Gracias por ser el ángel que continúa cuidando de mí, hoy sé que en verdad ya nunca más estaré sola. (Agradezco dedicando mi vida a luchar por los sueños que juntos fantaseamos). TE AMO.

A la señora Araceli, al señor Juan, a Yazmín y Vanesa, y a toda la familia Jiménez Benítez, por atenuar el dolor con su compañía y consejos, por hacerme en ocasiones parte de esa familia a la que un día soñé pertenecer, hoy entiendo que una familia no es la que se une por lazos sanguíneos sino por

el amor, ese amor en común seguirá siendo siempre Diego. (Agradezco ofreciéndoles mi amistad de forma sincera e incondicional).

De forma muy especial a mi sobrina Cecilia Mariana, por ser la luz que llegó a mi vida en momentos de oscuridad, por darme la fuerza para continuar y luchar por aquello que una vez di por perdido. Gracias por ser esa motivación para vencer los obstáculos y continuar viviendo bajo mi propia ideología. (Agradezco luchando día a día por la vida que tú me ayudaste a valorar).

A la Dra. Araceli Peña y a la maestra Rocío Juárez, gracias por su paciencia, por su ayuda, esmero y compromiso, por el enorme apoyo y por involucrarse con gran responsabilidad en este trabajo. Sin ustedes indudablemente proyectos como éste no serían posibles. Gracias a ustedes y a todos mis maestros, por compartir sus conocimientos con tanto amor y esmero, por contribuir con una labor tan hermosa, dedicándose en cuerpo y alma a la formación de personas de bien, sin esperar nada a cambio.

A todos mis compañeros de laboratorio 101, por hacer del lugar de trabajo un sitio lleno de tanta armonía y compañerismo.

A mis amigos por formar parte de mi historia, por estar conmigo en los momentos de alegría y dolor.

A todos un millón de gracias.

A la memoria de Diego Armando Jiménez Benítez (†)

Símbolos y abreviaturas

g	Gramo
mg	Miligramo

µg	Microgramo
ng	Nanogramo
m	Metro
mm	Milímetro
µm	Micrómetro
L	Litro
mL	Mililitro
µL	Microlitro
ppm	Partes por millón
ppb	Partes por billón
ppt	Partes por trillón
°C	Grado Celsius
atm	Atmósferas
min	Minuto
rpm	Revoluciones por minuto
%	Por ciento
DE	Desviación estándar
CV	Coefficiente de variación
CG	Cromatografía de Gases
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia
MEFS	Microextracción en fase sólida
HS	Headspace
PDMS	Polidimetilsiloxano
DVB	Divinilbenceno
CAR	Carboxen
PA	Poliacrilato
CW	Carbowax
TPR	Resina templada
DNPH	2,4-dinitrofenilhidracina
TCPH	2, 4,6-triclorofenilohidracina
PFBHA	O-(2, 3, 4, 5,6-pentafluorobencil)-hidroxilamina
<i>E</i>	Isómero Entgegen
<i>Z</i>	Isómero Zusammen
EI	Estándar Interno

ÍNDICE

<i>Capítulo</i>	
<i>Página</i>	
RESUMEN	I
1 INTRODUCCIÓN	1
2 ANTECEDENTES	3
2.1 Mezcal	3
2.1.1 Pasos para la elaboración	4
2.2 Alcoholes	5
2.3 Compuestos carbonílicos	7
2.3.1 Aldehídos y su influencia en la calidad del mezcal.....	7
2.4 Cromatografía de Gases (CG)	9
2.4.1 Métodos de cuantificación	13
2.5 Microextracción en fase sólida (MEFS)	15
2.5.1 Derivatización	20
3 OBJETIVOS	23
3.1 General	23
3.2 Particulares	23
4 DESARROLLO EXPERIMENTAL	24
4.1 Materiales y reactivos	24
4.2 Muestras	25
4.3 Metodología	26
4.3.1 Determinación del porcentaje de etanol en muestras de mezcal	26
4.3.2 Determinación de alcoholes por Cromatografía de Gases	26
4.3.2.1 Determinación de factores de respuesta	26
4.3.2.2 Lavado de ácido silícico	27
4.3.2.3 Procedimiento en muestras de mezcal.....	27
4.3.2.4 Condiciones cromatográficas.....	28
4.3.3 Determinación de acetaldehído	28
4.3.3.1 Preparación del derivatizante	28
4.3.3.2 Procedimiento para la curva de calibración	28

4.3.3.3	Procedimiento para la MEFS en mezcal.....	29
4.3.3.4	Determinación de la concentración de acetaldehído.....	29
4.3.3.5	Condiciones cromatográficas.....	30
4.3.4	Determinación de furfural	30
4.3.4.1	Preparación del derivatizante	30
4.3.4.2	Procedimiento para la curva de calibración	30
4.3.4.3	Procedimiento para la MEFS en mezcal.....	31
4.3.4.4	Determinación de la concentración de furfural.....	31
4.3.4.5	Condiciones cromatográficas.....	31
4.3.5	Análisis estadístico multivariado.....	31
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
5.1	Cuantificación de metanol	32
5.2	Cuantificación de alcoholes superiores.....	35
5.3	Análisis estadístico multivariado de alcoholes	39
5.4	Cuantificación de acetaldehído	41
5.5	Cuantificación de furfural	46
5.6	Análisis estadístico multivariado de aldehídos.....	51
6	CONCLUSIONES	53
7	BIBLIOGRAFÍA.....	55

ÍNDICE DE TABLAS

	<i>Página</i>
Tabla 2.1 Detectores para Cromatografía de Gases	11
Tabla 2.2 Tipos de fibras de MEFS actualmente comercializadas	19
Tabla 4.1 Características de las muestras de mezcal empleadas para la cuantificación de alcoholes superiores, metanol y aldehídos	25
Tabla 5.1 Factores de respuesta de alcoholes superiores y metanol.....	33
Tabla 5.2 Contenido de metanol en muestras de mezcal	34
Tabla 5.3 Contenido total de alcoholes superiores en muestras de mezcal	37
Tabla 5.4 Datos para la curva de calibración de Acetaldehído	43
Tabla 5.5 Concentración de Acetaldehído en muestras de mezcal.....	44
Tabla 5.6 Datos para la curva de calibración de Furfural	47
Tabla 5.7 Concentración de Furfural en muestras de mezcal.....	49

ÍNDICE DE FIGURAS

	<i>Página</i>
Figura 2.1 Estructura química del metanol y alcoholes superiores	6
Figura 2.2 Estructura química del acetaldehído y furfural	9
Figura 2.3 Cromatógrafo de gases	12
Figura 2.4 Esquema del dispositivo comercial de MEFS	16
Figura 2.5 Esquema del proceso de MEFS	17
Figura 2.6 Clasificación de las fibras de MEFS según se produce por adsorción o absorción	19
Figura 2.7 Posibles combinaciones de la MEFS/derivatización	20
Figura 2.8 Esquema del proceso de derivatización y extracción simultánea en la fibra de MEFS.....	21
Figura 2.9 Reacción general efectuada entre los compuestos carbonílicos y el PFBHA.....	22
Figura 5.1 Cromatograma típico de muestras de mezcal para cuantificación de alcoholes superiores y metanol	32
Figura 5.2 Contenido de metanol en muestras de mezcal.....	35
Figura 5.3 Contenido de alcoholes superiores en muestras de mezcal.....	36
Figura 5.4 Contenido total de alcoholes superiores en muestras de mezcal	38
Figura 5.5 Diagrama de dispersión del análisis de componentes principales de alcoholes	40
Figura 5.6 Dendrograma del análisis de cluster de alcoholes	40
Figura 5.7 Cromatograma típico de muestra de mezcal para cuantificación de Acetaldehído por el método de MEFS con derivatización en fibra seguido por CG	42
Figura 5.8 Curva de calibración de Acetaldehído	43
Figura 5.9 Contenido de Acetaldehído en muestras de mezcal	45
Figura 5.10 Cromatograma típico de muestra de mezcal para cuantificación de Furfural por el método de MEFS con drivatización en fibra seguido por CG	46
Figura 5.11 Curva de calibración de Furfural	48

Figura 5.12 Contenido de Furfural en muestras de mezcal 50

Figura 5.13 Contenido de Acetaldehído y Furfural en muestras de
mezcal 51

Figura 5.14 Dendrograma del análisis de cluster de aldehídos 52

RESUMEN

Mezcales comerciales producidos en distintas regiones del país de los estados de Oaxaca, Guerrero, Durango y Jalisco fueron analizados para cuantificar la presencia de alcoholes superiores, metanol, acetaldehído y furfural. Para el caso de alcoholes superiores y metanol la cuantificación se realizó por la determinación de factores de respuesta por Cromatografía de Gases. Los resultados obtenidos se compararon con los límites establecidos por la NOM-070-SCFI-1994, la cual señala que la concentración de alcoholes superiores debe estar entre 100-400 mg/100 mL de alcohol anhidro¹, ya que si se rebasa dicho valor puede representar un riesgo en la salud del consumidor, debido a que son causantes de deficiencias orgánicas y degeneración celular². Para el metanol establece valores de 100-300 mg/100 mL de alcohol anhidro¹, cuya presencia en exceso puede tener efectos tóxicos tales como daños neurológicos y ceguera². En base a estas especificaciones, se encontró que de las 15 muestras analizadas (14 mezcales jóvenes y 1 mezcal añejo) solo 3 están por arriba del máximo establecido por la norma para alcoholes superiores, mientras que para el caso del metanol solo una muestra se encuentra por arriba del límite máximo estipulado.

En el caso de los aldehídos, estos se cuantificaron empleando la técnica de Microextracción en fase sólida (MEFS) con derivatización en fibra seguida de Cromatografía de Gases. Para este caso los resultados obtenidos se compararon con los límites establecidos por las NOM-006-SCFI-2005 y NOM-168-SCFI-2004 encargadas de establecer las especificaciones del tequila y bacanora respectivamente, ya que la norma encargada de establecer las especificaciones del mezcal (NOM-070-SCFI-1994) no contempla sus límites de concentración; estas normas señalan que la concentración de acetaldehído debe encontrarse entre 0-40 mg/100 mL de alcohol anhidro, y el furfural de 0-4 mg/100 mL de alcohol anhidro^{3,4}, pues si se rebasa la concentración de estos compuestos el producto presenta características organolépticas desagradables al consumidor; para el caso del acetaldehído una nota química que brinda un sabor y olor desagradable, y un sabor y olor almendrado para el caso del furfural^{5,6}. En base

a estas especificaciones, se encontró que las 13 muestras de mezcal joven analizadas presentan concentraciones dentro de los límites establecidos para el caso del acetaldehído, mientras que para el furfural solo 2 muestras están por arriba del límite máximo permitido.

INTRODUCCIÓN

El mezcal es una bebida alcohólica tradicional de México, comúnmente comparada con el tequila debido a que se elaboran de manera similar. En México existen alrededor de 200 diferentes especies de agave, sin embargo para la producción de mezcal solo algunas especies son utilizadas, entre las que se encuentran *Agave salmiana*, *A. angustifolia haw*, *A. potatorum zucc*, *A. esperrima jacobi*, *A. weberi cela* y *A. durangensis*, produciendo cada una de ellas mezcales con ligeras diferencias. Cabe mencionar que solo aquellas variedades que crezcan en la región de Denominación de Origen en el país pueden ser utilizadas como materia prima para la elaboración del mezcal⁷. Los estados que cuentan con la Denominación de Origen del mezcal son: San Luis Potosí, Oaxaca, Guerrero, Durango y Zacatecas.⁸

En general, la composición del mezcal y con ella sus características organolépticas son determinadas por la presencia de compuestos tales como los alcoholes, ácidos grasos, aldehídos, cetonas, furanos, terpenos y otros. A su vez la variedad de estos compuestos generados durante el proceso de elaboración dependerán del tipo de microorganismo, de la materia prima y de las condiciones de fermentación.⁷

El etanol por definición es el componente mayoritario en el mezcal, le siguen el metanol y los alcoholes superiores de más de tres átomos de carbono, mientras que los compuestos carbonílicos tales como los aldehídos conforman parte importante de los compuestos minoritarios de dicha bebida.

A pesar de ser una bebida que se consume con frecuencia en nuestro país, existen pocos trabajos enfocados a su análisis, algunos de ellos solo realizan análisis cualitativos en los cuales se identifican algunos de sus componentes, pero son escasos aquellos que llevan a cabo la cuantificación de éstos compuestos.

La importancia de un análisis cuantitativo recae en que algunos de los compuestos presentes en el mezcal deben encontrarse dentro de ciertos límites de concentración, pues de lo contrario pueden causar defectos organolépticos en la bebida o incluso daños en la salud del consumidor. Como

Resumen

ejemplo de estos compuestos se pueden señalar a dos de los mayoritarios que son los alcoholes superiores y el metanol, mientras que en el caso de los compuestos minoritarios se pueden señalar al acetaldehído y furfural.

La finalidad de este trabajo, es precisamente aportar información que ayude a ampliar la perspectiva que actualmente se tiene sobre el mezcal, y brindar bases que contribuyan a futuras investigaciones que enriquezcan la anémica caracterización que se tiene en nuestros días de esta bebida.

ANTECEDENTES

2.1 Mezcal

De acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-070-SCFI-1994 el mezcal es una bebida alcohólica regional obtenida por destilación y rectificación de mostos preparados directa y originalmente con los azúcares extraídos de las cabezas maduras de los agaves previamente hidrolizadas o cocidas, y sometidas a fermentación alcohólica con levaduras, cultivadas o no.

Esta norma establece que para su elaboración se han de utilizar agaves de las siguientes especies: *Agave angustifolia haw* (maguey espadín); *Agave esperrima jacobi*, Amarilidáceas (maguey de cerro, bruto o cenizo); *Agave weberi cela*, amarilidáceas (maguey de mezcal); *Agave patatorum zucc*, amarilidáceas (maguey de mezcal); *Agave salmiana Otto Ex Salm ssp Crassispina (Trel) Gentry* (maguey verde o mezcalero); y otras especies de agave, siempre y cuando no sean utilizadas como materia prima para otras bebidas con denominaciones de origen dentro del mismo estado.¹

La producción de mezcal en México es una actividad principalmente de los estados de Oaxaca, Durango, Zacatecas, Guerrero, San Luís Potosí, Tamaulipas y Guanajuato; con tierras de agricultura de temporal. Distribuidos en casi una tercera parte del territorio nacional, sobre todo durante la época de estiaje, mas de una decena de especies y cultivares de agave cultivados y recolectados se convierten en mezcal.⁹

Clandestinas o legales, las bebidas espirituosas de agave se expresan en las más diversas versiones de sabores y aromas: dulces, ahumados, afrutados, herbáceos, blancos, reposados y hasta añejos.

El mezcal es en la actualidad una Denominación de Origen. La Denominación de Origen del Mezcal (DOM) se gestionó casi 20 años después que la del tequila (DOT) y ambas se reconocieron por fin por la Comunidad Europea, en el último lustro de los noventa. Son las primeras denominaciones de origen mexicanas. El mezcal tiene como territorio protegido los estados de Durango, Zacatecas, San Luís Potosí, Guerrero y Oaxaca.⁸

2.1.1 Pasos para la elaboración

El mezcal es una bebida tradicional obtenida de la fermentación y destilación del jugo de agave. Su producción involucra cinco etapas elementales. (1) Selección de la planta; se emplean agaves cuya edad debe ser no menor de 8 años (8-9 años en promedio). (2) Jima; en esta parte las plantas son cortadas de su base y se realiza la remoción de las hojas para obtener el corazón de la planta, también conocida como "piña" la cual puede llegar a pesar hasta 150 Kg, las piñas son transportadas a la planta de producción donde se procede al "descuartizado", el cual consiste en cortar la piña en cuatro partes antes de proseguir con el siguiente paso. (3) Cocimiento de las "piñas"; se realiza en hornos de piedra calentados a vapor o en autoclaves, paso en el cual los polisacáridos, principalmente los de reserva (fructanos), son hidrolizados térmicamente para obtener un jarabe rico en fructosa, la duración de éste paso es de aproximadamente 72 horas, tiempo tras el cual las piñas son molidas en molinos de piedra para obtener únicamente el jugo. (4) Fermentación; en este paso el jugo de las piñas cocidas se deja reposar en contacto con levaduras nativas de la región o cepas seleccionadas, aquí se realiza la conversión de los azúcares a etanol y otros compuestos como alcoholes con 3 o más átomos de carbono y ésteres. (5) Destilado; en este paso el mosto con un contenido de etanol de 3-6 % v/v aproximadamente, se bombea a los alambiques de cobre calentados mediante vapor, del alambique se pasa el alcohol en forma de vapor al serpentín, el cual es enfriado en una tina de agua fría para posteriormente ser recolectado en tambores. Como pasos posteriores se tienen la graduación del producto final entre 36-55% v/v de alcohol, para que de esta manera pueda procederse al envasado en el caso del mezcal joven.¹⁰

De acuerdo a la Norma Oficial Mexicana sobre bebidas alcohólicas, los mezcales se clasifican en tres tipos basados en el tiempo de maduración después de la destilación. Los mezcales jóvenes son embotellados justo después de la destilación, los reposados permanecen de 2 a 6 meses en barricas para su estabilización, mientras que los añejos son sujetos a un proceso de maduración de por lo menos 1 año. Durante ese tiempo el mezcal adquiere color ámbar y

sabor característico. En ocasiones se adicionan de 1 a 4 larvas de gusano de maguey al mezcal envasado.⁷

2.2 Alcoholes

Los alcoholes son, de forma general, un grupo de compuestos químicos orgánicos caracterizados por la presencia de un grupo –OH (es decir, un átomo de oxígeno unido a uno de hidrógeno), llamado hidroxil. Es este grupo el que, precisamente, les otorga una serie de características especiales.

El alcohol presente en las bebidas alcohólicas es el llamado etanol o alcohol etílico, que posee, además del grupo OH, dos carbonos. Si bien actualmente en nuestro país se somete a las bebidas alcohólicas a exhaustivos controles de calidad, se dan casos en los que éstas se encuentran adulteradas. Es decir, se le añaden determinadas sustancias que diluyen el contenido en etanol propiamente dicho de la bebida, otorgándole una serie de propiedades. Uno de los compuestos químicos que más problemas puede dar es otro alcohol, el metanol, que sólo se diferencia del etanol en que en vez de dos carbonos tiene sólo uno, éste es una sustancia indeseable y en concentraciones superiores a las establecidas por la Secretaría de Salud (100-300 mg/100 mL de alcohol anhidro¹) tóxica para el consumidor de bebidas alcohólicas.¹¹

Éste y otros compuestos se producen durante la fermentación del jugo de agave en el caso del mezcal, son los responsables del aroma del producto final, y dependerán de la materia prima, el tipo de microorganismos y de las condiciones de fermentación. Como ejemplo de estos compuestos se tienen a los alcoholes superiores o también llamados "aceite de fusel", como el propanol, alcohol isoamílico, hexanol, y feniletanol, cuyas repercusiones suelen verse reflejadas en el estado de salud de los consumidores cuando se presentan en cantidades superiores a las que establece por normatividad la Secretaría de Salud (100-400 mg/100 mL de alcohol anhidro¹), pues causan degeneración celular, deficiencias orgánicas especialmente a nivel ocular, sistema nervioso central y hepático². La biosíntesis de éstos compuestos volátiles ocurre por la vía catabólica de los aminoácidos, por reacciones de desaminación y

descarboxilación se obtiene el aldehído que es convertido a alcohol superior por medio de la enzima alcohol deshidrogenasa. Altas concentraciones de alcoholes como el feniletanol y los alcoholes amílicos son deseables, ya que confieren a la bebida aromas florales agradables⁷. Las estructuras químicas de estos compuestos se pueden apreciar en la Figura 2.1.

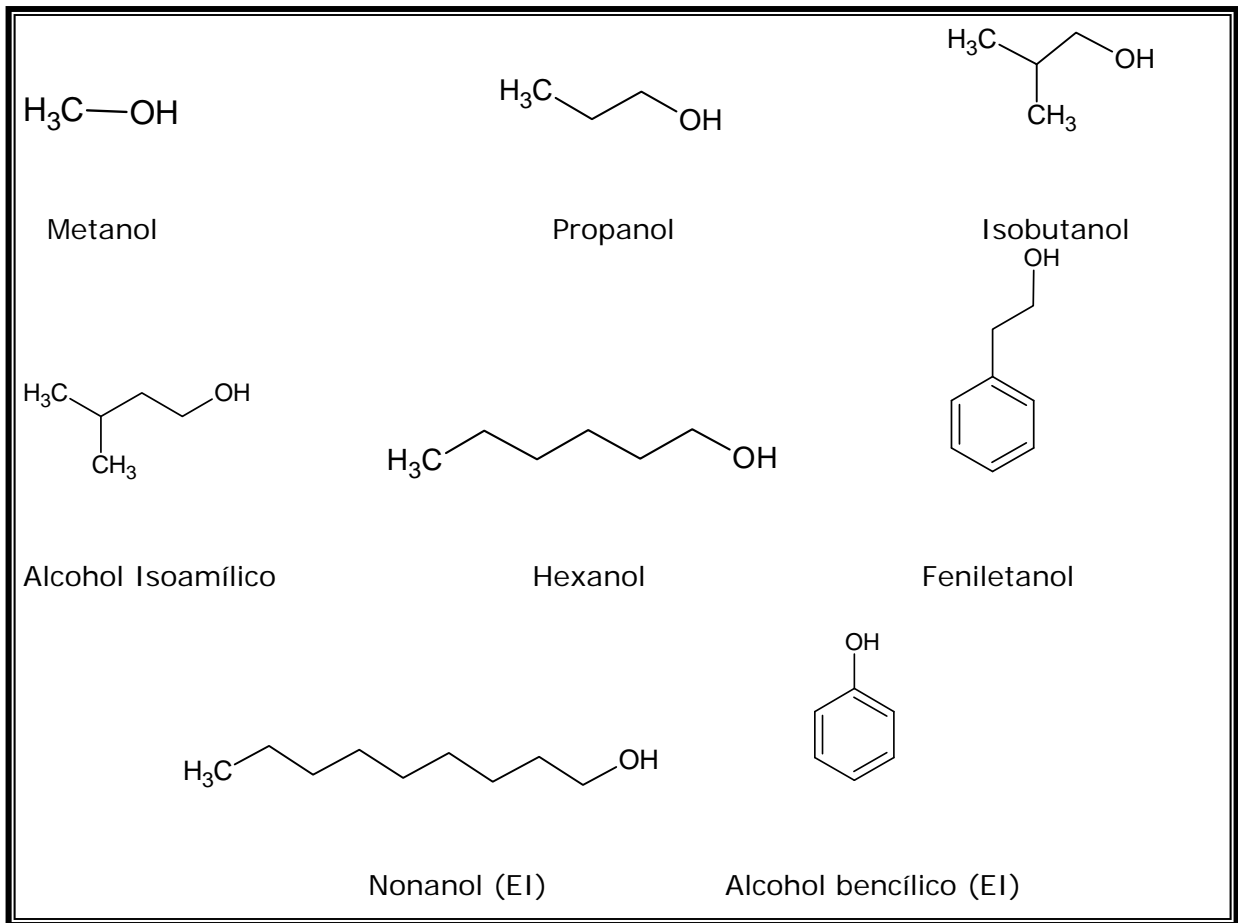


Figura 2.1. Estructura química del metanol y alcoholes superiores

En general se conoce como aceite de fusel en una bebida alcohólica a la suma de los alcoholes más pesados que el alcohol etílico². Éstos son producidos como se mencionó con anterioridad en el paso de la fermentación cuando los azúcares son transformados a etanol, confieren nota alcohólica al producto e influyen en sus características organolépticas al igual que los ésteres de ácidos grasos, aldehídos, cetonas, alcoholes, furanos, terpenos y otros.¹²

2.3 Compuestos carbonílicos

Un compuesto carbonílico es aquel que consta de un átomo de carbono unido por medio de un doble enlace a un átomo de oxígeno.¹³

En bebidas alcohólicas y espirituosas, los compuestos carbonílicos de baja masa molecular (C₁-C₆) están presentes como productos de la fermentación, intermediarios en la formación de aceite de fusel y como resultado de la oxidación de alcohol en varias etapas de la producción de la bebida. Su presencia es baja pero algunos de ellos son responsables de propiedades organolépticas de las bebidas alcohólicas¹⁴. El más importante es el acetaldehído, otros son el propanal, el furfural y la vainillina.

Estos compuestos son los que van a caracterizar los distintos tipos de bebidas destiladas. Hay otros compuestos que producen las diferencias más finas entre ellas, son los compuestos característicos de cada tipo de bebidas destiladas.¹⁵

Los problemas con la determinación de compuestos carbonílicos son causados por:

- (a) Su baja concentración y matrices complejas (en matrices alcohólicas pueden estar presentes más de 15 compuestos carbonílicos).
- (b) Amplio rango de su concentración (niveles de mg/L a ng/L).
- (c) Por su alta reactividad, especialmente en el caso de componentes insaturados.

Las especies carbonílicas pueden ser determinadas por diversos métodos (titulométrico, colorimétrico, enzimático) pero la Cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) y la Cromatografía de Gases (CG) son las técnicas más convenientes.¹⁴

2.3.1 Aldehídos y su influencia en la calidad del mezcal

Los aldehídos son [compuestos orgánicos](#) caracterizados por poseer el [grupo funcional](#) (-CHO), es decir, el grupo carbonilo (-C = O) está unido a un

solo radical orgánico. Estos compuestos se pueden obtener a partir de la [oxidación](#) suave de los [alcoholes](#) primarios.¹³

Los aldehídos son compuestos carbonílicos que se encuentran en la mayoría de las bebidas alcohólicas, se forman como productos de oxidación secundaria en los procesos de añejamiento de las mismas y durante los procesos de fermentación y destilación de los mostos para obtener bebidas alcohólicas¹⁴. Esto sucede mediante una reacción en que cada molécula de aldehído se adiciona a una molécula de alcohol para formar un hemiacetal, que es un compuesto inestable, el cual se combina con una segunda molécula de alcohol y produce un acetal, la reacción es reversible y el acetal formado puede ser hidrolizado a aldehído y alcohol en soluciones alcohólicas diluidas. Ambas reacciones son catalizadas por ácidos, debido a esto, aunque estén presentes ambas sustancias es más frecuente la formación de aldehídos que de acetales.¹³

El formaldehído y acetaldehído son conocidos como carcinógenos en animales y pueden listarse como probables carcinógenos humanos por la Agencia de Protección Ambiental (EPA) y la Agencia Internacional para la Investigación del cáncer (IARC) respectivamente. Por su alta volatilidad y reactividad es usualmente necesaria la derivatización de los aldehídos y su posterior análisis para poder tener una recuperación y sensibilidad satisfactoria.¹⁶

Como ejemplos de los aldehídos que se pueden encontrar en el mezcal tenemos al acetaldehído que es el mayoritario y al furfural, que consta de un anillo de furano unido al grupo aldehído, ambos compuestos le confieren distintas características sensoriales al producto, por ejemplo el acetaldehído produce una nota olfativa y gustativa a manzana verde si se encuentra en una concentración ≤ 40 mg/L, y la intensidad dependerá de la cantidad de acetaldehído presente, mientras que a una concentración ≥ 50 mg/L produce una nota "química" que resulta desagradable al consumidor. Por lo que respecta al furfural, la nota que brinda es la almendrada, pero suele verse más pronunciada en muestras añejadas o reposadas ya que son compuestos cuya concentración suele verse beneficiada cuando la bebida presenta un contacto

por cierto tiempo con la barrica de roble o encino^{5,6,15}. Las estructuras químicas de estos aldehídos se aprecian en el Figura 2.2.

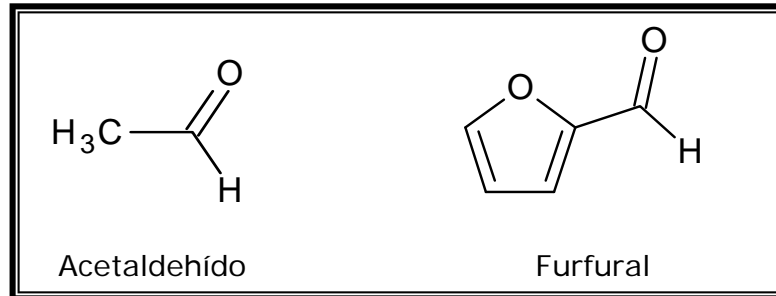
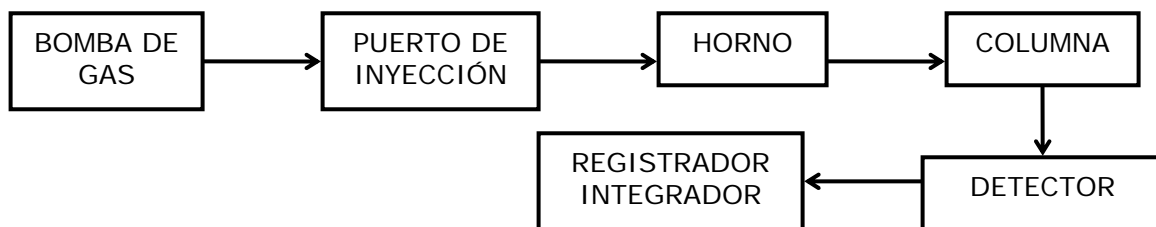


Figura 2.2. Estructura química del acetaldehído y furfural

2.4 Cromatografía de Gases (CG)

La cromatografía es un método de separación en el cual, los componentes de una muestra se distribuyen entre dos fases: una de esas fases es la estacionaria, de gran área superficial, y la otra es un gas (fase móvil) que pasa a través de la fase estacionaria. La muestra es vaporizada y transportada por la fase móvil gaseosa (gas acarreador) a través de la columna. La muestra se reparte (equilibrio) en la fase estacionaria líquida, basándose en la solubilidad a dada temperatura. Los componentes de la muestra (llamados solutos o analitos) son separados uno de otro basándose en su presión de vapor relativa y afinidad por la fase estacionaria. Este tipo de proceso cromatográfico es llamado elución.¹⁷

Un instrumento para cromatografía de gases puede representarse por el siguiente esquema:



- Bomba de gas. Es la parte encargada de distribuir el gas portador, el cual debe ser inerte, por ejemplo el Helio (He). La salida del gas a unas 150-180 atm requiere de una serie de manorreductores, 2 ó 3, en todo caso los suficientes para que la presión no supere las 4 o 5 atm al llegar a la siguiente pieza.
- Puerto de inyección. Es el encargado de introducir la muestra en la columna. Cabe señalar que el volumen muerto del inyector debe ser el menor posible, con el fin de compactar lo más posible la muestra gaseosa y hacer que entre en la columna lo mas junta posible, para así lograr una separación mucho más exacta.
- Horno. Es una cavidad cuya función consiste en mantener la temperatura deseada, que dependiendo del programa nos puede interesar que permanezca constante, o bien que varíe de una forma u otra con el tiempo. La columna se encuentra dentro de esta cavidad.
- Columna. Es el lugar donde ocurre la separación. Se dice que es el corazón de un cromatógrafo. Los materiales con los cuales generalmente se pueden elaborar las columnas son: cobre, aluminio, acero inoxidable, vidrio ó teflón. El relleno puede ser un sólido, ó un líquido recubriendo un sólido. En ésta se pueden señalar básicamente dos constituyentes importantes:
 - ▲ Fase estacionaria. Puede ser un sólido o un líquido dispuesto sobre un sólido que actúa como soporte, de gran área superficial. Deberá mojar bien el soporte, sea relleno o sea pared interior de tubo, asegurándose en lo posible que la adherencia soporte-fase estacionaria sea suficiente para evitar que la fase móvil arrastre a la estacionaria, provocando una mala distribución de la misma en la columna. Además, debe formar capas lo más uniforme posible.
 - ▲ Fase móvil. La fase móvil es un gas, por lo cual se le conoce con el nombre de "gas portador", el cual cumple básicamente dos propósitos: transportar los componentes de la muestra, y crear una matriz adecuada para el detector. Un gas portador debe reunir ciertas condiciones: debe ser inerte para evitar interacciones (tanto con la muestra como con la fase estacionaria), debe ser capaz de minimizar la difusión gaseosa, fácilmente disponible, puro, económico y adecuado al detector a utilizar.

A la salida de la columna se encuentra el detector.

- **Detector.** Es un dispositivo para revelar la presencia de las sustancias eluidas a la salida de la columna cromatográfica. A esta parte se le conoce como los "ojos" de un cromatógrafo. El Detector es un dispositivo capaz de convertir una propiedad física, no medible directamente, en una señal elaborable y ofrecernos información sobre la naturaleza y magnitud de la propiedad física. En cromatografía un detector funciona comparando una propiedad física entre el gas portador puro y el mismo gas portador llevando cada uno de los componentes que previamente se han separado en la columna, esta acción se traduce en una señal tipo eléctrica, que posteriormente se amplificará mediante el registrador. En la Tabla 2.1 se enumeran algunos de los detectores más comunes en cromatografía de gases.^{18,19}

Tabla 2.1. Detectores para Cromatografía de Gases

Tipo	Fundamento
Conductividad térmica	Mide la conductividad térmica del gas portador, ocasionada por la presencia de sustancias eluidas.
Ionización de flama	Basado en la medida de las variaciones de la corriente de ionización en una llama oxígeno-hidrógeno debido a la presencia de sustancias eluidas.
Captura de electrones	Basado en la electronegatividad de las sustancias eluidas, y su habilidad para formar iones negativos por captura de electrones.
Fotometría de flama	Basada en la medida de la intensidad de la emisión molecular de la fluorescencia de heteroátomos en las moléculas orgánicas.
Ionización de flama alcalina (termoiónico)	Basado en la medida de las variaciones de la corriente de ionización en una llama en la que se ha vaporizado una sal de un metal alcalino.
Espectrómetro de masas	Basado en la medición de los iones de las moléculas con cierta relación masa- carga.

- Registrador gráfico ó integrador. Es el encargado de mostrarnos la salida de los componentes, normalmente en gráficas en forma de picos.¹⁹

En forma general, el método consiste en la introducción de la muestra (constituida por una mezcla de sustancias volátiles) con una microjeringa a través de un septum de goma, en el inyector de un cromatógrafo de gases en el que son vaporizadas y transportadas por un gas inerte a través de una columna empacada o capilar con un líquido de partición que presenta solubilidad selectiva con los componentes de la muestra, ocasionando su separación.

Los componentes que eluyen de la columna pasan uno a uno por el "detector", el cual genera una señal eléctrica proporcional a su concentración, la que es transformada por el registrador, integrador o sistema de manejo de datos en una gráfica de concentración en función del tiempo llamada cromatograma¹. Su funcionamiento se ilustra mejor en la Figura 2.3.

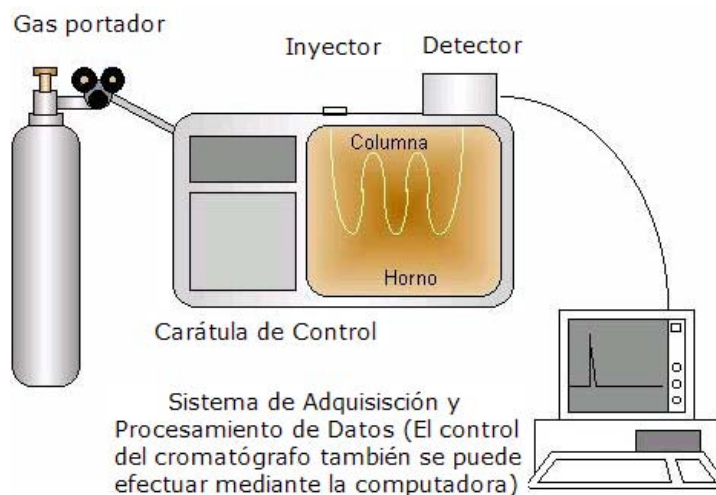


Figura 2.3. Cromatógrafo de gases¹⁹

Un cromatograma idealmente, se trata de picos gaussianos y cada pico corresponde a un componente de la muestra original. El integrador (o el software de control) calcula además el área correspondiente a cada pico, la cual es proporcional a la cantidad de analito.²⁰

La identificación de cada componente registrado como un pico en el cromatograma, se realiza por la inyección del o de los componentes que se sospecha contiene la muestra en forma pura y en las mismas condiciones que la muestra, midiendo el tiempo de retención en esas condiciones. También se puede comprobar por adición del componente a la muestra e inyectándola nuevamente para apreciar al incremento de altura o área del pico correspondiente.

Un análisis cuantitativo puede realizarse mediante distintos métodos tales como: normalización de área, normalización de área con factores de respuesta, estandarización externa, estandarización interna y adiciones patrón.¹⁹

2.4.1 Métodos de cuantificación

Los métodos más comunes para conocer la concentración del analito son:

- Adiciones patrón. Éste método es aconsejable cuando se quiere asegurar la correcta similitud entre el comportamiento de patrones y el problema. En las muestras complejas o con matrices difícilmente reproducibles en los patrones (alimentos, muestras biológicas o medio ambientales).

Son métodos para estandarizar y analizar dentro de la propia matriz de la muestra (calibración metodológica "in situ").

Consiste en preparar los patrones con la misma muestra a analizar y añadir una cantidad conocida de la especie química a determinar. A cierto número de alícuotas de la muestra real se la añaden concentraciones crecientes, por ejemplo de 0 a 5 unidades arbitrarias, del estándar puro del analito. Todas ellas contienen una concentración de analito que es la suma de la original (se busca) y la añadida. Se someten las alícuotas de muestras reales enriquecidas al proceso analítico, obteniéndose una señal para cada alícuota. Se representan las señales en función de la concentración del estándar añadido. Se obtendrá una recta de calibrado paralela a la que se obtendría con los estándares puros. La señal sobre el eje de ordenadas es la que origina la muestra no enriquecida. La concentración de analito en la muestra

se obtiene por extrapolación de la recta de calibrado, su cruce con la prolongación del eje de abscisas proporciona el dato buscado.²¹

- Normalización de áreas. Este método es aconsejable únicamente cuando se trabaja con familias homologas, por ejemplo ésteres etílicos y alcoholes. Consiste en preparar disoluciones de la mezcla de analitos a distintas concentraciones, las cuales se inyectan para obtener los cromatogramas correspondientes, a partir de los cuales se obtienen las sumas de las áreas para cada uno de los analitos, los cuales se manejan como un total (100%). Se inyecta la muestra a cuantificar y el área del analito se relaciona con el total, esto es por medio de una regla de tres, cuyo valor será el por ciento del analito en la matriz.
- Normalización de áreas con factores de respuesta. Se emplea para disminuir errores con respecto al método de normalización de área. Su metodología es muy similar a la normalización de área. Consiste en preparar disoluciones de la mezcla de analitos a distintas concentraciones, las cuales se inyectan para obtener los cromatogramas correspondientes, a partir de los cuales se obtienen las sumas de las áreas para cada uno de los analitos, los cuales se manejan como un total (100%). Se inyecta la muestra a cuantificar y el área del analito se relaciona con el total, esto es por medio de una regla de tres, cuyo valor será el por ciento del analito en la matriz. Una vez obtenidos estos resultados se obtienen los factores de respuesta realizando la relación $\text{área del compuesto/peso del compuesto} = \text{Factor de respuesta}$. Éste ha de tratarse como el área modificada a partir de la cual se obtiene el por ciento real del analito en la muestra.
- Estándar externo. Este método consiste en la comparación de las señales de la muestra con un conjunto de señales que ofrecen individualmente "muestras de calibración", (disoluciones patrón). Los estándares de diferente concentración del analito han sido preparados artificialmente para que su matriz sea semejante a la de la muestra real. No deben usarse estándares puros, ya que puede conducir a errores sistemáticos importantes. Se someten al proceso analítico las muestras de calibración y la muestra problema de forma independiente.

El conjunto de las señales de calibrado permite establecer una relación inequívoca entre la señal y la concentración de analito, que comúnmente se denomina "recta de calibrado" y que idealmente es una relación lineal señal-concentración en el intervalo dado de concentraciones. La concentración de analito en la muestra se consigue por interpolación en dicha recta.^{19, 22, 23}

- Estándar interno. Este método es aconsejable cuando se requiere minimizar fluctuaciones instrumentales. Consiste en obtener el cromatograma de la muestra estandarizada, o sea adicionada de una sustancia llamada estándar interno que deberá aparecer en un sitio del cromatograma, libre de traslapes y desde luego no deberá ser componente de la muestra, aunque es recomendable que sea de la misma naturaleza química y del mismo rango de concentración que el componente de la muestra por cuantificar. Deberán obtenerse cromatogramas paralelos con soluciones de concentración conocida de cada componente por cuantificar y del estándar interno que sea el adecuado al tipo de muestra y trazar una curva de calibración que tenga por ordenadas la relación de concentraciones correspondientes al componente por cuantificar y al estándar interno.

Esta curva servirá para situar en sus ordenadas, la relación de áreas correspondientes al componente por cuantificar y al estándar interno del cromatograma de la muestra estandarizada y así ubicar la relación correspondiente de concentraciones.¹

2.5 Microextracción en fase sólida (MEFS)

La microextracción en fase sólida (MEFS o, en inglés, SPME) es una técnica preparativa que permite concentrar y aislar analitos de una muestra, que se adsorben o absorben a unas fibras con un determinado recubrimiento. La cantidad de analito extraído viene determinada por su coeficiente de partición entre la muestra y el material que recubre las fibras.

Esta técnica representa una respuesta potencial a muchos de los problemas encontrados en análisis traza. El método, inventado a principios de los noventa por el profesor de la Universidad de Waterloo en Ontario Canadá,

Janusz Pawliszyn, se basa en la extracción de los analitos de la matriz de la muestra mediante una fibra de sílice fundida que está recubierta de un sorbente en la mayoría de los casos polimérico, seguida de la desorción de los analitos mediante temperatura o un disolvente orgánico. El pequeño tamaño de la fibra y su geometría cilíndrica permiten incorporarla en una jeringa lo cual facilita su manipulación y protege a la fibra cuando no se utiliza dentro de la aguja de la jeringa²⁴. Este dispositivo se ilustra en la Figura 2.4.

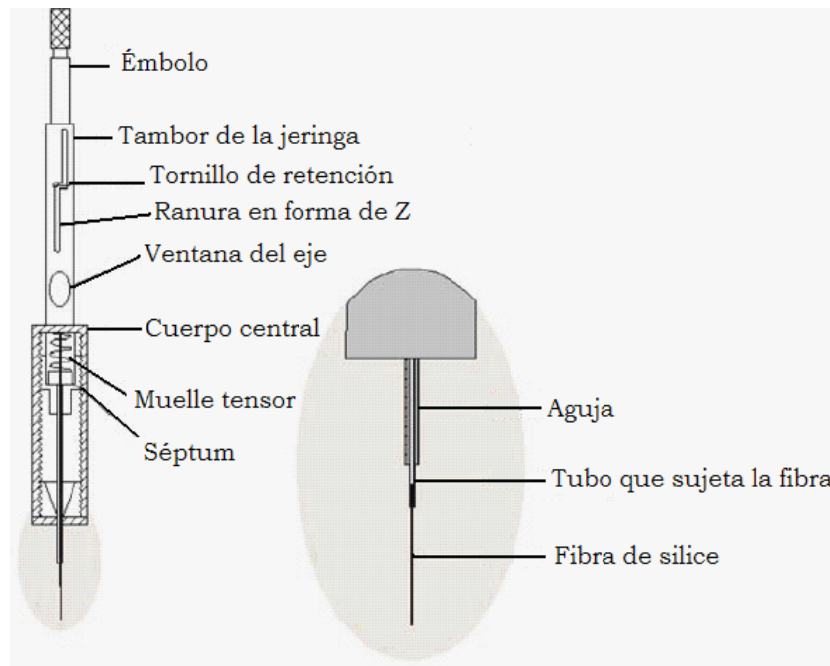


Figura 2.4. Esquema del dispositivo comercial de MEFS²⁵

La técnica en general consiste en poner en contacto la muestra con una fibra de sílice fundida recubierta con un material adsorbente; la muestra se coloca en un vial cerrado, se perfora el septum, se expone el material adsorbente a la muestra (en agitación) durante un período de tiempo determinado, puede ser de forma directa o en el espacio de cabeza (headspace), se retira el material adsorbente, se saca la jeringa del vial, se perfora con la jeringa el inyector de un cromatógrafo de gases, se expone a la temperatura el material adsorbente y los analitos se desorben dentro del inyector. La desorción es total y la fibra es re-usable, con una vida útil de más de 50 inyecciones.

También se puede utilizar la MEFS con un cromatógrafo de líquidos (HPLC), en cuyo caso la desorción se produce en la válvula de inyección²⁵. El proceso de MEFS se ilustra en la Figura 2.5.

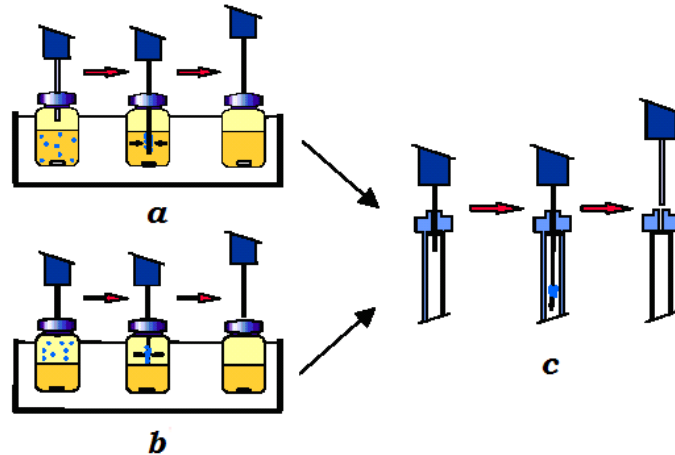


Figura 2.5. Esquema del proceso de MEFS: (a) inmersión directa; (b) MEFS-headspace; (c) desorción térmica en CG²⁵

Las técnicas más conocidas para la extracción de compuestos orgánicos de una muestra son purga-y-trampa o métodos headspace para concentración de volátiles, y extracción líquido-líquido, extracción en fase sólida y extracción por fluido supercrítico para compuestos semi-volátiles o no volátiles. Estos métodos presentan varios inconvenientes, incluyendo alto costo y tiempos de preparación excesivos.

La microextracción en fase sólida constituye una alternativa conveniente a las técnicas de extracción comúnmente usadas (especialmente extracción líquido-líquido) por presentar las siguientes ventajas:

- ▲ Gran simplicidad
- ▲ Bajo costo
- ▲ Utiliza pequeños volúmenes de muestra
- ▲ No necesita disolventes orgánicos
- ▲ Fácilmente transportable
- ▲ Útil para todo tipo de muestras (gaseosas, líquidas y sólidas)
- ▲ Posibilidad de automatización

- ▲ Permite la concentración de compuestos volátiles y semivolátiles y su límite de detección puede ser muy bajo del orden de ppt, lo que demuestra la sensibilidad de esta técnica.

Mientras que sus principales desventajas son:

- ▲ Limitada capacidad de las fibras: debido a que contienen una cantidad de recubrimiento muy pequeña.
- ▲ La presencia de materia suspendida en la muestra puede estropear el recubrimiento de la fibra cambiando sus propiedades.
- ▲ La formación de burbujas de gas en la superficie de la fibra puede afectar a la tasa de transferencia de masa.
- ▲ Pueden aparecer problemas de sensibilidad. La sensibilidad de la técnica de MEFS depende de la cantidad de analitos extraídos de la muestra; si el volumen de la muestra es muy elevado, será demasiado superior al producto entre la constante de distribución y el volumen de recubrimiento de la fibra y, por tanto, aunque se aumente el volumen de muestra no se consigue aumentar la sensibilidad.²⁶

La aplicación de la MEFS al análisis de cualquier compuesto requiere conocer bien la técnica: los tipos de fibras, los distintos factores que afectan a la misma, así como su posible acoplamiento a los diferentes instrumentos de análisis existentes o automatización. Se ha utilizado en análisis clínico, forense, alimentario, medioambiental, biomédico, etc. con gran éxito, aunque su área de aplicación por excelencia sigue siendo el análisis medioambiental.²⁷

Varios son los tipos de fibras actualmente comercializadas lo que hace que el campo de aplicación de la MEFS sea amplio. Las primeras fibras comercializadas, creadas para trabajar con CG, fueron las de polidimetilsiloxano (PDMS) -adecuadas para analitos no polares- y las de poliacrilato (PA) – apropiadas para analitos polares-. Posteriormente surgieron las fibras que combinan divinilbenceno (DVB), carboxen (carbono activo), carbowax

(polietilenglicol) y resina templada (TPR) como son las de PDMS/DVB, CW/TPR, CW/DVB, CAR/PDMS y DVB/CAR/PDMS. La elección del tipo de fibra depende de la naturaleza físico-química del compuesto a extraer. Todas ellas se comercializan con distinto espesor, tal como se muestra en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2. Tipos de fibras de MEFS actualmente comercializadas

Tipo de fibra	Espesor (μm)	Uso
PDMS	7, 30, 100	CG y HPLC
PDMS/DVB	60, 65	CG y HPLC (60 μm)
DVB/CAR/PDMS	50/30	CG
CAR/PDMS	75, 85	CG
PA	85	CG y HPLC
CW/DVB	65, 70	CG
CW/TPR	50	HPLC

La gran mayoría de las fibras comercializadas puede utilizarse en combinación con CG (desorción térmica) y, en menor número, con HPLC (desorción con disolventes) ²⁶. La extracción de los analitos de la muestra mediante las fibras de PDMS se debe principalmente a un fenómeno de absorción aunque algunos autores han indicado que la extracción de algunos analitos (sobre todo si son muy polares) puede realizarse vía adsorción ya que existe una cierta competitividad entre ambos efectos. En la Figura 2.6 se clasifican las fibras comerciales según si el proceso de extracción se produce mayoritariamente por absorción o adsorción.

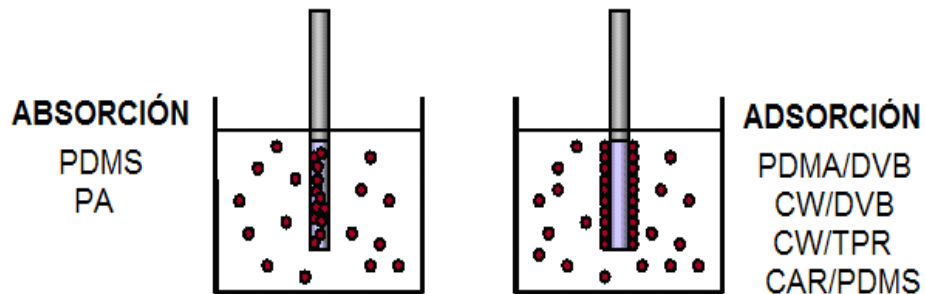


Figura 2.6. Clasificación de las fibras de MEFS según se produce por adsorción o absorción ²⁵

2.5.1 Derivatización

La determinación de compuestos polares presenta un mayor problema en el análisis medioambiental. Estos analitos generalmente son muy difíciles de extraer y separar mediante CG. La derivatización de estos compuestos para formar compuestos menos polares es una alternativa frecuentemente utilizada para intentar resolver este problema. Así, la MEFS puede ser combinada con la derivatización de diferentes maneras²⁵. La Figura 2.7 resume diferentes modos en los que la etapa de derivatización puede ser combinada con la MEFS.

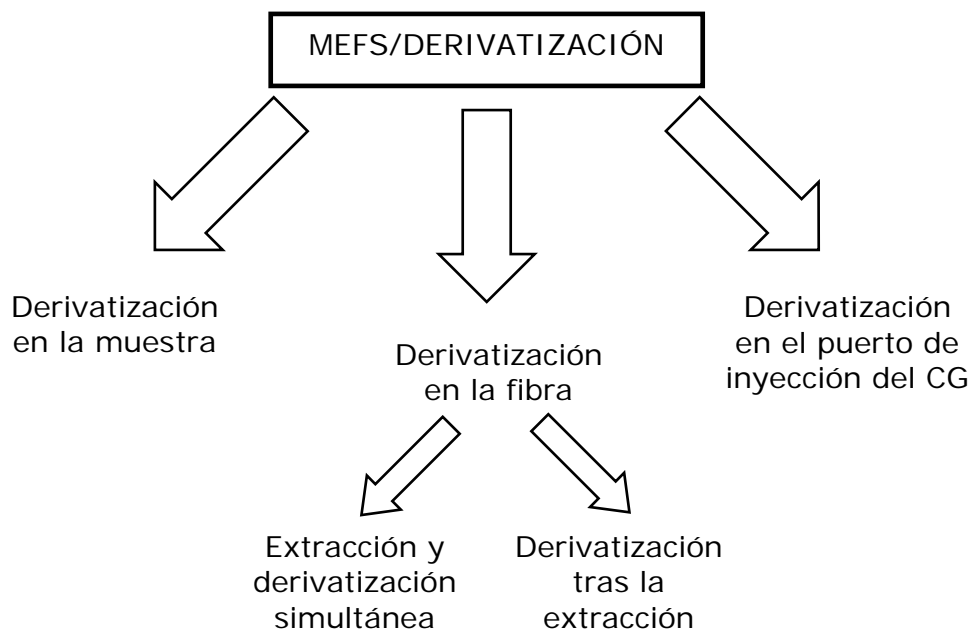


Figura 2.7. Posibles combinaciones de la MEFS/derivatización²⁵

En GC, la derivatización de los analitos es una práctica usual para aumentar su volatilidad y/o reducir su polaridad pudiendo mejorar así tanto la eficacia de la extracción de la muestra real, como su separación cromatográfica y la respuesta del detector. Estos procesos de derivatización pueden llevarse a cabo en las fibras de MEFS. El método más utilizado consiste en derivatizar directamente los analitos por adición del agente derivatizante a la propia matriz y la posterior extracción de los analitos derivatizados utilizando la fibra. También puede llevarse a cabo la derivatización sobre la fibra de MEFS: una vez

completado el proceso de extracción, la fibra, con los analitos extraídos, se pone en contacto con el agente derivatizante. En este sentido, es recomendable que la derivatización se haga, si es posible, en el modo headspace (HS-MEFS), para evitar posibles daños de la fibra. De la misma forma, también puede llevarse a cabo simultáneamente la extracción y la derivatización. En este caso, la fibra se sumerge durante un cierto tiempo en una disolución concentrada del agente derivatizante, de forma que quede recubierta con el mismo y la reacción de derivatización se produce sobre la superficie de la fibra simultáneamente con la extracción (no se trata de un proceso de equilibrio). La derivatización puede también llevarse a cabo en el inyector del cromatógrafo. A medida que los analitos y el agente derivatizante (extraído conjuntamente) son térmicamente desorbidos de la fibra, se produce la reacción de derivatización en el propio inyector a alta temperatura.

Hay que tener en cuenta que, en general, los procesos de derivatización suponen el introducir un paso más en el pre-tratamiento de muestra y, en algunos casos, presentan una baja reproducibilidad y repetibilidad, lo que hace que muchas veces este tipo de procesos tiendan a evitarse. Además, encontrar un agente derivatizante apropiado y que a su vez pueda ser utilizado con las fibras en alguna de las tres formas anteriores no es fácil²⁸. La Figura 2.8 nos esquematiza la forma de derivatización y extracción simultánea en la fibra de MEFS.

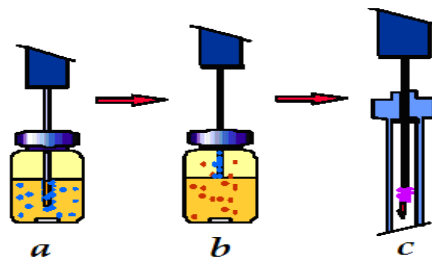


Figura 2.8. Esquema del proceso de derivatización y extracción simultánea en la fibra de MEFS: (a) extracción; (b) derivatización; (c) desorción térmica en CG²⁵

Cuando se emplea éste método se elige un compuesto llamado “agente de derivatización”. Específicamente para los compuestos carbonílicos se emplean

por lo común cuatro agentes de derivatización que son: 2,4-dinitrofenilhidracina (DNPH), 2, 4,6-triclorofenilohidracina (TCPH), cisteamina (2-aminoetanol) y *O*-(2, 3, 4, 5,6-pentafluorobencil)hidroxilamina (PFBHA). Los tres primeros son empleados cuando la derivatización se realiza en solución, los derivados formados son hidrazonas y tiazolidinas. El PFBHA se emplea cuando se pretende realizar la derivatización en fibra, los derivados formados son oximas los cuales son extraídos anteriormente al análisis por Cromatografía de Gases. Recientemente, el procedimiento recomendado para la determinación de aldehídos y cetonas, se basa en la derivatización con PFBHA y Cromatografía de Gases con detección de captura de electrones, que puede ser adaptado a soluciones alcohólicas. En el caso particular del PFBHA se ha encontrado que éste reacciona con las especies carbonilo (R_1COR_2) produciendo dos isómeros de la oxima (*Z*, *E*) cuando los grupos alquilo R_1 y R_2 son diferentes. Usualmente estos dos isómeros pueden ser separados cromatográficamente^{13,14}. Estas reacciones se aprecian en la Figura 2.9.

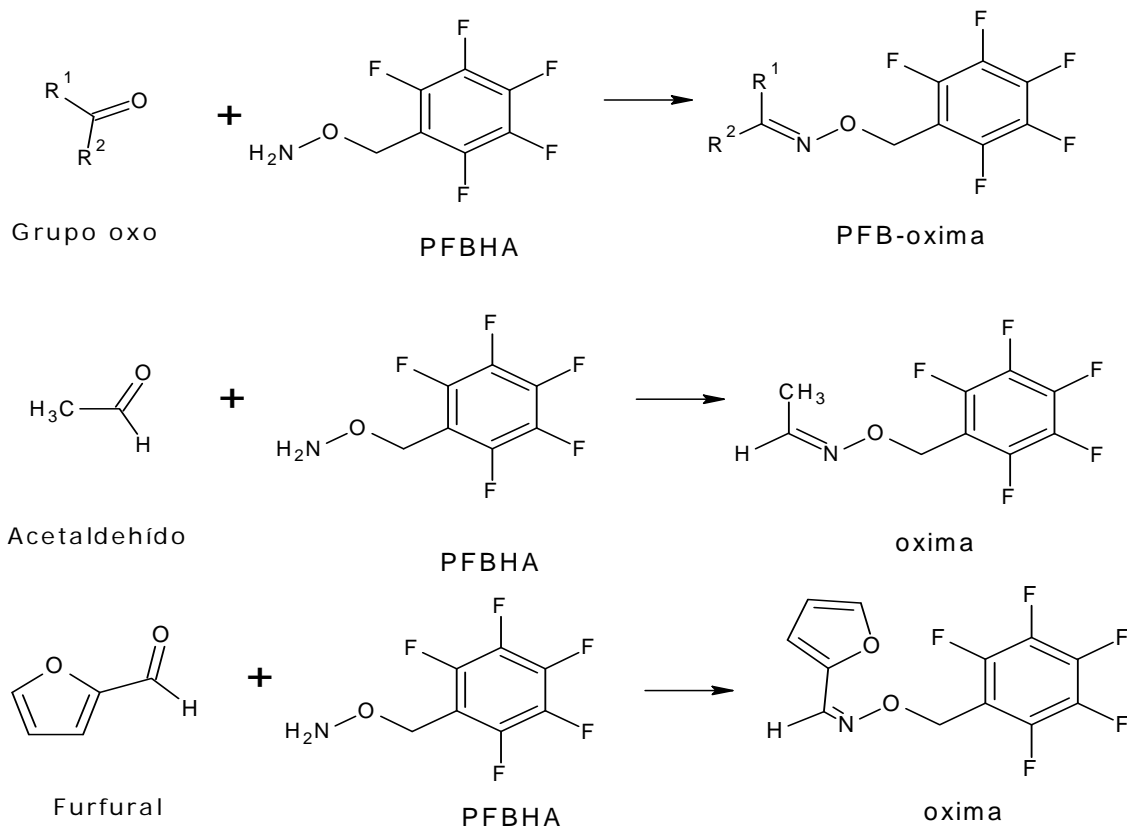


Figura 2.9. Reacción general efectuada entre los compuestos carbonílicos y el PFBHA

OBJETIVOS

3.1 *General*

- Determinar el contenido de alcoholes superiores, metanol y aldehídos en mezcal mediante Cromatografía de Gases y Microextracción en fase sólida con derivatización en fibra seguido de Cromatografía de Gases, para aportar información que ayude a la caracterización química del mezcal.

3.2 *Particulares*

- Determinar el contenido de alcoholes superiores y metanol en distintas muestras de mezcal elaborados con diferentes agaves y bajo distintas condiciones por Cromatografía de Gases y ver si están dentro de los límites establecidos por la NOM-070-SCFI-1994.
- Establecer el análisis de acetaldehído y furfural en mezcal mediante MEFS con derivatización en fibra seguido de Cromatografía de Gases.
- Determinar el contenido de acetaldehído y furfural en mezcales procedentes de distintas regiones del país.

DESARROLLO EXPERIMENTAL

4.1 *Materiales y Reactivos*

Fibra para MEFS PDMS/DVB 65 μm (SUPELCO, USA)

Soporte para fibras de MEFS (SUPELCO, USA)

Columna capilar Carbowax 60 m x 0.25 mm x 0.25 μm (SUPELCO, USA)

Columna capilar 5 % difenil 30 m x 0.25 mm x 0.25 μm (Zebron, USA)

Alcoholímetro (Sin marca)

Estándar de metanol 97% pureza (J. T. Baker, USA)

Estándar de propanol 99% pureza (Merck, USA)

Estándar de alcohol isoamílico 99% pureza (J.T. Baker, USA)

Estándar de hexanol 99% pureza (J.T. Baker, USA)

Estándar de feniletanol 99% pureza (Merck, USA)

Estándar de nonanol 99% pureza (Merck, USA)

Estándar de alcohol bencílico 99 % pureza (Merck, USA)

Estándar de acetaldehído 99% pureza (Sigma-Aldrich, USA)

Estándar de furfural 99% pureza (CHEM SERVICE, USA)

O-(2,3,4,5,6-Pentafluorobencil)-hidroxilamina 98% pureza (Aldrich Chem, USA)

Ácido silícico (BIO-RAD, USA)

Alcohol etílico absoluto anhidro 99% pureza (J.T. Baker, USA)

Acetona 99 % pureza (Reproquifin, México)

Agua grado HPLC

4.2 Muestras

Para la cuantificación de alcoholes superiores y metanol se analizaron 15 muestras distintas de mezcal, algunas de ellas elaboradas en regiones diversas. Para la cuantificación de aldehídos se analizaron 13 muestras distintas de mezcal joven, la mayoría elaboradas a partir de distintos agaves y solo algunas de ellas de distinta región de origen.

Tabla 4.1. Características de las muestras de mezcal empleadas para la cuantificación de alcoholes superiores, metanol y aldehídos.

No. Muestra	Agave	% Etanol *	Región de Origen	Tipo de mezcal	Análisis
1	Mezcla de Agaves	52	Ocotlán de Morelos, Oaxaca, México	Joven	1,2
2	<i>A. arroqueño</i>	49	Ocotlán de Morelos, Oaxaca, México	Joven	1,2
3	<i>A. cupreata</i>	53	Chilapa, Guerrero, México	Joven	1,2
4	<i>A. cupreata</i>	53	Chilapa, Guerrero, México	Joven	1
5	<i>A. cupreata</i>	49	Chilapa, Guerrero, México	Joven	1
6	<i>A. cupreata</i>	50	Chilapa, Guerrero, México	Joven	1
7	<i>A. cupreata</i>	51	Chilapa, Guerrero, México	Joven	1
8	<i>A. cupreata</i>	52	Chilapa, Guerrero, México	Joven	1
9	<i>A. cupreata</i>	52	Chilapa, Guerrero, México	Joven	1
10	<i>A. cupreata</i>	49	Chilapa, Guerrero, México	Joven	1
11	<i>A. cupreata</i>	50	Chilapa, Guerrero, México	Joven	1
12	<i>A. cupreata</i>	50	Chilapa, Guerrero, México	Joven	1
13	<i>A. cupreata</i>	49	Chilapa, Guerrero, México	Joven	1
14	<i>A. cupreata</i>	53	Chilapa, Guerrero, México	Joven	1
15	Mezcla de Agaves	38	Tlacolula, Oaxaca, México	Añejo	1
16	<i>A. angustifolia haw</i>	45	Matatlán, Oaxaca, México	Joven	2
17	<i>A. esperrima jacobi</i>	50	Nombre de Dios, Durango, México	Joven	2
18	<i>A. tripón</i>	49	Ocotlán de Morelos, Oaxaca, México	Joven	2
19	<i>A. largo</i>	49	Ocotlán de Morelos, Oaxaca, México	Joven	2
20	<i>A. inaequidens</i>	49	San Sebastián del oeste, Jalisco, México	Joven	2
21	<i>A. karwinskii</i>	39	Miahuatitlán, Oaxaca, México	Joven	2
22	<i>A. potatorum</i>	49	Sola de Vega, Oaxaca, México	Joven	2
23	<i>A. cupreata</i>	49	Chilapa, Guerrero, México	Joven	2
24	<i>A. angustifolia haw</i>	42	Centro, Oaxaca, México	Joven	2
25	<i>A. americana var. Oaxacensis</i>	52	Ejutla de Crespo, Oaxaca, México	Joven	2

* Determinado experimentalmente

1 Alcoholes; 2 Aldehídos

4.3 Metodología

4.3.1 Determinación del porcentaje de etanol en muestras de mezcal

En una probeta de 250 mL se vierte la muestra de mezcal, posteriormente se introduce el alcoholímetro en la probeta y se sumerge con cuidado hasta el fondo del recipiente, una vez que éste permanezca en la superficie totalmente inmóvil y alejado de las paredes de la probeta, se toma la lectura señalada por el menisco en la escala correspondiente.

4.3.2 Determinación de alcoholes por Cromatografía de Gases²⁹

La cuantificación de alcoholes superiores y metanol se realizó mediante la determinación de factores de respuesta obtenidos por Cromatografía de Gases. Las muestras se sometieron a un lavado con ácido silícico para eliminar impurezas. Este procedimiento fue desarrollado previamente en un trabajo realizado en el laboratorio²⁹.

4.3.2.1 Determinación de factores de respuesta²⁹

Se pesan 100 mg de cada uno de los estándares de los alcoholes: metanol, propanol, alcohol isoamílico, hexanol, nonanol, feniletanol y alcohol bencílico, y se disuelven y aforan a 10 mL con acetona cada uno. A partir de esta solución se prepara una disolución para llegar a una concentración de 1 mg/mL de cada uno de los estándares, para posteriormente tomar 1 mL de cada una de las disoluciones de metanol y alcoholes superiores y 0.5 mL de nonanol y alcohol bencílico y aforar a 10 mL con acetona, (la concentración final del metanol y los alcoholes superiores ha de ser de 100 µg/ mL, mientras que las del nonanol y alcohol bencílico será de 50 µg/mL). A 2 mL de esta mezcla se le adicionan 0.5 g de ácido silícico previamente lavado; se agita vigorosamente en vortex durante 2 minutos y se dejan separar las fases. La fase líquida es transferida a un matraz aforado de 5 mL mientras que la fase sólida se le

adicionan 1.5 mL de acetona, se agita nuevamente durante 2 minutos y se vuelven a separar las fases. La fase líquida se junta con la anterior en el matraz aforado de 5 mL. Se repite una vez más la operación de lavado con acetona. La fase líquida se lleva al aforo con acetona (la concentración final del metanol y los alcoholes superiores es de 40 µg/ mL, mientras que las del nonanol y alcohol bencílico es de 20 µg/mL), se inyecta 1 µL en el cromatógrafo de gases con detector de ionización de flama. Se realiza el mismo procedimiento por triplicado.

Los factores de respuesta del metanol, propanol, isobutanol, alcohol isoamílico y hexanol se calculan respecto al estándar interno nonanol, mientras que el factor de respuesta del feniletanol se calcula con respecto al estándar interno alcohol bencílico.

4.3.2.2 Lavado de ácido silícico²⁹

En un vaso de precipitados de 500 mL se colocan 100 g de ácido silícico y 200 mL de solución de HCl al 1.0%; se agita vigorosamente durante 5 minutos y se deja separar las fases. La fase líquida se desecha y el sólido se lava 4 veces con 200 mL de agua destilada y una con 100 mL de acetona, desechando la fase líquida cada vez. El sólido húmedo se seca a 130 °C. Finalmente el ácido silícico se transfiere a un vial de vidrio.

4.3.2.3 Procedimiento en muestras de mezcal²⁹

En un matraz de 2 mL se transfiere 1 mL de muestra, nonanol y alcohol bencílico como estándares internos (EI) en tal cantidad que su concentración final sea de 50 µg/mL, se lleva al aforo con la muestra de mezcal y se vierte en un vial de 8 mL. A estos 2 mL se le adicionan 0.5 g de ácido silícico previamente lavado y se procede de la misma forma que en la determinación de factores de respuesta.

La cuantificación de alcoholes se realiza utilizando los factores de respuesta para cada uno de ellos, se reporta la concentración por 100 mL de alcohol anhidro.

4.3.2.4 Condiciones Cromatográficas²⁹

Cromatógrafo de gases Hewlet Packard modelo 5880A con detector de ionización de flama (FID), inyector split/splitless (división de flujo/ sin división de flujo) y una columna capilar de Carbowax, (SUPELCO, USA; 60 m x 0.25 mm x 0.25µm). Temperatura del inyector 210 °C en modo split (relación 13:1), temperatura del detector 220 °C. Programa de temperatura: Temperatura inicial 40 °C durante 10 min, incrementándose 10 °C/min hasta 220 °C, manteniéndose durante 5 min. Gas acarreador: Hidrógeno (1 mL/min).

4.3.3 Determinación de acetaldehído^{14, 16, 30}

La cuantificación de acetaldehído se realizó por medio de una curva de calibración. Las muestras y las soluciones de la curva de calibración se analizaron por medio de MEFS con derivatización en fibra seguida de Cromatografía de Gases. En el caso de la curva de calibración el ajuste de alcohol se realizó con etanol redestilado para evitar interferencias del aldehído de interés y otros compuestos carbonílicos.

4.3.3.1 Preparación del derivatizante^{14, 16, 30}

Se pesan 34 mg de *O*-(2, 3, 4, 5,6-pentafluorobencil)-hidroxilamina (PFBHA), se disuelve y afora a 2 mL con agua grado HPLC (NANOpure). Se coloca en un vial de 4 mL con barra magnética de 10 mm, se sella con teflón y se coloca el tapón horadado con septum.

4.3.3.2 Procedimiento para la curva de calibración^{14, 16, 30}

Con ayuda de una microjeringa se toman 13 µL de acetaldehído y se disuelven y aforan a 100 mL con agua NANOpure, para una concentración final de la solución madre de 100 µg/mL. A partir de esta se preparan disoluciones de 1, 3, 5, 7, 8 y 9 µg/mL aforando con solución de etanol al 2%. Este

procedimiento se realiza a temperatura entre los 0 y -4 °C para evitar pérdidas de acetaldehído por su alta volatilidad a temperatura ambiente.

Se procede con la MEFS con derivatización en fibra, para lo cual se carga primero la fibra con el derivatizante de la siguiente manera: el vial de 4 mL que contiene al derivatizante se coloca en una parrilla con agitación magnética a 1200 rpm, posteriormente la aguja de la fibra perfora el septum del vial y se coloca la fibra en contacto con el headspace del derivatizante durante 20 minutos. Ya cargada la fibra con el derivatizante se coloca en un vial de 4 mL con barra magnética de 10 mm (sellado con teflón y tapón horadado con septum) que contiene 2 mL de una de las disoluciones de la curva. Se coloca en la parrilla con agitación a 1200 rpm durante 5 minutos para favorecer el equilibrio entre las fases, una vez transcurrido este tiempo se expone la fibra con el headspace de la disolución estándar durante 10 minutos. Posteriormente se retrae la fibra a la aguja y se retira del vial introduciéndose en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases, dejando un tiempo de desorción térmica de los analitos por 5 minutos. Este procedimiento se realiza por triplicado para cada una de las disoluciones.

4.3.3.3 Procedimiento para la MEFS en mezcal^{14, 16, 30}

En un matraz de 10 mL se transfiere la cantidad necesaria de muestra en tal forma que su concentración de etanol final sea de 2 % con respecto a la concentración inicial de alcohol, se lleva al aforo con agua NONOpure, se toman 2 mL y se vierten en un vial de 4 mL con barra magnética de 10 mm, sellando con teflón y se coloca el tapón horadado con septum. Se procede de la misma forma que en el procedimiento para la curva de calibración (4.3.3.2).

4.3.3.4 Determinación de la concentración de acetaldehído

Se realiza la sumatoria de las áreas de los isómeros la oxima del aldehído y se sustituye en la ecuación resultante de la curva de calibración, tomando en cuenta los factores de dilución correspondientes, para reportar su concentración por 100 mL de alcohol anhidro.

4.3.3.5 Condiciones Cromatográficas^{14, 16, 30}

Cromatógrafo de gases Hewlet Packard modelo 5880A con detector de ionización de flama (FID), inyector split/splitless (división de flujo/ sin división de flujo) y una columna capilar 5 % difenil, (Zebron, USA; 30 m x 0.25 mm x 0.25µm). Temperatura del inyector 260 °C en modo split (relación 13:1), temperatura del detector 250 °C. Programa de temperatura: Temperatura inicial 50 °C durante 1 min, incrementándose 3 °C/ min hasta 160 °C, aumentando 5 °C/min hasta 220 °C, manteniéndose durante 5 min. Gas acarreador: Hidrógeno (2 mL/min).

4.3.4 Determinación de furfural^{14, 16, 30, 31}

La cuantificación de furfural se realizó por medio de una curva de calibración. Las muestras y las soluciones de la curva de calibración se analizaron por medio de MEFS con derivatización en fibra seguida de Cromatografía de Gases. En el caso de la curva de calibración el ajuste de alcohol se realizó con etanol redistilado para evitar interferencias del aldehído de interés y otros compuestos carbonílicos.

4.3.4.1 Preparación del derivatizante^{14, 16, 30, 31}

Se prepara de la misma forma que en el inciso 4.3.3.1.

4.3.4.2 Procedimiento para la curva de calibración^{14, 16, 30, 31}

Se pesan 50 mg de furfural se disuelve y afora a 5 mL con agua NANOpure, para una concentración final de 10 mg/mL. A partir de esta se prepara una disolución de 10 µg/mL, la cual se emplea como solución madre para la preparación de disoluciones de 0.5, 0.6, 0.7, 0.8 y 1.0 µg/mL aforando con solución de etanol al 2%.

Se procede con la MEFS de la misma forma que en el inciso 4.3.3.2 cambiando únicamente el tiempo de exposición de la fibra con el headspace de la disolución estándar a 30 minutos.

4.3.4.3 Procedimiento para la MEFS en mezcal^{14, 16, 30, 31}

En un matraz de 10 mL se transfiere la cantidad necesaria de muestra en tal forma que su concentración de etanol final sea de 2 % con respecto a la concentración inicial de alcohol, se lleva al aforo con agua NONOpure, se toman 2 mL y se vierten en un vial de 4 mL con barra magnética de 10 mm, sellando con teflón y se coloca el tapón horadado con septum. Se procede de la misma forma que en el procedimiento para la curva de calibración (4.3.4.2).

4.3.4.4 Determinación de la concentración de furfural^{14, 16, 30, 31}

Se realiza el mismo procedimiento que en el inciso 4.3.3.4.

4.3.4.5 Condiciones Cromatográficas^{14, 16, 30, 31}

Se emplean las mismas condiciones que en el inciso 4.3.3.5

4.3.5 Análisis estadístico multivariado

Con el fin de explorar la similitud de los resultados obtenidos del análisis cuantitativo de alcoholes y aldehídos en los diferentes mezcales, se someten a un análisis estadístico multivariado (análisis de componentes principales "PCA" y análisis de conglomerados o análisis cluster), empleando para ello el programa "statgraphics centurion XV".

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Cuantificación de metanol

La Figura 5.1, nos muestra un típico cromatograma del análisis de alcoholes superiores y metanol en mezcal, en este cromatograma se aprecia buena resolución entre los picos de los compuestos de interés, importante para que la cuantificación sea correcta. También se observa la presencia de pocas impurezas que no interfieren, lo que facilita la identificación de los picos correspondientes a cada uno de los componentes analizados.

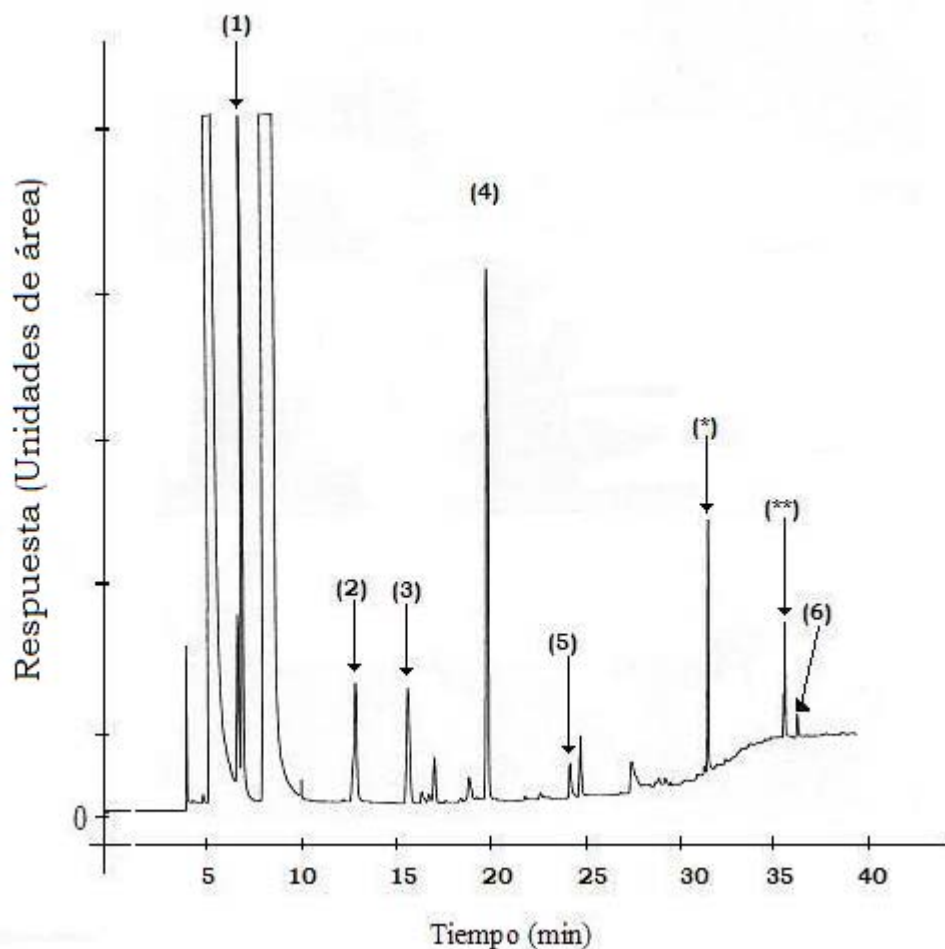


Figura 5.1. Cromatograma típico de muestra de mezcal para cuantificación de alcoholes superiores y metanol. (1) metanol; (2) propanol; (3) isobutanol; (4) alcohol isoamílico; (5) hexanol; (*) nonanol como EI; (**) alcohol bencílico como EI y (6) feniletanol.

La cuantificación tanto de metanol como de alcoholes superiores se realizó mediante Cromatografía de Gases utilizando un método desarrollado previamente en el laboratorio, encontrándose así los resultados que se muestran a continuación.

La Tabla 5.1 nos muestra los factores de respuesta obtenidos para el metanol y los alcoholes superiores. En esta Tabla se observa que los coeficientes de variación son inferiores al 10 % y en la mayoría de los casos hasta del 1 %, a excepción del propanol en el cual se presentó una variación muy alta del 23.02%, lo cual se debió probablemente a errores en la inyección de las disoluciones, lo que ocasionó que el pico se dobleteara y la integración fuera variable entre inyecciones de una misma disolución.

Tabla 5.1. Factores de respuesta de alcoholes superiores y metanol (n=3)

Alcohol	Factor de respuesta (Fr)	Concentración (µg/mL)	% CV *
Metanol	1.10 ± 0.06	99	5.02
Propanol	0.63 ± 0.13	102	23.02
Isobutanol	1.21 ± 0.02	99	1.87
Alcohol isoamílico	1.21 ± 0.01	98	0.63
Hexanol	0.78 ± 0.01	99	0.87
Feniletanol	1.18 ± 0.01	98	0.78

* %CV= Coeficiente de variación

La Tabla 5.2 muestra el contenido de metanol en cada una de las muestras de mezcal analizadas, con sus respectivos coeficientes de variación que se obtuvieron por debajo del 10%, excepto para la muestra número 4 cuyo valor fue ligeramente mayor, 11.16 % a pesar del cual podría considerarse como un buen desarrollo experimental.

Tabla 5.2. Contenido de metanol en muestras de mezcal (n=3)

Mezcal	Concentración (mg/100 mL de alcohol anhidro)	% CV *
1	210.32 ± 10.24	4.87
2	262.16 ± 16.41	6.26
3	254.14 ± 9.89	3.89
4	243.97 ± 27.23	11.16
5	275.05 ± 23.37	8.46
6	183.92 ± 5.02	2.73
7	200.88 ± 7.23	3.60
8	147.29 ± 10.07	6.84
9	232.03 ± 4.96	2.14
10	220.50 ± 4.63	2.10
11	269.42 ± 15.09	5.60
12	362.84 ± 24.45	6.74
13	225.88 ± 16.10	7.13
14	192.37 ± 4.77	2.48
15	139.05 ± 7.99	5.75

* %CV= Coeficiente de variación

Estos mismos resultados se muestran de forma más clara por medio de una gráfica de barras con sus respectivos coeficientes de variación expresados en las barras de error correspondientes, la cual se ilustra en la Figura 5.2. En ella se aprecia de forma clara la existencia de una sola muestra cuyo contenido de metanol es superior a los 300 mg/100 mL de alcohol anhidro (muestra 12). En relación a estos resultados podríamos pensar que en esta muestra el exceso pudiera deberse posiblemente a la diferencia en la variedad de agave empleado en la elaboración del mezcal, pues la cantidad de azúcares presentes en el agave en un inicio estará en función de la variedad o especie empleada³², esta diferencia pudo ser mayor en la muestra 12 con respecto al resto de los mezcales, lo que llevó a un mayor contenido de metanol. Para el resto de las

muestras la concentración de metanol es variable, debido probablemente a diferencias en las variedades de agave, flora nativa y a las condiciones de fermentación, lo que finalmente repercute en la síntesis de dicho compuesto.

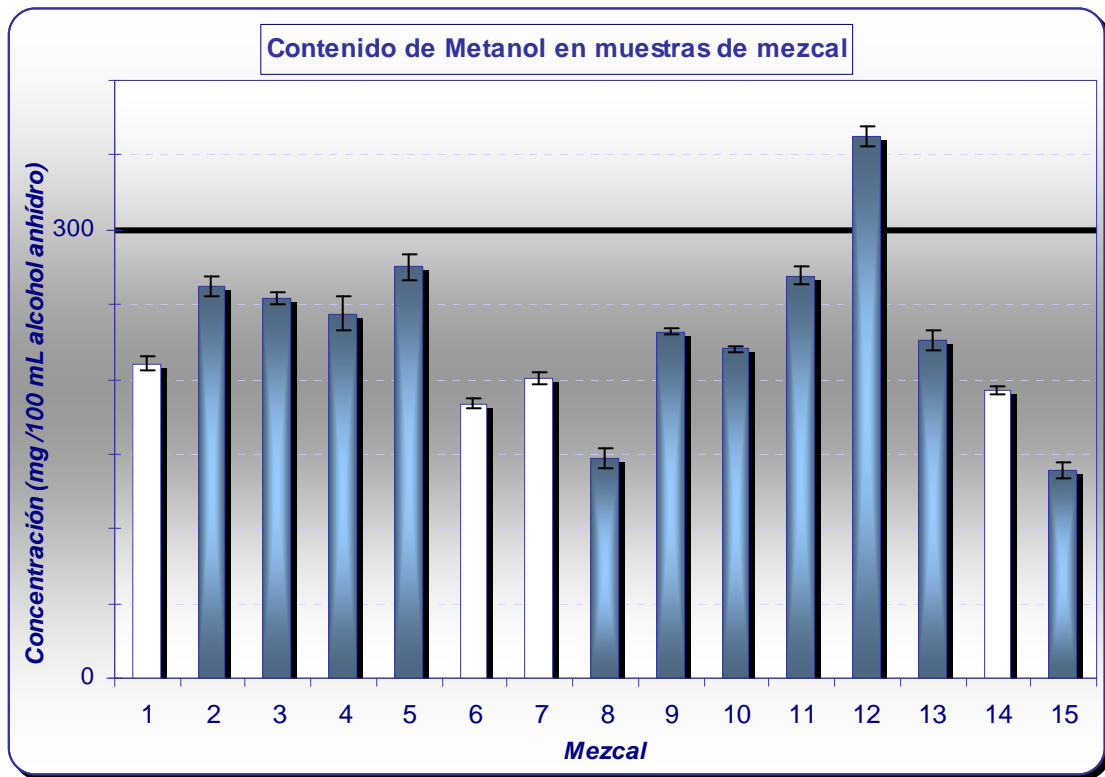


Figura 5.2. Contenido de metanol en muestras de mezcal

5.2 Cuantificación de alcoholes superiores

Al realizar la cuantificación de alcoholes superiores no se encontró variación significativa entre inyecciones de una misma extracción, pero no así para inyecciones de distintas extracciones de las cuales se obtuvo el promedio, con estos resultados se realizó una gráfica del contenido de alcoholes superiores en muestras de mezcal como se ilustra en la Figura 5.3, en la cual no se puede ver de forma clara un solo perfil de alcoholes superiores, observándose que las muestras 5 y 12 tienen como alcohol mayoritario al propanol, el resto tiene en mayor proporción al alcohol isoamílico. Los alcoholes superiores restantes no tienen un comportamiento constante, atribuido posiblemente a la variación de

las condiciones de fermentación, de la materia prima y región en la que se elabora la bebida, lo cual repercute en la concentración final de estos compuestos. Se puede también observar que en las muestras 4, 6, 11 y 15 no se identificó el hexanol ya que su síntesis, al igual que la del resto de los alcoholes, dependerá directamente del metabolismo de los microorganismos encargados de realizar la fermentación.

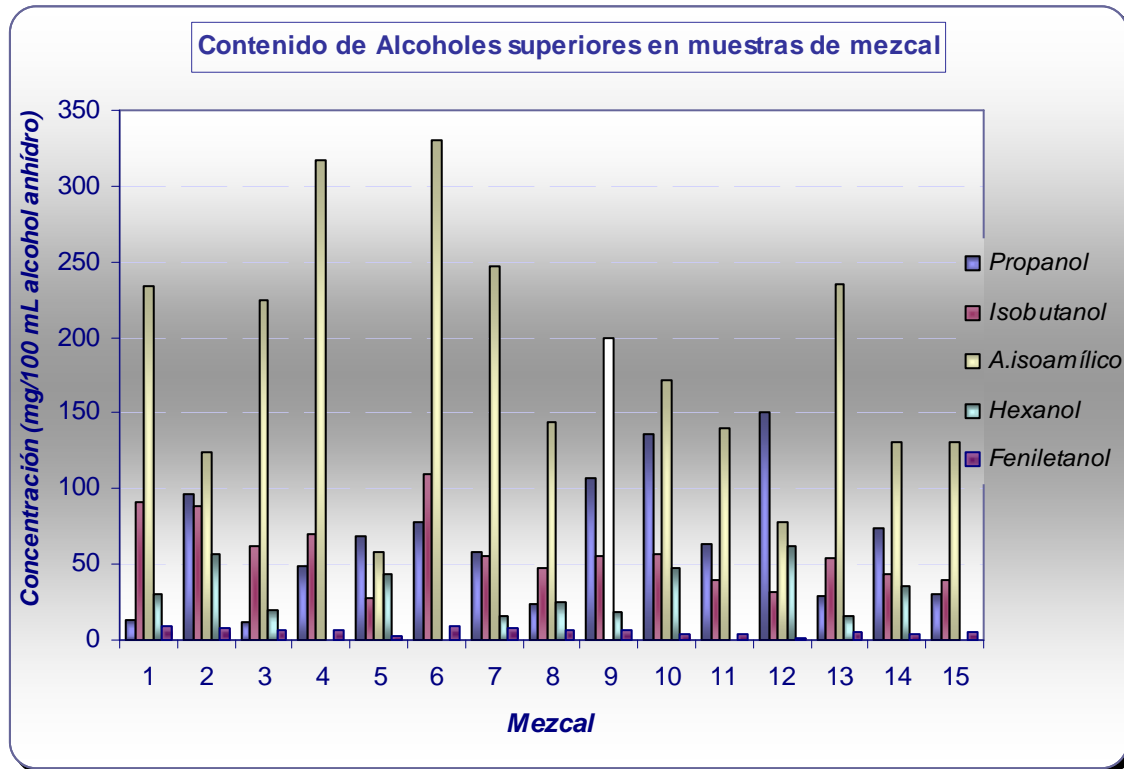


Figura 5.3. Contenido de alcoholes superiores en muestras de mezcal

La presencia de estos compuestos en el mezcal se especifica como la suma de los alcoholes superiores (de acuerdo a la Norma), por lo cual se manejó como un total. La sumatoria de alcoholes superiores en las muestras de mezcal se muestra en la Tabla 5.3, la cual se encuentra expresada en mg/ 100 mL de alcohol anhidro, como lo indica la NOM-070-SCFI-1994. En esta Tabla se muestran los coeficientes de variación obtenidos para el análisis de cada muestra (n=3), encontrando que en todos los casos se obtuvieron valores inferiores al 10%, lo que indica un desarrollo experimental reproducible.

Tabla 5.3. Contenido total de alcoholes superiores en muestras de mezcal (n=3)

Mezcal	Concentración (mg/100 mL de alcohol anhidro)	% CV *
1	377.13 ± 10.52	2.79
2	372.82 ± 19.87	5.33
3	325.62 ± 7.23	2.22
4	443.02 ± 20.64	4.65
5	199.36 ± 10.73	5.37
6	526.94 ± 19.71	3.74
7	383.38 ± 18.13	4.73
8	247.74 ± 3.96	1.60
9	386.53 ± 9.66	2.54
10	416.80 ± 6.50	1.56
11	247.82 ± 4.93	1.99
12	322.91 ± 15.50	4.80
13	338.98 ± 15.52	4.58
14	287.67 ± 6.87	2.39
15	205.20 ± 9.36	4.56

* %CV= Coeficiente de variación

Los resultados se aprecian con mayor facilidad en la Figura 5.4 que muestra el contenido total de alcoholes superiores por medio de una gráfica de barras con los coeficientes de variación expresados en las barras de error correspondientes, en ella se visualiza claramente que la mayoría de las muestras de mezcal presentan una concentración de aceite de fusel dentro de los límites establecidos por la Norma, a excepción de las muestras 4, 6 y 10 que rebasan el límite máximo establecido para el caso de alcoholes superiores, cuyo valor es de 400 mg/100 mL de alcohol anhidro¹, esto pudo deberse probablemente a que las condiciones de fermentación y cantidad de azúcares presentes en la materia prima favorecieron su síntesis con respecto al resto de las muestras.

Para las demás muestras este valor sí se encuentra dentro del intervalo establecido por la NOM-070-SCFI-1994, presentando pequeñas oscilaciones entre ellas, debido probablemente a que hay variaciones en cuanto al proceso, debido posiblemente a la forma artesanal de elaborar el mezcal, aunque dichas diferencias en estos casos no fueron lo suficientemente grandes para inducir a un exceso de estos compuestos.



Figura 5.4. Contenido total de alcoholes superiores en muestras de mezcal

En esta Figura se observa de forma clara la existencia de muestras en las que la variación en la concentración de alcoholes superiores es menor que en otras, por ejemplo entre las muestras 8 y 11 hay una diferencia de una décima, lo cual la hace prácticamente despreciable; ambas muestras fueron elaboradas a partir de una misma especie de agave (*A. cupreata*) y en una misma región (Chilapa, Guerrero, México), similar a lo que sucede con las muestras 7 y 9 y 3 y 12, en cuyos casos la similitud en las concentraciones de alcoholes superiores

pudo deberse posiblemente a una mínima diferencia en las condiciones de proceso con respecto al resto de las muestras.

También se observa que la muestra 5 es la que presenta el menor valor de alcoholes superiores (199.36 mg/ 100 mL de alcohol anhidro) y la muestra 6 presenta el mayor valor (526.94 mg/100 mL de alcohol anhidro) que aunque está fuera del intervalo de la Norma es aproximadamente es 3 veces el contenido de la muestra 5, en este caso pudiera pensarse que las diferencias del proceso fueron mayores en la muestra 6 con respecto al resto de las muestras. Estas diferencias son debidas posiblemente a la poca tecnificación que se tiene del proceso de elaboración del mezcal, lo que ratifica la urgencia de una pronta estandarización de éste ya que actualmente esta bebida continúa elaborándose de forma artesanal.

5.3 Análisis estadístico multivariado de alcoholes

La Figura 5.5 muestra el diagrama de dispersión del análisis de componentes principales (PCA por sus siglas en inglés) de metanol y alcoholes superiores, en ella se aprecia la formación de un solo grupo de muestras ampliamente dispersas, quedando fuera de éste las muestras 5, 6, 12 y 15 las cuales se encuentran visiblemente más alejadas de dicha agrupación. Aquí se pueden destacar dos aspectos importantes, el primero de ellos es que dentro de este grupo se encuentran únicamente mezcales blancos, la mayoría elaborados a partir de *A. cupreata* de Chilapa, Guerrero, México, y sólo dos mezcales elaborados con mezcla de Agaves (muestra 1) y *A. arroqueño* (muestra 2) de Ocotlán de Morelos, Oaxaca, México. El segundo aspecto importante es que el único mezcal añejo analizado (mezcal 15) es precisamente uno de los dos puntos que más alejados se encuentran de la agrupación lo que haría pensar que posiblemente esta diferencia se deba al proceso de añejamiento al cual se sometió dicho mezcal.

La Figura 5.6 muestra el dendrograma del análisis de cluster de metanol y alcoholes superiores, en ella se puede ver que existe poca similitud entre las

muestras de mezcal analizadas. En esta Figura se aprecia de forma más clara la poca similitud entre las muestras y la enorme discrepancia que presentan las muestras 5, 6, 12 y 15 con respecto al resto de los mezcales, lo que confirma lo señalado en el análisis de componentes principales.

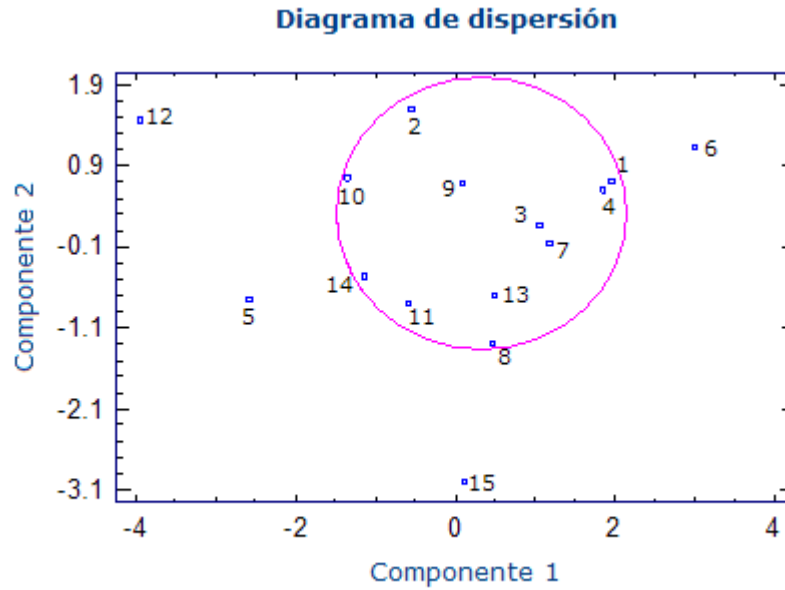


Figura 5.5. Diagrama de dispersión del análisis de componentes principales de alcoholes

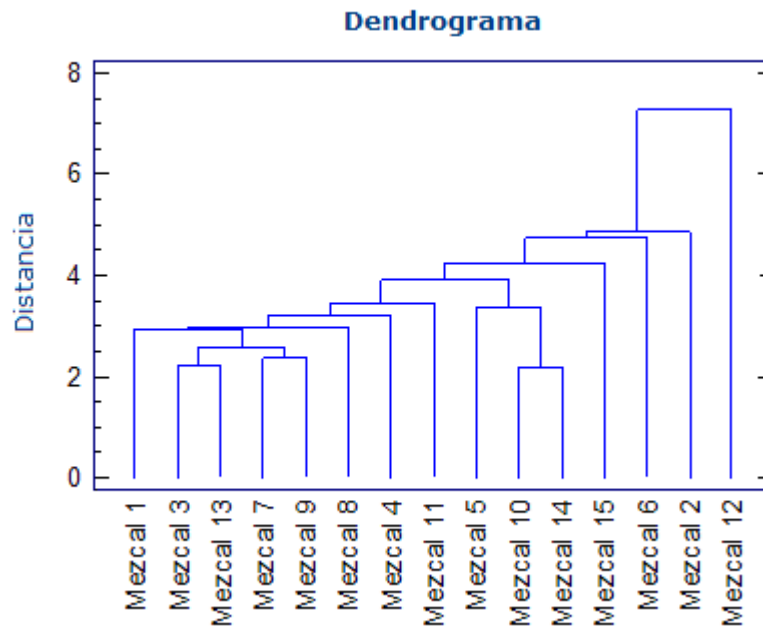


Figura 5.6. Dendrograma del análisis de cluster de alcoholes

5.4 Cuantificación de acetaldehído

La cuantificación de acetaldehído se realizó mediante la implementación de una metodología basada en la MEFS con derivatización en fibra seguida por Cromatografía de Gases, encontrándose así los resultados que se muestran a continuación.

La Figura 5.7 nos muestra un típico cromatograma del análisis de acetaldehído en mezcal por MEFS con derivatización en fibra seguido de Cromatografía de Gases, en ella se observa que bajo las condiciones de trabajo se obtuvieron cromatogramas con buena resolución, en los que la identificación de los picos correspondientes a los isómeros de la oxima de acetaldehído resultó relativamente sencilla, por tratarse de un compuesto que en este tipo de bebidas se encuentra en alta concentración.

La Tabla 5.4 muestran los datos empleados para la curva de calibración de acetaldehído, en ella se encuentran registrados los coeficientes de variación correspondientes a cada una de las concentraciones estudiadas, los cuales fueron calculados en base a la suma de las áreas de los isómeros de la oxima del acetaldehído, encontrando valores menores al 10 % , excluyendo el segundo punto correspondiente a una concentración de acetaldehído de 1.02 $\mu\text{g/mL}$ cuyo % CV de 25.42 fue el mayor, esto se debió probablemente a que dentro de las concentraciones estudiadas en la curva de calibración ésta es la menor, lo que incrementa las posibilidades de error en la toma del volumen empleado para realizar la dilución correspondiente.

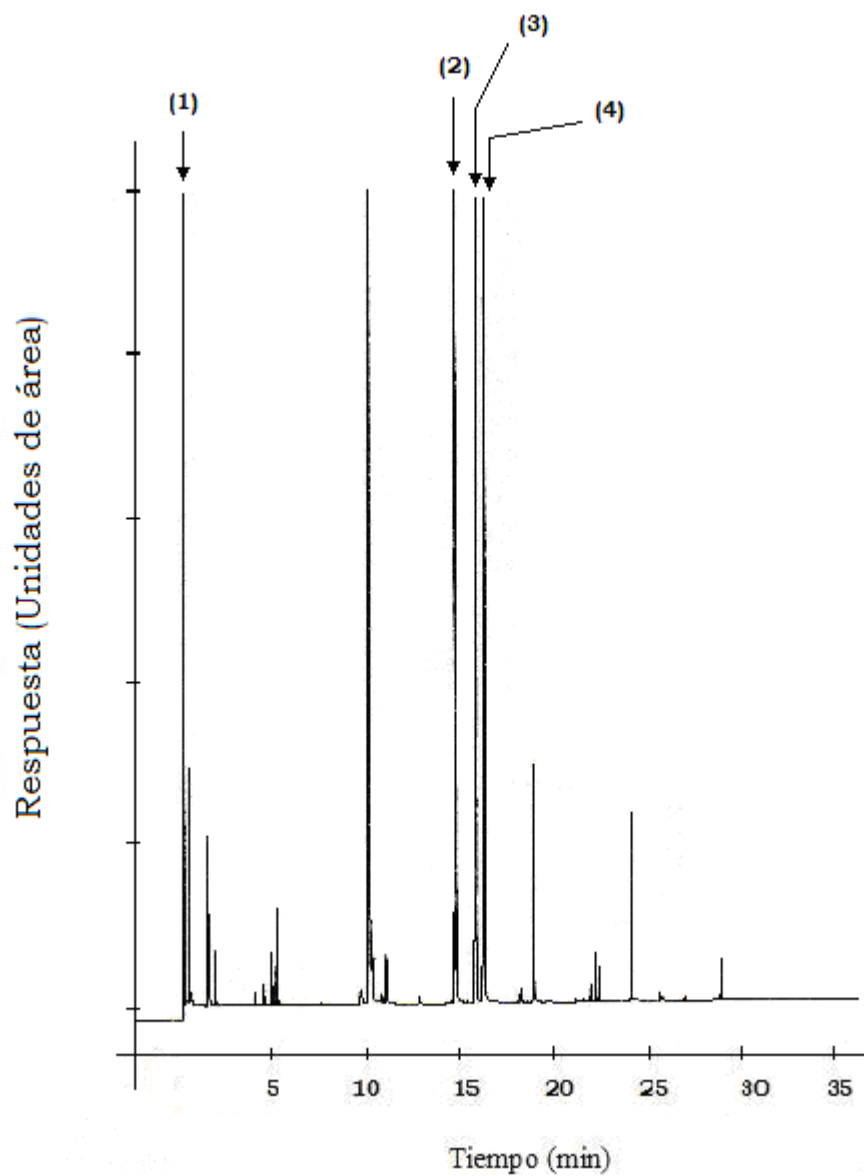


Figura 5.7. Cromatograma típico de muestra de mezcal para cuantificación de acetaldehído por el método de MEFS con derivatización en fibra seguido de Cromatografía de Gases. (1) etanol; (2) PFBHA; (3) y (4) isómeros de la oxima de acetaldehído

Tabla 5.4. Datos para la curva de calibración de acetaldehído (n=3)

Concentración de Acetaldehído (µg/mL)	Área promedio de la suma de los isómeros	% CV *	
1.02	216.96 ± 55.15	25.42	
3.07	599.07 ± 34.06	5.69	a = 36.246
5.02	997.56 ± 45.01	4.51	b = 181.67
7.07	1361.90 ± 105.75	7.76	r ² = 0.9968
7.99	1476.24 ± 62.49	4.23	y = 181.67x + 36.246
9.01	1623.03 ± 27.06	1.67	

* %CV= Coeficiente de variación

La Figura 5.8 muestra la curva de calibración promedio (n=3) para el acetaldehído en un intervalo de concentración de 1 a 9 µg/mL, en ella se puede ver una buena linealidad con un coeficiente de correlación (r²) de 0.9968, en esta curva se muestran los coeficientes de variación expresados en las barras de error correspondientes a cada uno de los puntos.

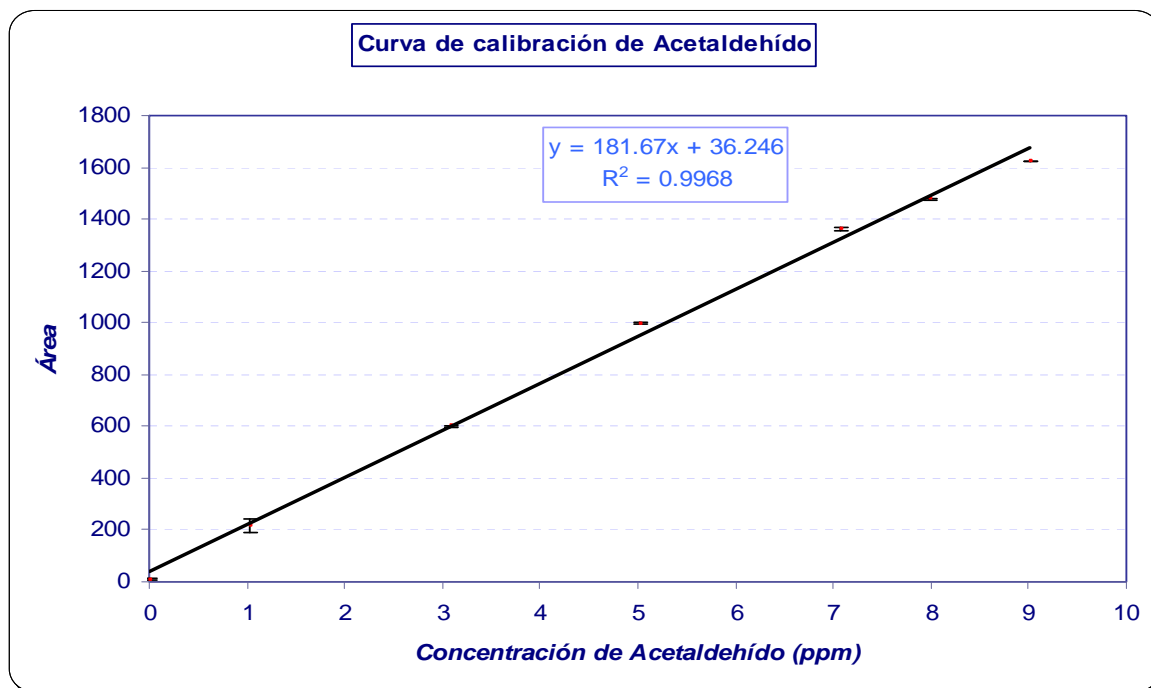


Figura 5.8. Curva de calibración de Acetaldehído

Por otra parte, en la Tabla 5.5 se muestra la concentración de acetaldehído en las muestras de mezcal, en ella se puede observar que todas las muestras se encuentran dentro del rango establecido por la norma para la concentración de acetaldehído, en tequila y bacanora^{3,4} que corresponde a valores entre 0-40 mg/ 100 mL de alcohol anhidro, ya que la norma encargada de establecer las especificaciones para el mezcal no establece los límites de concentración para dicho compuesto.

Con respecto a los coeficientes de variación, éstos resultaron bajos, pues como se aprecia en la Tabla 5.5, en todos los casos se obtuvieron valores inferiores al 10%, mostrando buena precisión del método.

Tabla 5.5. Concentración de Acetaldehído en muestras de mezcal (n=3)

Mezcal	Concentración (µg/mL)	% CV *	Concentración (mg/100 mL alcohol anhidro)
1	97.34 ± 2.71	2.79	18.72

2	94.48 ± 1.98	2.09	19.28
3	120.91 ± 4.56	3.77	22.81
16	77.67 ± 2.16	2.78	17.26
17	35.79 ± 0.50	1.39	7.13
18	154.41 ± 7.40	4.79	31.51
19	121.67 ± 3.34	2.74	24.83
20	127.53 ± 6.58	5.16	31.88
21	80.79 ± 0.86	1.06	20.72
22	99.93 ± 4.14	4.15	20.39
23	126.62 ± 7.15	5.65	25.84
24	128.08 ± 3.05	2.38	30.49
25	80.05 ± 5.01	6.26	15.39

* %CV= Coeficiente de variación

La Figura 5.9 muestra la concentración de acetaldehído en las muestras de mezcal con sus respectivos coeficientes de variación expresados en las barras de error correspondientes, en ella se observa que existe gran variación entre las concentraciones de acetaldehído en las muestras, lo cual podría atribuirse posiblemente a la diferencia tanto de materia prima (agave) como de región de origen. Las muestras 3, 19, 20, 23 y 24 presentan concentraciones de acetaldehído similares, estas muestras fueron elaboradas a partir de distintas especies de agave y en distinta región de origen, lo mismo se observa en las muestras 1, 2 y 22 y las muestras 16, 21 y 25, lo que corrobora que no existe una relación entre la variedad de agave y la región de origen con la concentración final de acetaldehído en las muestras de mezcal.

Con respecto a las dos muestras restantes, se observa un intervalo muy amplio de concentración que va desde 35.79 µg/mL (muestra 17) hasta 154.41 µg/mL (muestra 18), lo cual es debido probablemente a diferencias no solo en la variedad de agave y la flora nativa de cada una de las distintas regiones sino también en el proceso de fabricación de ambas muestras.

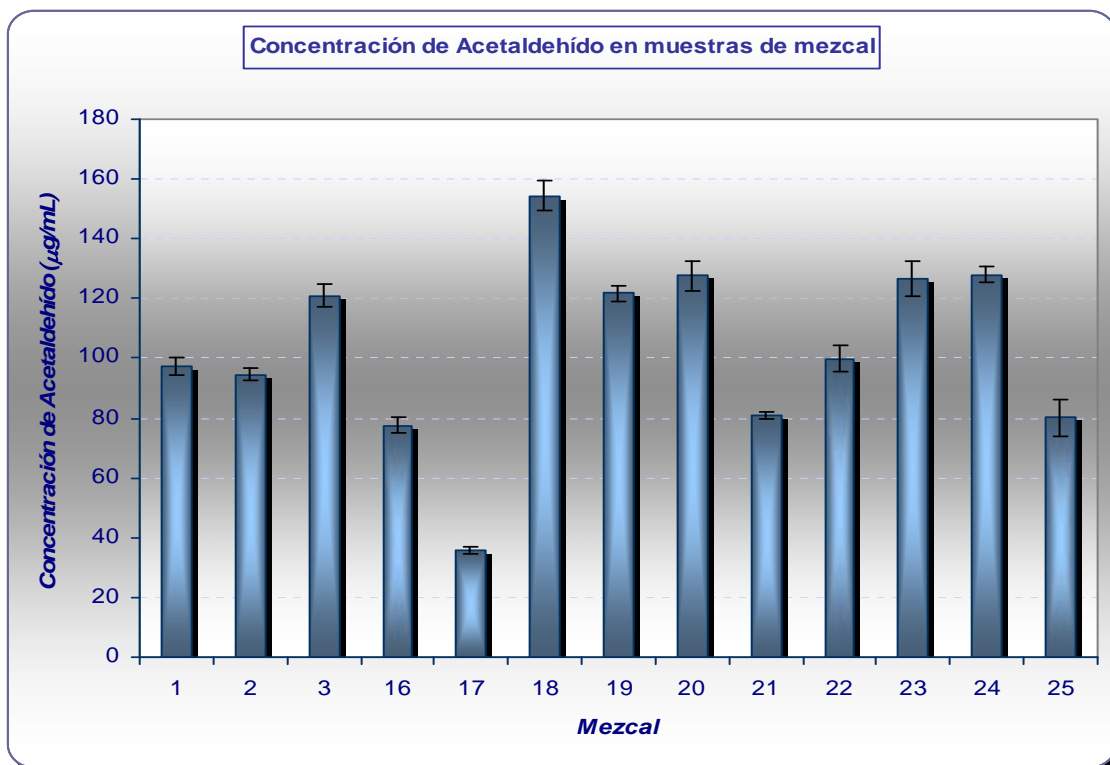


Figura 5.9. Contenido de Acetaldehído en muestras de mezcal

5.5 Cuantificación de furfural

La cuantificación de furfural se realizó de manera similar a la de acetaldehído mediante la implementación de una metodología basada en la MEFS con derivatización en fibra seguida de Cromatografía de Gases, encontrándose así los resultados que se muestran a continuación.

En la Figura 5.10 se observa que bajo las condiciones de trabajo se obtuvieron cromatogramas en los que los picos correspondientes a los isómeros de la oxima de furfural presentaron una buena resolución.

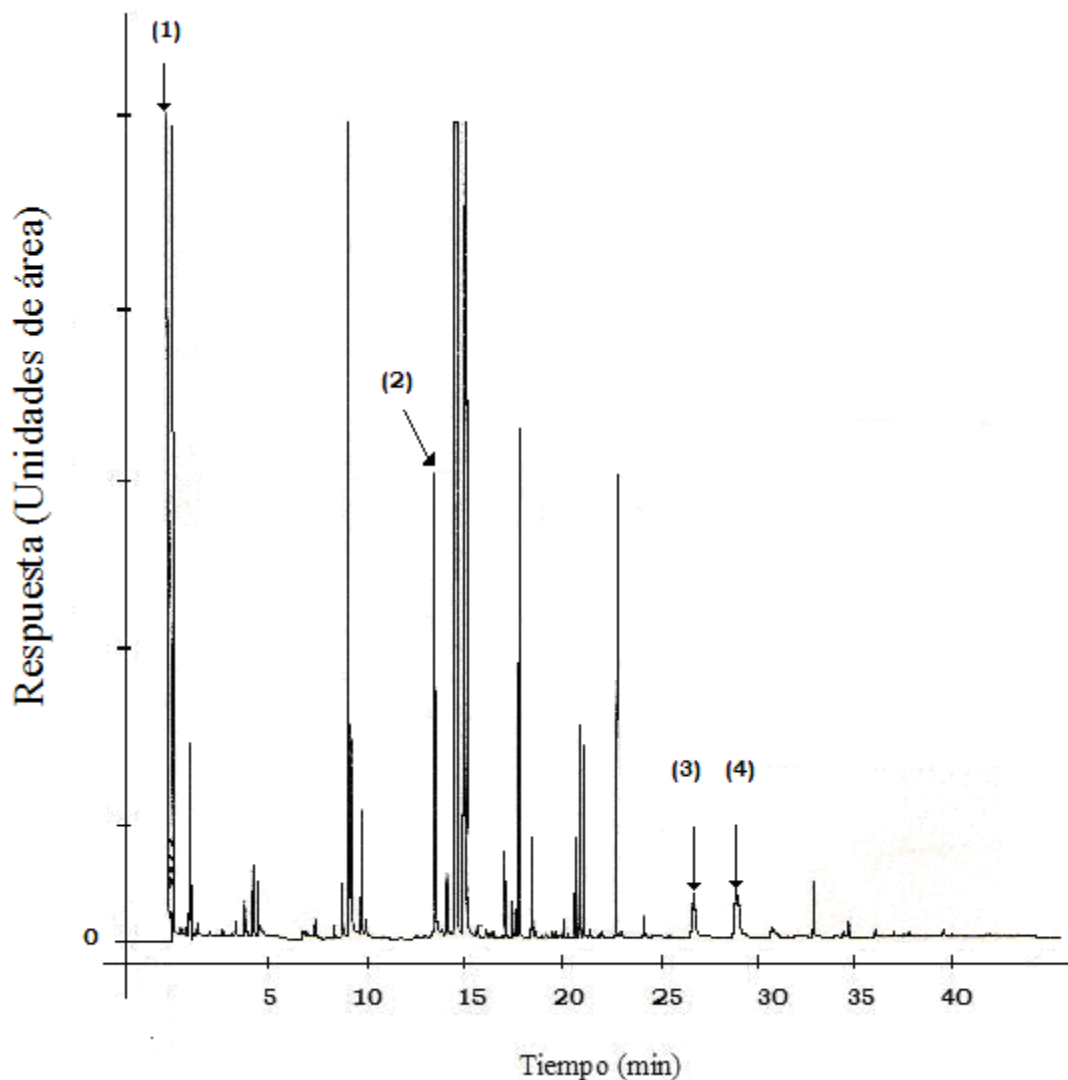


Figura 5.10. Cromatograma típico de muestra de mezcal para cuantificación de furfural por el método de MEFS con derivatización en fibra seguido de Cromatografía de Gases. (1) etanol; (2) PFBHA; (3) y (4) isómeros de la oxima de furfural.

En esta Figura se aprecia claramente que los picos de los isómeros de la oxima de furfural son muy pequeños, lo que en un principio complicó su identificación, sin embargo esto ya se esperaba, pues este tipo de compuestos en el mezcal se encuentra en una concentración muy baja.

La Tabla 5.6 muestra los datos empleados para la curva de calibración de furfural, en ella se muestran los coeficientes de variación correspondientes a cada una de las concentraciones estudiadas, encontrando valores que resultaron por debajo del 12 %, este porcentaje pudo deberse a que las concentraciones de

furfural estudiadas son menores a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ es decir, muy bajas, lo cual hace al experimento más susceptible a errores en la realización de éste.

Tabla 5.6. Datos para la curva de calibración de furfural (n=3)

Concentración de Furfural ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Área promedio de la suma de los isómeros	% CV *	
0.4998	16.70 \pm 1.95	11.68	a = 8.4225
0.5998	17.73 \pm 1.31	7.39	b = 15.549
0.6997	18.93 \pm 1.36	7.18	$r^2 = 0.9959$
0.7997	20.61 \pm 2.28	11.06	y = 15.594x + 8.4225
0.996	24.32 \pm 2.37	9.74	

* %CV= Coeficiente de variación

La Figura 5.11 muestra la curva de calibración promedio (n=3) para el furfural en un intervalo de concentración de 0.5 a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, en ella se observa una linealidad aceptable pues presenta un coeficiente de correlación (r^2) de 0.9959, independientemente de los coeficientes de variación expresados en las barras de error correspondientes a cada uno de los puntos, los cuales resultaron altos como se mencionó con anterioridad sin embargo, se consideran aceptables para un método como lo es la MEFS.

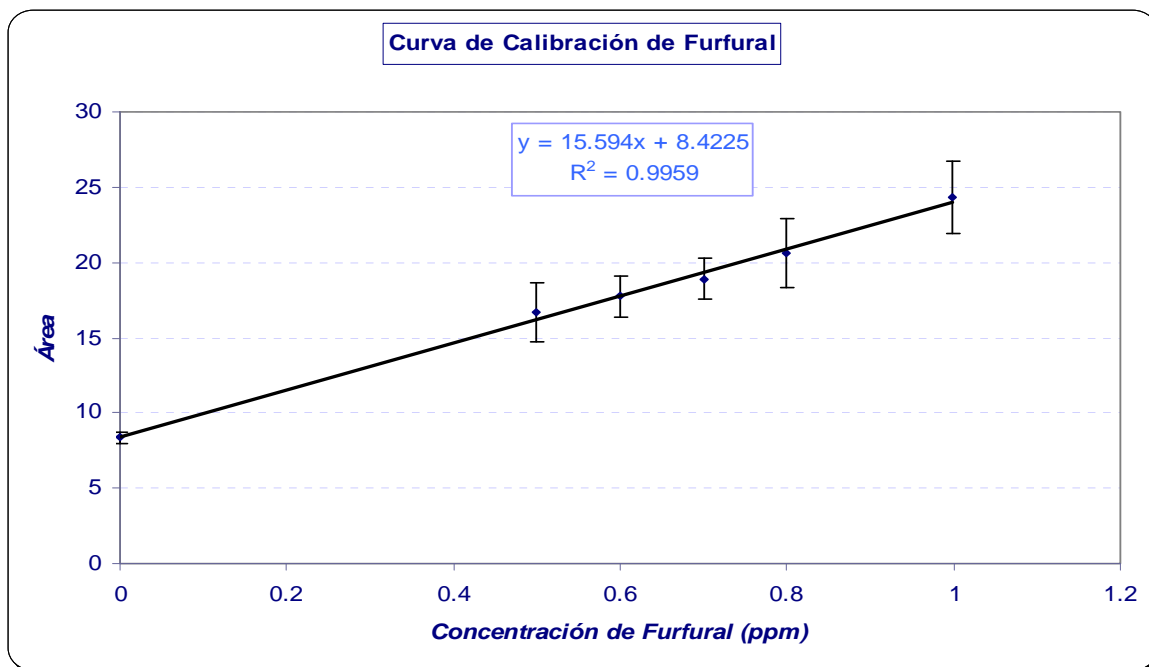


Figura 5.11. Curva de calibración de furfural

Por otra parte, en la Tabla 5.7 se muestra la concentración de furfural en las distintas muestras de mezcal, en la cual se puede observar que solo las muestras 2 y 18 no se encuentran dentro del rango establecido por la norma para la concentración de furfural en tequila y bacanora^{3,4}, que corresponde a valores entre 0-4.0 mg/ 100 mL de alcohol anhidro, ya que la norma encargada de establecer las especificaciones para el mezcal tampoco establece los límites de concentración para dicho compuesto.

Estas muestras se encuentran por arriba del límite máximo señalado, lo cual se puede atribuir posiblemente a que en estos casos la variación de agave y condiciones de fermentación fueran favorables para la presencia de furfural con respecto al resto de las muestras.

Con respecto a los coeficientes de variación, éstos resultaron bajos, como se aprecia en la Tabla 5.7, en todos los casos se obtuvieron valores inferiores al 10%, y en algunos casos menores hasta del 1% mostrando una buena precisión en el método.

Tabla 5.7. Concentración de Furfural en muestras de mezcal (n=3)

Mezcal	Concentración ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	% CV *	Concentración ($\text{mg}/100 \text{ mL}$ alcohol anhidro)
1	13.80 ± 0.10	0.75	2.65
2	33.78 ± 3.05	9.03	6.89
3	2.69 ± 0.26	9.69	0.51
16	1.66 ± 0.03	1.75	0.37
17	2.31 ± 0.18	7.86	0.46
18	23.47 ± 1.69	7.19	4.79
19	10.34 ± 0.67	6.52	2.11
20	7.37 ± 0.69	9.33	1.84
21	0.40 ± 0.005	1.16	0.10
22	1.98 ± 0.06	3.09	0.40
23	$<0.5 \pm \text{----}$	8.08	<0.1
24	$<0.5 \pm \text{----}$	8.18	<0.1
25	19.00 ± 1.31	6.91	3.65

* %CV= Coeficiente de variación

La Figura 5.12 presenta el contenido de furfural en las muestras de mezcal con sus respectivos coeficientes de variación expresados en las barras de error correspondientes, en ella se observa que existe gran variación entre las concentraciones de furfural en las muestras, lo que podría atribuirse posiblemente a las mismas razones que para el caso de acetaldehído, que son la variación tanto de agave como de región de origen. En esta determinación se observa una mayor variación de concentraciones, pues solo las muestras 3, 16, 17 y 22 presentan concentraciones de furfural similares, estas muestras fueron elaboradas a partir de distintas especies de agave y en distinta región de origen. El resto de las muestras presentan concentración de furfural variable, la cual se encuentra en un intervalo muy amplio de concentración que va desde $<0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ (muestras 23 y 24) hasta $33.78 \mu\text{g}/\text{mL}$ (muestra 2), lo cual es probablemente al igual que en el caso de acetaldehído, a diferencias no solo en

el agave y la flora nativa de cada una de las distintas regiones, sino también en el proceso de fabricación de las muestras.

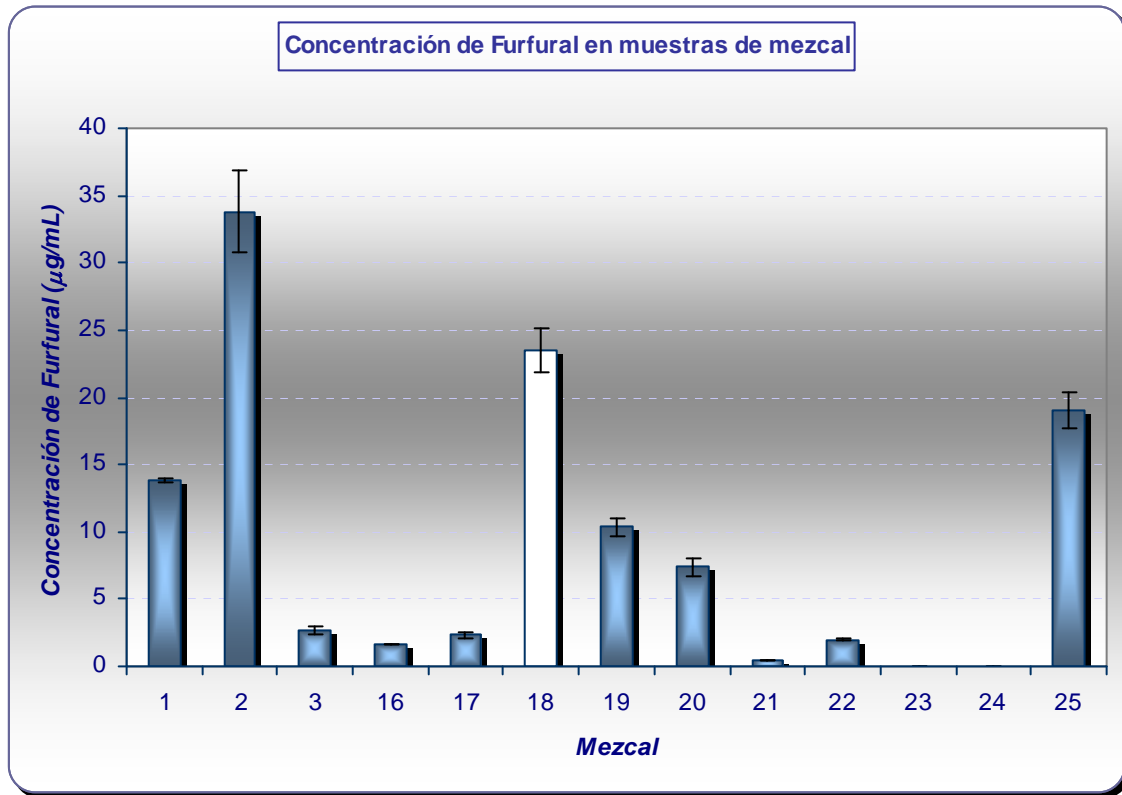


Figura 5.12. Contenido de Furfural en las muestras de mezcal.

En la Figura 5.13 se muestra la comparación entre la concentración de acetaldehído y furfural en las muestras de mezcal analizadas, en ella se aprecia notablemente que contrario a lo que inicialmente se pensó, las muestras con mayor contenido de acetaldehído, como la 18 y 20 no son las mismas que presentan valores elevados en contenido de furfural, es decir, no se observa una relación entre acetaldehído y furfural pues probablemente depende de diversos factores, como lo son la variación en la especie de agave, la región de origen y las condiciones de elaboración del mezcal; variaciones que son debidas a la poca estandarización del proceso de dicha bebida.

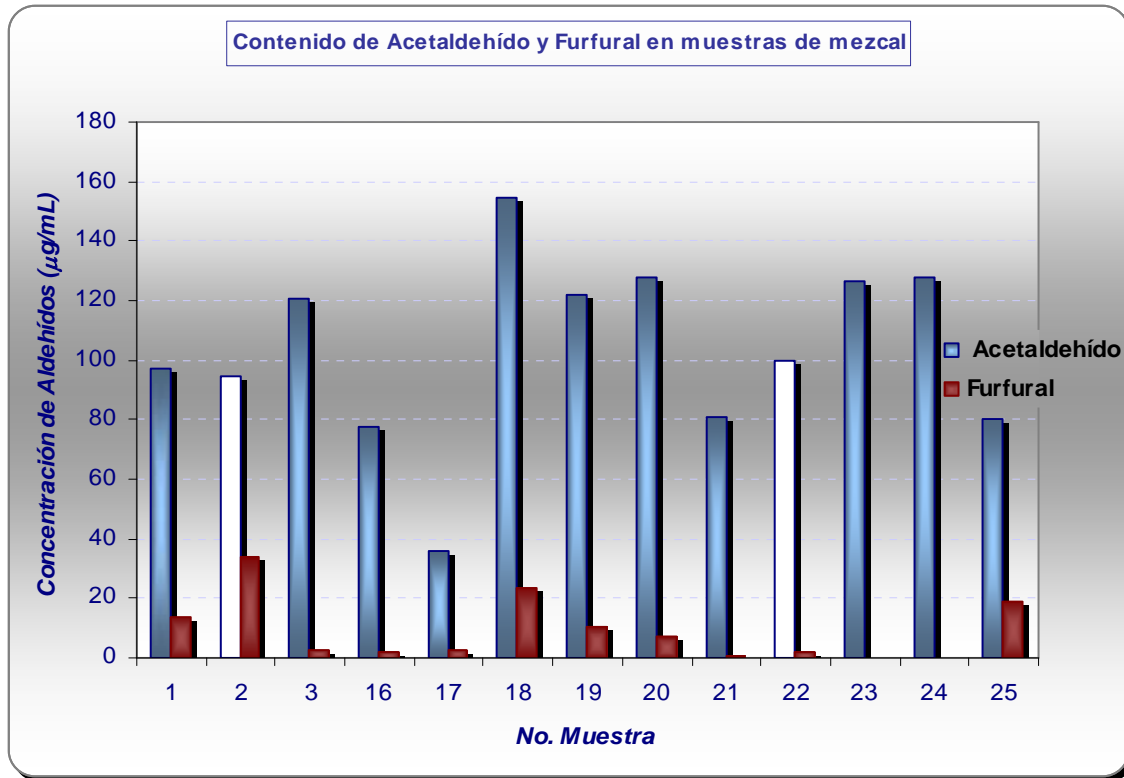


Figura 5.13. Contenido de Acetaldehído y Furfural en muestras de mezcal.

5.6 Análisis estadístico multivariado de aldehídos

La Figura 5.14 muestra el diagrama de análisis de cluster de aldehídos, en ella se observa la formación de pequeños grupos de muestras de mezcal con gran similitud. En esta Figura se aprecia que los mezcales que presentan mayor similitud en acetaldehído y furfural son aquellas que fueron elaboradas a partir de *A. cupreata* y *A. angustifolia haw* (muestras 23 y 24), que a su vez muestran similitud con el segundo de los mezcales elaborados a partir de *A. cupreata* (muestra 3), esto es debido posiblemente a la poca variación en las especies de agave. También se observan semejanzas en las concentraciones de acetaldehído y furfural en el caso de *A. angustifolia haw* y *A. karwinskii* (muestras 16 y 21) que guardan cierta semejanza al *A. potatorum* (muestra 22) aunque en menor grado que en el caso anterior, lo mismo se refleja para *A. largo* y *A. inaequidens* (muestras 19 y 20) así como mezcla de Agaves y *A.*

americana var. *Oxacensis* (muestras 1 y 25), estas últimas 4 muestras guardan una semejanza cada vez menor.

En el caso de los otros mezcales elaborados con *A. esperima jacobi*, *A. arroqueño* y *A. tripón* (muestras 17, 2 y 18), se puede decir que éstos presentaron mínima similitud con el resto de los mezcales, incluso entre ellos ya que no logran agruparse.

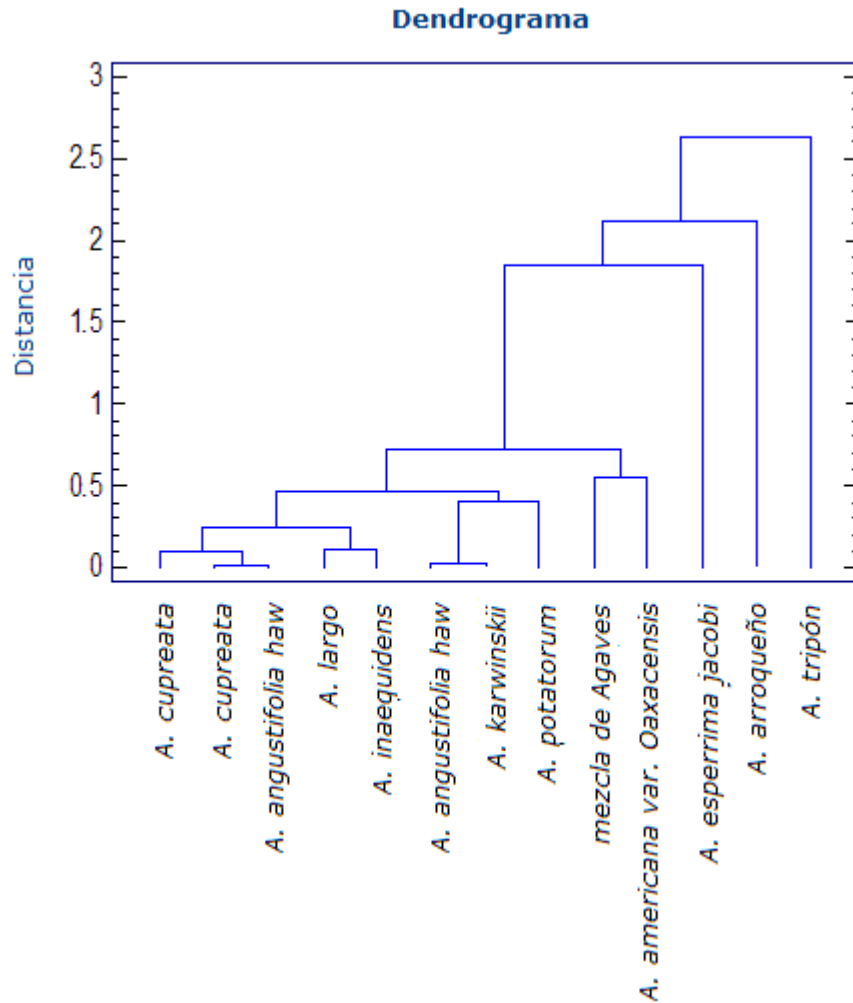


Figura 5.14. Dendrograma del análisis de cluster de aldehídos

En base a estos resultados podemos señalar que tal como lo mostraron los resultados de cuantificación de aldehídos, éstos probablemente están en función del tipo de agave que se emplea para la elaboración de la bebida, aunado a la variación del proceso de cada uno de los productores y de la flora nativa presente en cada una de las distintas regiones.

CONCLUSIONES

- Se determinó la concentración de alcoholes superiores y metanol por medio de cromatografía de gases en muestras de mezcal elaborados bajo distintas condiciones y distinta región de origen.
- Se realizó el análisis estadístico multivariado de alcoholes, encontrando que de las 15 muestras de mezcal analizadas 11 se agruparon de forma dispersa y con poca similitud en la concentración de metanol y alcoholes superiores, el resto presentó mínima semejanza.
- Se verificó el cumplimiento de la NOM-070-SCFI-1994, en cuanto al contenido de alcoholes superiores y metanol, encontrando que de las 15 muestras analizadas, 4 no cumplen legalmente con la norma ya que 3 presentan una concentración de alcoholes superiores por arriba del límite máximo, y 1 presenta concentración de metanol mayor al límite máximo establecido.
- Se determinó el contenido de acetaldehído y furfural en mezcales elaborados con diferente variedad de agave y procedentes de distintas regiones del país mediante MEFS con derivatización en fibra seguida de Cromatografía de Gases.
- Se realizó el análisis estadístico multivariado para aldehídos, encontrando que de las 13 muestras de mezcal analizadas 10 forman agrupaciones con gran similitud en la concentración de acetaldehído y furfural, el resto presenta mínima semejanza.
- Se estableció una comparación con las normas NOM-006-SCFI-2005 y NOM-168-SCFI-2004 del tequila y bacanora respectivamente para verificar el cumplimiento en cuanto al contenido de acetaldehído y furfural, encontrando que las 13 muestras analizadas presentan concentraciones de

acetaldehído dentro de los límites establecidos, mientras que para el caso del furfural 2 muestras presentan concentraciones por arriba del límite máximo permitido.

- Se compararon los resultados obtenidos para cada una de las muestras, encontrando que la composición de alcoholes superiores, metanol, acetaldehído y furfural en el mezcal probablemente depende de forma directa de la variación de agave, de las condiciones de proceso y la región en la que éste se elabora, asociadas a la poca tecnificación que se tiene del proceso, ratificando la urgencia de una pronta estandarización ya que actualmente el mezcal continúa elaborándose de forma artesanal.
- La MEFS con derivatización en fibra demostró ser una técnica de extracción y preconcentración fiable en el análisis de aldehídos en mezcal, ya que es rápida, libre de disolventes, económica, simple y fácilmente automatizada.

BIBLIOGRAFÍA

1. Secretaría de Economía, **NOM-070-SCFI-1994** [en línea, disponible en <http://www.economía.gob.mx/work/normas/nom/kpronoman/p070scfi>; internet; accesado el 6 de febrero de 2007]
2. Solano Daniel, **Determinación químico- toxicológico de metanol y alcoholes superiores en vinos** (Lima, Editorial Bireme, 1985), 69.
3. Secretaría de Economía, **NOM-006-SCFI-2005** [en línea, disponible en <http://www.economía.gob.mx/work/normas/nom/kpronoman/p006scfi>; internet; accesado el 14 de enero de 2008]
4. Secretaría de Economía, **NOM-168-SCFI-2004** [en línea, disponible en <http://www.economía.gob.mx/work/normas/nom/kpronoman/p168scfi>; internet; accesado el 14 de enero de 2008]
5. Cutzach I, Chatonnet P, Dubourdieu D, Identification of Volatile Compounds with a Toasty Aroma in Heated Oak Used in Barrelmakin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1997, 45, 2217-2224.
6. Cutzach I, Chatonnet P, Dubourdieu D, Identifying new volatile compounds in toasted oak. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999, 47, 1663-1667.
7. Escalante Pilar, González Lidia, Barba Ana, De León Antonio, Mezcal, una mezcla natural de alcoholes y feromonas. *Revista Bebidas* (Junio/Julio 2006), 12.
8. Valenzuela Zapata Ana G., Signos distintivos en los alimentos y bebidas mexicanas: una propuesta a partir de la denominación de origen mezcal. *Revista de Salud pública y Nutrición* (Abril/Junio 2007), 8.
9. COMERCAM, **Regulación de la calidad del mezcal** [en línea, disponible en http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/mems/alvarez_r_ji/apendiceF; internet; accesado el 12 de febrero de 2007]
10. Molina J.A, Botello J.E, Estrada A, Navarrete J.L, Jiménez H, Cárdenas M, Rico R, Compuestos volátiles en mezcal. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, (2007) 6, 41.

11. **Bebidas destiladas** [en línea disponible en <http://otacon-san.livejournal.com>; internet; accesado el 31 de enero de 2008]
12. Secretaría de Salud, **Los Alcoholes superiores** [en línea, disponible en http://www.salud.gob.mx/unidades/dgaj/archivos/archivos/dot/2004/nov/dof_15-11-2004; internet; accesado el 31 de enero de 2008].
13. MacMurry John. Química orgánica. 5a edición (USA, Editorial Thomson, 2000) 198,777.
14. Wardenckii Waldemar, Sowinski Piotr, Curylo Janusz, Evaluation of headspace solid-phase microextraction for the analysis of volatile carbonyl compounds in spirits and alcoholic beverages. Journal of Chromatography A, 2003, 894, 89-96.
15. **Bebidas alcohólicas** [en línea, disponible en <http://usuarios.lycos.es/vicobos/nutricion/bebidas>; internet; accesado el 31 de enero de 2008].
16. Wang Qing, O'Reilly John, Pawliszyn Janusz., Determination of low-molecular mass aldehydes by automated headspace solid-phase microextraction with in-fibre derivatisation. Journal of Chromatography A, 2003, 1071, 147-154.
17. McNair Harold, Miller James, **Basic gas chromatography. Techniques in Analytical Chemistry**. (USA, Editorial John Wiley & sons, 1998), 3.
18. Skoog Douglas A, West Donald M, Holler James F, Crouch Stanley R, **Química Analítica**. 7a edición. (Madrid, Editorial McGraw Hill, 2001), 687-703.
19. **Cromatografía de Gases** [en línea, disponible en <http://www.redhucyt.oas.org/RLQ/tutoriales/cromatografia/Gas> internet; accesado el 30 de enero de 2008]
20. Skoog Douglas A, Holler James F, Hieman T.A, **Principios de Análisis Instrumental**. 5a edición. (Madrid, Editorial McGraw Hill, 2001).
21. Harris Daniel C, **Análisis Químico Cuantitativo**. 5ª Edición. (USA, Editorial Reverté, 2001), capítulos 1, 4 y 5.
22. Mendoza Arellano Silvia, **Química analítica instrumental II** (México, UNAM, 2002), 43.

23. Frenk Mora Julio, Enríquez Rubio Ernesto, Lombera González Miguel A, Becerril Martínez Ma. Del Carmen, **Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos**. 8a edición. vol 1. (México, Publicaciones e impresiones de calidad, 2004), 367-372.
24. **MEFS** [en línea, disponible en <http://www.science.uwaterloo.ca/chemistry/pawliszyn/>; internet; accesado el 31 de enero de 2008]
25. Peñalver Hernando Alejandra M, "Aplicación de la microextracción en fase sólida al análisis medioambiental" (tesis de doctorado, Universitat Rovira I Virgili, 2002) 10-40
26. Riu Aumatell Montserrat, "Caracterización de compuestos volátiles en bebidas derivadas de frutas" (tesis de doctorado, Universidad de Barcelona, 2005) 22.
27. Pawliszyn Janusz, Solid Phase Microextraction, theory and practice. Wiley-VCH , New York, 1997.
28. Hernández Jorge, Rodríguez Miguel A, García Francisco, Microextracción en fase sólida: Aplicación al análisis de pesticidas, Revista CTA, 2005, 26, 12.
29. Reyes Delgado David Alejandro, "Determinación de los principales compuestos orgánicos del mezcal por cromatografía de gases capilar espectrometría de masas" (tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, 2006), 27.
30. Bao Ming-liang, Pantani Francesco, Griffini Osvaldo, Burrini Daniela, Santianni Daniela, Barbieri Katia, Determination of carbonyl compounds in water by derivatization-solid-phase microextraction and gas chromatographic analysis. Journal of Chromatography A, 1998, 809, 75-87.
31. Fitzgerald Gillian, James Kevin J, MacNamara Kevin, Stack Mary A, Characterisation of whiskeys using solid-phase microextraction with gas chromatography-mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 2000, 896, 351-359.
32. Benn M. S, Peppard L.T, Characterization of tequila flavour by instrumental and sensory analysis. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1996, 44, 557-566.