



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

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

**IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE TERPENOS EN AGAVE  
MEZCALERO POR MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA-CROMATOGRFÍA  
DE GASES-ESPECTROMETRÍA DE MASAS**

TESIS  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

Q.A. JORGE LUIS SANTOS HERNÁNDEZ



TUTOR: Dra. Araceli Peña Álvarez

AÑO: 2008



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

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

Parte del mismo se presentó en el XXII Congreso Nacional de Química Analítica Mérida, Yucatán 2008.

## Agradecimientos:

A la Dra. Araceli Peña Álvarez por su ayuda para la realización de este trabajo.

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

Dedicatoria:

A mi familia que nunca deja de apoyar mis proyectos de vida.

A mis amigos y compañeros.

## Índice de Abreviaturas

ACP	Análisis de componentes principales
CAR	Carboxen
CG	Cromatografía de gases
CG-EM	Sistema acoplado cromatografía de gases espectrometría de masas
CLAR	Cromatografía de líquidos de alta resolución
CV	Coefficiente de variación
CW	Carbowax
DMAPP	Pirofosfato de dimetil-alilo
DVB	Divinilbenceno
DXP	1-Desoxi-xilulosa-5-fosfato
ELL	Extracción líquido-líquido
EM	Espectrometría de masas
GAP	Gliceraldehído-3-fosfato
IPP	Pirofosfato de isopentenilo
LD	Límite de detección
LQ	Límite de cuantificación
MEFS	Microextracción en fase sólida
msnm	Metros sobre el nivel del mar
MVA	Ácido mevalónico
NIST	Biblioteca del espectrómetro de masas
OMPI	Organización mundial de la propiedad intelectual
PA	Poliacrilato
PDMS	Polidimetil-siloxano
SCAN	Modo de barrido total de iones
SIM	Monitoreo selectivo de iones
TPR	Resina templada

## ÍNDICE

1. <b>Introducción</b> .....	1
2. <b>Antecedentes</b> .....	2
2. 1 El agave o maguey.....	2
2. 1. 1 Identidad botánica.....	3
2. 1. 2 Usos del agave.....	5
2.2 El mezcal.....	8
2. 2. 1 Proceso de elaboración de mezcal.....	9
2. 2. 1. 1 Selección de las piñas.....	9
2. 2. 1. 2 Horneado (Cocción).....	10
2. 2. 1. 3 Molienda.....	10
2. 2. 1. 4 Fermentado.....	10
2. 2. 1. 5 Destilación.....	11
2. 2. 1. 6 Homogenizado.....	11
2. 2. 1. 7 Almacenamiento.....	11
2. 3 Terpenos.....	12
2. 3. 1 Monoterpenos y sesquiterpenos.....	15
2. 3. 2 Rutas de biogénesis.....	15
2.4 Microextracción en fase sólida.....	18
2. 4. 1 Formas de extracción en MEFS.....	21
2. 4. 2 Aplicaciones de MEFS en alimentos y bebidas.....	23
2. 5 Cromatografía de gases acoplado a Espectrometría de masas (CG-EM).....	23
2. 6 Análisis estadístico multivariado .....	25
2. 6. 1 Análisis de componentes principales .....	25
2. 6. 2 Análisis de conglomerados.....	26
2.7 Antecedentes de análisis de terpenos en agave por cromatografía de gases....	26
3. <b>Objetivos</b> .....	28
3.1 Objetivo General.....	28
3. 2 Objetivos particulares.....	28
4. <b>Parte Experimental</b> .....	29
4. 1 Materiales y Equipo.....	29
4. 2 Acondicionamiento de las fibras para MEFS.....	29
4. 3 Estándares.....	30
4. 4 Reactivos.....	30
4. 5 Muestras.....	30
4. 6 Preparación de la muestra.....	31
4. 7 Determinación de humedad.....	31
4. 8 Análisis cromatográfico.....	32
4. 9 Identificación de terpenos.....	32
4. 10 Cuantificación de terpenos.....	32
4. 11 Microextracción en fase sólida.....	33
4. 11. 1 Selección de parámetros de la MEFS.....	33
4. 11. 1. 1 Selección de la preparación de muestra.....	33
4. 11. 1. 2 Selección de la cantidad de muestra.....	33
4. 11. 1. 3 Selección del tipo de fibra.....	33
4. 11. 1. 4 Temperatura de extracción.....	34
4. 11. 1. 5 Perfil de tiempo de extracción.....	34
4. 11. 1. 6 Efecto de la fuerza iónica.....	34

4. 11. 1. 7 Efecto de la agitación.....	34
4. 12 Análisis de terpenos por MEFS-CG-EM.....	34
<b>5. Resultados y discusión.....</b>	<b>36</b>
5. 1 Determinación de humedad.....	36
5. 2 Selección de parámetros para MEFS-CG-EM.....	36
5. 2. 1 Selección de la preparación de muestra.....	36
5. 2. 2 Selección de la cantidad de muestra.....	37
5. 2. 3 Selección del tipo de fibra.....	38
5. 2. 4 Temperatura de extracción.....	40
5. 2. 5 Perfil de tiempo de extracción.....	41
5. 2. 6 Efecto de la adición de NaCl.....	42
5. 2. 7 Efecto de la agitación.....	43
5. 3 Identificación de terpenos.....	43
5. 4 Análisis multivariado.....	50
5. 4. 1 Análisis de componentes principales.....	51
5. 4. 2 Análisis de conglomerados.....	53
5. 5 Cuantificación de terpenos.....	55
5. 5. 1 Linealidad del método.....	55
5. 5. 2 Limite de detección y cuantificación.....	56
5. 5. 3. Cuantificación de terpenos en agave.....	56
<b>6. Conclusiones.....</b>	<b>59</b>
<b>7. Anexos.....</b>	<b>60</b>
<b>8. Bibliografía.....</b>	<b>66</b>

## RESUMEN

Se desarrolló un método por Microextracción en Fase Sólida-Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas para la identificación y cuantificación de terpenos en agave mezcalero. Se analizaron 6 diferentes agaves utilizados en la producción de mezcal, todos obtenidos dentro de la región de protección a la denominación de origen de mezcal: *A. salmiana* var *salmiana* Otto ex salm-Dick (San Felipe, Guanajuato), *A. duranguensis* Gentry (Nombre de Dios, Durango) *A. karwinskii* Zucc. (Santa Catarina, Oaxaca y San Baltazar Chichicapam, Oaxaca) *A. cupreata* Trel & A. Berger (Chilapa, Guerrero) *A. salmiana* Otto ex salm-Dyck ssp. *crassispina* (Trel.) Gentry (Charcas, San Luis Potosí) y *Agave angustifolia* Haw. (Santiago Matatlán, Oaxaca)

Se identificaron 26 terpenos en los agaves analizados, de ellos 22 son monoterpenos y 4 sesquiterpenos. El linalol se identificó como uno de los mayoritarios en todos los agaves. En *A. duranguensis* se identificaron 22 terpenos, mientras que en el resto de agaves estudiados solo se identificaron entre 12 y 14. Los terpenos que se identificaron en todos los agaves fueron 9: linalol, terpinen-4-ol,  $\alpha$ -terpineol, nerol, carvona, geraniol, eugenol,  $\alpha$ -bisabolol y farnesol. El análisis de componentes principales y el análisis de conglomerados mostraron que los agaves con mayor similitud en el perfil de terpenos fueron *A. cupreata* y *A. salmiana* ssp. *crassispina* y *A. angustifolia*, por otro lado, el agave que presenta el perfil de terpenos con menor similitud de entre los 6 taxa estudiados fue *A. duranguensis*.

El método desarrollado presentó buena linealidad ( $r^2 > 0.9933$ ) y aceptable precisión (CV < 10%). Se cuantificaron 6 terpenos, los cuales previamente se habían identificado en todos los agaves. Se observó que el linalol fue el terpeno cuantificado en mayor concentración, lo cual se presentó en *A. salmiana* var *salmiana* con concentración de 4.28 $\mu$ g/100g de agave. El linalol fue el terpeno cuantificado en mayor concentración en los 6 agaves con un total de 7.12  $\mu$ g/100g de agave, mientras que el nerol fue el de menor concentración con un contenido total de 0.40  $\mu$ g/100g de agave. El *A. duranguensis* fue el que mayor concentración total de terpenos presentó con 7.36  $\mu$ g/100g de agave, mientras que *A. cupreata* fue el que menor concentración total de terpenos presentó con 0.35  $\mu$ g/100g de agave.

## 1. INTRODUCCIÓN

El mezcal es una bebida regional mexicana que cuenta con la protección a la denominación de origen, la cual fue obtenida en 1994, por lo que sólo en algunos estados de la república mexicana se puede producir. La producción de esta bebida es artesanal, por lo que las variaciones en el sabor y aroma dependen en gran medida del proceso de elaboración y materia prima utilizada. Esta bebida ha adquirido con el paso de los años el reconocimiento nacional, incluso su comercialización ha ido en aumento, llegando a ser un producto de exportación<sup>1</sup>, dejando de ser solo una bebida de consumo regional.

Para la elaboración del mezcal se utiliza el agave, también conocido en todo el territorio nacional como maguey. Existen diferentes tipos de agave que se pueden utilizar en la producción de mezcal, debido a que prácticamente todas las especies que se encuentran en el territorio de la denominación de origen pueden ser utilizadas con este fin. El estudio químico del agave es hasta ahora muy pobre a pesar de su importancia para la elaboración de mezcal y de la gran cantidad de usos que ha tenido esta planta desde tiempos prehispánicos en prácticamente todo el país.

Por todo lo anterior y por la relevancia como actividad económica en varios estados de la república, es importante realizar el estudio y caracterización química de los compuestos de esta bebida y su materia prima. Es importante mencionar que hasta ahora se han identificado compuestos como alcoholes superiores, aldehídos, cetonas, lípidos, ácidos grasos y terpenos en mezcal<sup>2</sup> y tequila<sup>3</sup>. En particular los terpenos son una parte importante en el sabor y aroma de este tipo de bebidas, por lo que su identificación en la materia prima es de gran interés.

El análisis de terpenos ha sido por mucho tiempo un tema a tratar en diversos tipos de plantas, esto en gran medida por las funciones tan diversas que realizan estos compuestos. En el presente trabajo se pretende desarrollar una metodología sencilla para la identificación y cuantificación de terpenos en diferentes tipos de agave utilizados como materia prima en la elaboración de mezcal, contribuyendo con esto a la caracterización química de dicha planta.

## 2. ANTECEDENTES

### 2. 1 El agave o maguey

El agave o maguey ha tenido gran importancia desde tiempos antiguos en diversos grupos de población de nuestro continente. Se puede decir que ningún otro grupo de plantas silvestres de México ha tenido tantos usos como el maguey <sup>4</sup>.

En la cosmogonía indígena registrada en los códices mexicanos se aprecia a Mayahuel, Diosa del maguey, amamantando con la secreción del maguey, el aguamiel, a un niño o a un pez que representa a la humanidad <sup>1</sup> esto denota la importancia que tenía esta planta en su religión, como alimento de los pueblos y en su economía.



Figura 1. Mayahuel, Diosa del Maguey.

La palabra agave proviene del griego “*agaves*” o “*agavos*” que significa noble, ilustre, admirable, magnífica, agave es de esta manera una palabra gallarda, majestuosa, y distinguida <sup>5</sup>. El Barón Alejandro Von Humboldt escribió: “El maguey es la más útil de todas las producciones que la naturaleza ha concedido a los pueblos de América Septentrional” <sup>1</sup>. Esta descripción no sólo se refiere a la forma en la que vive en medio semidesértico, sino también las características como su floración, de tal manera que no sorprende que Linneo lo clasificara con el nombre de agave.

La palabra maguey tiene su origen en las Antillas que como nombre genérico se aplica a las cerca de 200 especies del género *agave* <sup>6</sup>, llegó a nuestro país en boca de los

conquistadores. Philip Motley Palmer en un trabajo sobre la contribución del nuevo mundo al vocabulario hace derivar la palabra maguey del taino “meguey”, “megheih” o sea agave <sup>7</sup>. En nuestras lenguas nativas al maguey se le llamaba de diversas formas: en náhuatl “metl”, en purépecha “tocabamba”, en otomí “guada” <sup>8</sup>, culturas que consideraban al maguey como una deidad por su importancia económica y social, manifestada por los múltiples usos que le daban.

Como centro de origen y distribución del género *Agave* se considera a la altiplanicie mexicana pero dentro de la república no existe un acuerdo de la zona de origen de la planta. Actualmente el género *Agave* se encuentra distribuido en las zonas áridas y semiáridas de México, Estados Unidos y América del sur hasta Colombia <sup>3</sup>.

Las especies de agave en México pueden ser encontradas en alturas de hasta 3400 metros sobre el nivel del mar (msnm), aunque la mayoría son más comunes entre 1000 a 2000 msnm. En México los agaves también pueden ser encontrados en diferentes ambientes <sup>9,10</sup>.

### **2. 1. 1 Identidad botánica**

En 1915, Berger fue quien finalmente organizó la botánica europea sobre *Agave* en una monografía, describiendo 274 especies en los tres subgéneros: *Manfreda*, *Littaea* y *Euagave*. Basándose en las características de la inflorescencia, para *Littaea* creó siete secciones y para *Euagave* dieciocho series. Algunas de estas secciones y series fueron subdivididas en subsecciones o se designaron en otras subdivisiones. Trabajó poco a nivel de especie, pues las variaciones vegetativas más que la morfología floral guiaron su concepto de especie <sup>5</sup>.

El número de especies de agave en México ha variado dependiendo de la delimitación taxonómica del género. Trelease (1920) reconoce 170 especies, Gentry (1982) en su análisis sistemático del género considera que hay 125 especies, mientras que para Thiede (2001) existen 149. El número total es directamente referido al criterio taxonómico usado. García-Mendoza (2002) considera que México tiene 150 especies mas 36 taxa infra-específico, dando un total de 186 taxa. Esto representa el 75% del número total de especies conocidas en el mundo <sup>9</sup>.

La Tabla 1 muestra que de los 186 taxa reportados para México por García-Mendoza <sup>9</sup>, 129 (69%) son endémicos. Del número total de especies endémicas reportadas para México, un alto porcentaje son taxa microendémicos, porque su distribución está confinada a menos de 30,000 Km<sup>2</sup>.

Tabla 1. Especies endémicas de Agave en México

<b>Subgénero</b>	<b>Taxa en México</b>	<b>Taxa endémicos</b>
agave	119	74
littae	67	55
Total	186	129 (69%)

Debido a que no existe un acuerdo de clasificación del agave, la clasificación taxonómica ha sido motivo de confusiones entre los botánicos. Entre las más aceptadas se encuentra la siguiente <sup>11</sup>:

Reino: Plantae

División: Angiospermae

Clase: Monocotyledoneae

Orden: Asparagales <sup>12</sup>

Familia: Agavaceae

Subfamilia: Agavoideae

Género: *Agave*

Las plantas de maguey tienen el tronco reducido o nulo y las hojas suculentas y fibrosas, dispuestas en rosetas, anchas y gruesas, con púa terminal y borde armado frecuentemente de espinas. Son plantas perennes, rizomatosas, monocárpicas, semélparas, esto es, que solo tienen una floración al cabo de la cual la planta muere. La inflorescencia es una panícula de flores dispuestas en lo alto de un eje, escapo floral largo semileñoso, también llamado “quiote”. Las flores son color amarillo verdoso. Aún cuando exista alta producción de semilla en la reproducción sexual, debido a su gran depredación y también a que las condiciones de germinación no son siempre muy adecuadas, su reproducción es principalmente de forma asexual (normalmente por hijuelos) <sup>5</sup>. Se pueden formar los vástagos (hijuelos) en la base del tallo, también pueden reproducirse a través de un rizoma los cuales son tallos subterráneos que, cada

cierto tiempo, producen raíces y tallos que salen a la superficie. También pueden formarse propágulos, las cuales son estructuras esféricas formadas por grupos de células ubicadas en la inflorescencia que puede desprenderse y formar una nueva planta.

Los agaves por ser plantas suculentas ocupan un rango único en su nicho ecológico, su principal estrategia de evasión de la sequía es fijar por la noche el CO<sub>2</sub> requerido, este a su vez es convertido a ácidos orgánicos tales como málico y aspártico y que finalmente serán asimilados como carbohidratos por la planta <sup>13</sup>. Este tipo de metabolismo adaptativo a los medios áridos es denominado metabolismo ácido en crasuláceas (CAM por sus siglas en inglés).

## **2. 1. 2 Usos del agave**

El agave ha tenido y aún hoy en día tiene gran importancia en diversos grupos de población de nuestro país. Los usos del maguey, sus beneficios y su aprovechamiento por el hombre han cambiado con el transcurso del tiempo. La transformación ha sido radical en el sentido de que conforme apareció y se desarrolló la civilización mesoamericana, se descubrieron nuevas propiedades de la planta, nuevas formas de utilizarla, hasta llegar a un aprovechamiento integral de cada una de sus partes. El agave ha sido usado desde tiempos prehispánicos como alimento, bebidas, utensilios, medicina, forraje y fibras textiles entre otros <sup>14</sup>.

Para su uso como alimento, los indígenas seleccionaban para cultivar las especies más dulces y cocinaban las partes más suaves por medio de fuego directo o con agua caliente en sitios que tenían una apariencia semejante a la de un roscadero, en el que se colocaba carbón <sup>4</sup>. Un método para cocinar el agave utilizado antiguamente y que hoy en día sigue en uso común es en hoyos (hornos) de cocimiento. Los hornos los hacían (aún actualmente) las familias, generalmente los hombres y niños se encargaban de coleccionar tallos (piñas) y las mujeres y niñas la leña para cocerlas. Una vez cocidas las piñas eran cortadas en pedazos para comer o almacenarse para usos futuros <sup>5</sup>. Actualmente se utilizan las flores, las cuales se cuecen, se mezclan con otros alimentos como huevo y se fríen para su consumo. Otra delicia de los agaves son los gusanos blancos o rojos (chinicuiles) que atacan la base de los tallos, por lo general se consumen fritos. También se pueden utilizar saborizantes y condimentos hechos a base de cabezas de maguey <sup>5,1</sup>.

Como bebidas se utilizan varias especies de agave, la bebida de agave más antigua que aún se produce es el pulque. Otras bebidas elaboradas a partir del agave son el aguamiel, vinagre, atole, acapulque, tequila, mezcal y bacanora.

Como utensilios: de las hojas no expuestas se saca la cutícula para hacer hojas para envolver alimentos. Las fibras de las hojas son usadas en la fabricación de hilos, tejidos, redes, sacos, muebles, carpetas, tapicería, cobertores, canastos, tejidos, cordeles para pescar, sandalias y ropa. Los escapos florales, hojas y cabezas se utilizan como madera para combustible. Se utilizan para delimitar predios ya sea plantando el agave o construyendo cercos con vigas hechas a base de las pencas y del escapo floral <sup>1, 13</sup>.

Actualmente uno de los mayores usos de la planta es como forraje para animales, pues se utilizan principalmente las pencas como alimento para ganado vacuno y porcino. Como alimento de aves se utilizaban las pencas y residuos del pulque.

Desde el punto de vista medicinal se ha utilizado el zumo de la raíz del agave, el jugo de las hojas, el zumo del quiote, el aguamiel de la piña y la raíz hervida. Era común utilizar el pulque para aliviar dolores musculares de las mujeres después del parto. Las pencas tatemadas eran usadas como prevención del escorbuto <sup>4, 5</sup>.

El agave también tiene uso ornamental, ya que se ha convertido en una de las plantas de ornato preferidas en los jardines botánicos tanto públicos como privados alrededor del mundo. En algunos lugares se utilizan las plantas de maguey para delimitar terrenos. La piña se usa incluso como maceta ornamental <sup>5</sup>.

En base a evidencias de heces humanas fosilizadas, se demostró que los cactus y agaves fueron consumidos por humanos desde hace 9000 años <sup>13</sup>, también se han publicado evidencias de esto después de examinar cientos de pruebas y en resumen en la dieta de los habitantes en el periodo de 7000 años a.C. a 1500 años d.C., los principales alimentos fueron: Ceibas, cactáceas, cucurbitáceas y por supuesto agave <sup>4, 15</sup>.

La Tabla 2 es un cuadro comparativo de las características más importantes de los 6 agaves analizados en el presente estudio.

Tabla 2. Características generales de los agaves en estudio <sup>6, 8, 16-18</sup>.

Agave	<i>angustifolia</i>	<i>salmiana</i> ssp. <i>crassispina</i>	<i>duranguensis</i>	<i>salmiana</i> var. <i>salmiana</i>	<i>cupreata</i>	<i>karwinskii</i>
<b>Nombre vulgar</b>	Agave espadín	Agave cimarrón o mezcalero	Agave cenizo	Agave verde o mezcalero	Agave ancho, bravo o papalote	Agave Cirial o Tobasiche
<b>Tamaño promedio de la piña</b>	1m de diámetro	2m de diámetro	0.8 a 1.8 m de diámetro	0.8 a 1.2 m de diámetro	1.5 a 1.8 m de diámetro	0.8 a 1.2 m de diámetro.
<b>Largo de las hojas</b>	50 a 60 cm	90 a 120 cm	40 a 90 cm	80 a 90 cm	65 a 85 cm	35 a 70 cm
<b>Ancho de las hojas</b>	7 a 8 cm	20 a 25 cm	14 a 22 cm	17 a 21 cm	20 cm	4 a 6 cm
<b>Color de las hojas</b>	Verdes grisáceas, con margen amarillo	Bandas anchas verdes y tonos en color gris	Verde	Verde brillante	Ligeramente verdes (pálidas)	Verde
<b>Características generales de las hojas</b>	Numerosas, rígidas, en forma de lanza, rectas, planas o ligeramente cóncavas, en la base son convexas	Cóncava a la mitad de la hoja. Ancha en la parte media y baja, parte superior erguida o en forma de lanza	En forma de lanza, planas o ligeramente cóncavas, ancha en la base y en la parte media, delgada en la parte superior	Hojas verdes. Largas, en forma de lanza, ligeramente plana, ancha en el centro	Aplanadas o ligeramente curvas hacia el centro. La base ligeramente angosta, ancha en el centro y extremo agudo	Rígida, cóncava en el centro. Con forma de punta o lanza
<b>Tamaño y color de las flores</b>	5 cm Amarillo verdosas	9 a 10 cm Amarillas-verdosas brillantes	6 a 8 cm Abundantes. Amarillas.	10 cm Amarillas con brillo.	5 a 6 cm Amarillas a naranja	3.5 a 5 cm Café verdosas
<b>Altura del quito o inflorescencia</b>	2.5 a 3.0 m	8 a 10 m	7 a 8 m	7 a 9 m	4 a 7m	4 a 6 m
<b>Espina terminal de la hoja (espina)</b>	Café oscura o negra, plana. 4 mm de ancha y de 18 a 25 mm de larga	Color púrpura a negro, punta color gris. De 5 a 15 mm de ancha y de 25 a 50 mm de larga	Gris a café. Dura, acanalada y ancha. De 40 a 60 mm de larga	Café oscuro. Ancha en su totalidad, excepto la punta. 50 a 90 mm de larga	Color cobrizo. 5mm de ancha y 45 mm de larga	Color café oscuro. De 3 a 6 mm de ancha y 25 a 50 mm de larga
<b>Espinas laterales de la hoja (dientes)</b>	Muy delgadas, rígidas, con cierta inclinación hacia arriba. De 3 a 5 mm de anchas, de 20 a 25 mm de largas	Curvadas hacia delante o hacia atrás de la hoja, de base ancha en forma de montecillo De 4 a 15 mm	Prominentes, carnosas, flexibles, anchas y planas. De 10 a 20 mm	Separación de 3 cm entre si, duras, color verde grisáceo. De 7 a 12 mm de largas	Planas, curvas desiguales, separadas entre si. De 10 a 15 mm de anchas y 30 a 60 cm de largas	Separadas entre si por 2 a 4 cm. Color café oscuro. De 3 a 5 mm. De anchas De 25 a 45 mm de largas
<b>Distribución en México.</b>	Oaxaca, Guerrero y Durango	San Luis Potosí y Durango	Durango y Zacatecas	Guanajuato, Durango, Zacatecas y San Luis Potosí	Estado de México, Michoacán y Guerrero	Puebla y Oaxaca

Internacionalmente los agaves son conocidos por las bebidas destiladas obtenidas a partir de ellos <sup>15</sup>, como lo son el tequila, el bacanora y el mezcal.

## **2.2 El mezcal**

La palabra mezcal proviene del término náhuatl “mexcalli”, mismo con el que los pueblos mesoamericanos nombraban a la piña cocida o centro del maguey, de la que obtenían dulce y miel, además de fermentarla en algunas ocasiones para su consumo <sup>4</sup>. En efecto el diccionario de la Real Academia Española así lo consigna y establece dos de los significados actuales de mezcal: a) Variante de maguey y b) Aguardiente que se obtiene de la fermentación y destilación de las cabezas de esta planta <sup>6</sup>.

Todas las bebidas alcohólicas del mundo precolombino eran obtenidas por medio de la fermentación, por lo que su graduación resultaba relativamente baja. Los pueblos prehispánicos desconocían el proceso de destilación, en la manufactura de los licores. Los conquistadores hispánicos introdujeron desde el siglo XVI el alambique de herencia árabe, con esta mezcla de culturas se obtuvo entre otras bebidas destiladas, el mezcal. Para los indígenas de México, el mezcal ha sido una bebida tradicional y estimulante, algunos mencionan que ha llegado a tener características de comunicación con lo sobrenatural, lo que le otorga un misticismo difícil de imaginar si no se conocen sus efectos liberadores sobre nuestras acciones conscientes <sup>4</sup>.

El mezcal es una bebida alcohólica regional obtenida de la destilación y rectificación del mosto fermentado de cabezas maduras de agave, previamente cocidas a fin de hidrolizar los polisacáridos presentes. Los azúcares en el mosto pueden provenir totalmente del agave (mezcal 100% agave) o mezclarse con hasta 20% de otros carbohidratos. Es un líquido incoloro o amarillento cuando es abocado, reposado o añejo <sup>19</sup>.

El mezcal se puede dividir en tres categorías:

- Joven: Aquel que se envasa sin reposo o añejamiento
- Reposado: Producto susceptible de ser abocado que se deja por lo menos dos meses en recipientes de madera de roble blanco o encino.

- Añejo: Producto susceptible de ser abocado, sujeto a un proceso de maduración de por lo menos un año en recipientes de madera de roble blanco o encino. En mezclas de diferentes mezcales añejos la edad para el mezcal resultante es el promedio ponderado de las edades y volúmenes de sus componentes.

El Mezcal, al igual que otras bebidas como el Coñac, el Champagne, el Tequila, sólo es posible obtenerlo en una región específica, la cual fue registrada el 9 de Marzo de 1995 en la declaración de protección de la denominación de origen del Mezcal por la Organización Mundial de la Propiedad Intelectual (OMPI) con sede en Ginebra, Suiza<sup>20</sup>. Por denominación de origen se entiende el nombre de una región geográfica del país que sirva para designar un producto originario de la mismas y cuya calidad o característica se deban exclusivamente al medio geográfico comprendido en este los factores naturales y los humanos <sup>21</sup>.

El mezcal adquiere rasgos particulares en sus atributos sensoriales de acuerdo al tipo de mezcal, región y especie de agave utilizado <sup>22</sup>. Por lo tanto la composición del mezcal varía en función de estos factores.

De acuerdo a la NOM-070-SCFI-1994 <sup>19</sup> existen varias especies de agave cuyo jugo puede ser fermentado y destilado para la producción de mezcal, entre las que destaca: *Agave salmiana*, *Agave angustifolia*, *Agave potatorum*, entre otras.

## **2. 2. 1 Proceso de elaboración de mezcal**

### 2.2.1.1 Selección de las piñas

Las plantas de agave deben ser seleccionadas de acuerdo al grado de madurez de la planta, normalmente se relaciona directamente con la edad de la planta. Se deben elegir aquellas que están por iniciar o están iniciando su etapa reproductiva. Generalmente meses atrás se debe quitar el qurote o ápice floral, con lo cual se tiene la mayor cantidad de azúcares en la piña. Los agaves gastan una gran cantidad de energía en lo que se llama “propagación de floración”. Si el agave florece, en la piña (corazón) disminuye la concentración de carbohidratos, además la planta deja de producir vástagos y el agave muere; en cambio si se capa, los carbohidratos se concentran en el corazón del agave y, este vive más tiempo y puede seguir reproduciéndose por vástagos.

Es importante mencionar que el tamaño de la piña de agave no es criterio del grado de madurez de la planta. El desarrollo alcanzado por un maguey maduro y por consecuencia de su cabeza parece depender muy poco de la edad y mucho más del vigor de la planta madre, de número y edad de hijuelos hermanos competidores, época del año, clima, calidad, inclinación, recuperación de suelo y condición del micrositio donde se desarrolla. Las variaciones en el tamaño de las piñas puede ser muy alto en una misma zona de producción de agave, ya que estas pueden llegar a pesar entre 12 y 250 Kg al momento de su uso para la producción de mezcal <sup>6</sup>. Otra característica del grado de madurez es la coloración y aspecto de la planta, una coloración amarilla que tiende a rojiza denota madurez de la planta.

#### 2. 2. 1. 2 Horneado (Cocción)

Este proceso tiene la finalidad de hidrolizar los polisacáridos en fructosa. La mayoría de las fábricas de mezcal utilizan hornos excavados en la tierra recubiertos de piedra, en general, la capacidad de estos hornos es de 3 a 7 toneladas de maguey. En el horno se pone leña y piedras que se van calentando conforme se consume la leña. Cuando el horno se encuentra lo suficientemente caliente se meten las cabezas de agave. Las piedras mantienen el calor necesario para el horneado, este cocimiento debe durar por lo menos 72 horas <sup>8</sup>.

#### 2. 2. 1. 3 Molienda

Una vez horneadas las piñas se trocean para llevar a cabo la molienda, esta se realiza en molinos circulares de piedra con un eje central en torno al cual gira una pesada rueda de piedra <sup>8</sup>. La forma más común de mover la rueda es mediante tracción animal, ya sea con caballos, mulas o burros. La molienda del maguey horneado facilita la fermentación ya que desgaja los tejidos del maguey y los expone a una mayor acción del ambiente. Este proceso tiene como finalidad hacer que los monosacáridos obtenidos en la cocción se encuentren más disponibles a la acción microbiana <sup>23</sup>.

#### 2. 2. 1. 4 Fermentado

El maguey molido o pulpa se deposita en tinajas de madera y se agrega agua para que fermente en su propia levadura en un periodo que va de 3 a 5 días según la temperatura ambiente. La función de la fermentación consiste en el desdoblamiento de los hidratos

de carbono por parte de microorganismos, así los azúcares contenidos en las piñas se transforman en etanol, aunque en este paso además de este compuesto principal se obtienen algunos aldehídos, cetonas, metanol, CO<sub>2</sub>, entre otros.

#### 2. 2. 1. 5 Destilación

La destilación del mezcal se realiza con la presencia del bagazo y con el empleo de equipos de fabricación artesanal, ya sea completamente de cobre o en equipos hechos de ollas de barro con partes de cobre y/o hierro. El más utilizado es el alambique de cobre, el cual se calienta con leña y a fuego directo. El resultado de la primera destilación se redestila para obtener lo que se conoce como mezcal bronco. A esta segunda destilación algunos productores de mezcal la llaman rectificación o refinación.

#### 2. 2. 1. 6 Homogenizado

Para terminar el mezcal bronco es llevado a las envasadoras, donde es homogenizado y estabilizado, dándole el grado alcohólico requerido para su venta, que de acuerdo a la Norma debe de estar comprendido entre 36 y 55 % de alcohol.

#### 2. 2. 1. 7 Almacenamiento

El producto final, mezcal con la graduación alcohólica mencionada es comúnmente almacenada temporalmente en recipientes de plástico de 20 L o tambos de plástico de 200 L. En menor cantidad se disponen en barricas de roble blanco o encino.

Para realizar la degustación del mezcal es frecuente encontrar la venencia (carrizo ahuecado con una perforación en su extremo inferior); mediante este instrumento se succiona con la boca el mezcal para dejarlo caer en una jícara y así observar la formación del “cordón” o “perlado” que es indicio de la graduación alcohólica y es debido también a la presencia de compuestos que modifican la viscosidad y tensión superficial del mezcal.

El aroma y sabor de un mezcal se ve ampliamente influenciado por compuestos como ácidos grasos, ésteres, alcoholes, cetonas, aldehídos, hidrocarburos y terpenos entre otros. Normalmente los terpenos se encuentran en el aceite esencial de las plantas. La presencia de los terpenos en particular es de especial importancia en el agave mezcalero, ya que este grupo de compuestos tiene umbrales olfativos bajos, por lo tanto son parte

muy importante en el sabor y aroma del mezcal <sup>24</sup>. En particular los terpenoides han sido implicados en diversas funciones en plantas y animales, como: hormonas sexuales, feromonas de insectos, fitohormonas, inhibidores de la germinación, sustancias de crecimiento, pigmentos fotosintéticos, secreciones de defensa, entre otras <sup>25</sup>.

### 2.3 Terpenos

Los terpenos son metabolitos secundarios muchos de ellos conocidos por realizar funciones biológicas específicas en plantas y animales <sup>26</sup>. Este grupo de compuestos se encuentra ampliamente distribuido en plantas y otros organismos. La palabra deriva de “*turpentina*” (trementina) que es la fracción volátil obtenida de la oleoresina que exuda de la superficie de un corte del pino resinero <sup>22</sup>. Las estructuras de los terpenos consisten en unidades repetitivas de isopreno.

Muchos de estos aceites esenciales se han utilizado desde la antigüedad como perfumes, medicinas, narcóticos, pigmentos, conservadores, etc. El término terpeno es comúnmente utilizado para los hidrocarburos formados a partir de unidades isoprénicas, cuando se trata de compuestos oxigenados como alcoholes, aldehídos, cetonas, etc., es más frecuente que se les denomine terpenoides, aunque actualmente los dos términos se utilizan indistintamente <sup>25</sup>.

Un ejemplo de la diversidad de funciones que cumplen los terpenos se presenta en la muña (*Minthostachys mollis*), un arbusto del Perú; al ser consumidas las hojas de esta planta por los insectos, se incrementa considerablemente la emisión de pulegona y mentona en las hojas. Estos dos terpenos son considerados como insecticidas naturales, pues son tóxicos para algunos insectos que parasitan dicha planta, inclusive en la misma hoja el efecto insecticida de ambos terpenos impide la gestación de huevecillos de parásitos en la planta. En este caso ambos terpenos funcionan como agentes de defensa de este arbusto <sup>27</sup>.

Los terpenos pueden ser encontrados en hojas, flores, semillas, tallos, algas, líquenes, insectos, mamíferos, entre otros, como se puede observar están ampliamente difundidos en la naturaleza. Es común encontrar terpenos en el aceite esencial de las plantas, frecuentemente estos aceites son asociados a otras sustancias, y tienden a resinificarse

por exposición al aire. El olor y el sabor de los aceites esenciales están determinados principalmente por sus constituyentes oxigenados, ya que presentan un grupo polar que puede favorecer su solubilidad en medios acuosos <sup>22, 28</sup>.

Las moléculas de isopreno se unen de acuerdo a la “regla biogenética del isopreno” <sup>25</sup> mediante uniones cabeza-cola, esta regla es válida en la mayoría de los casos de los terpenos más comunes.

Los terpenos se dividen de acuerdo al número de unidades de isopreno que lo conforman, la Tabla 3 muestra la clasificación de los terpenos de acuerdo a su número de carbonos, incluye sus respectivos precursores y algunas de las funciones que desempeñan en plantas.

Tabla 3. Clasificación de terpenos de acuerdo al número de carbonos <sup>25, 29</sup>.

<b>Tipo de terpeno</b>	<b>Número de carbonos</b>	<b>Precursor</b>	<b>Lugar de ocurrencia en plantas</b>	<b>Funciones</b>
<b>Hemiterpenos</b>	5	C5: Pirofosfato de dimetilalilo C5: Pirofosfato de isopentilo	Aceite esencial de plantas	Hormonas de plantas, protección de aparato fotosintético
<b>Monoterpenos</b>	10	C10: Pirofosfato de geranilo	Pétalos, aceites esenciales	Regulador del crecimiento, feromonas, sustancias de defensa
<b>Sesquiterpenos</b>	15	C15: Pirofosfato de farnesilo	Resina, aceites esenciales, pétalos	Feromonas, sustancias de defensa, sustancias de crecimiento
<b>Diterpenos</b>	20	C20: Pirofosfato de geranilgeranilo	Resinas ácidas, maderas	Feromonas, sustancias de defensa
<b>Sesterpenos</b>	25	C25: Pirofosfato de Geranilfarnesilo	Resinas ácidas, maderas	Sustancias de defensa
<b>Triterpenos</b>	30	2 unidades de C15: Pirofosfato de farnesilo	Ceras, resina, maderas	Constituyente de membrana

Las múltiples estructuras complejas de monoterpenos se pueden obtener por diversos rearreglos y ciclaciones del pirofosfato de geranilo, como se puede observar en la Figura 2. Estas reacciones son mediadas por las enzimas terpeno ciclasas <sup>25</sup>. Un

ejemplo de estas reacciones es la hidrólisis del pirofosfato de geranilo que da como resultado su alcohol correspondiente, el geraniol, que es el constituyente principal del aceite de rosas <sup>29</sup>. El geraniol es la típica esencia de geranios recién cortados, acompañado de un rearrreglo, la hidrólisis del geranil-PP puede producir linalol que es una sustancia aromática que se encuentra en varias flores o puede producir el nerol, isómero del geraniol. Estos arreglos ocurren durante la biosíntesis de una gran cantidad de terpenos. Los monoterpenos tienen como precursor el pirofosfato de geranilo, por lo que estos se generan mediante ciclaciones y rearrreglos a partir de dicha molécula, la Figura 2 muestra algunos ejemplos de lo mencionado.

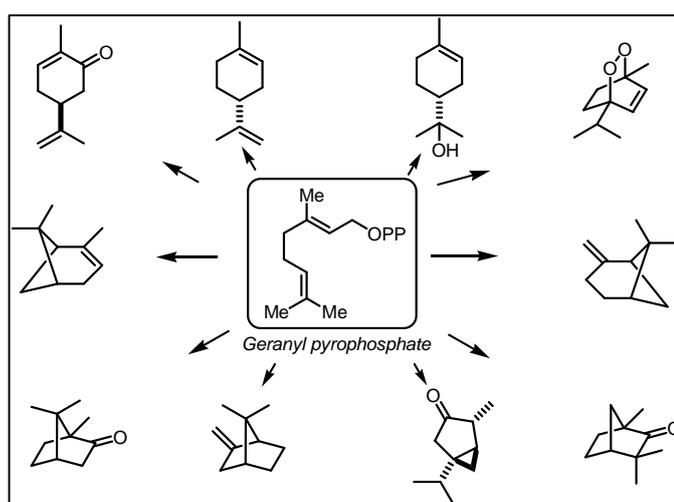


Figura 2. Ciclaciones y rearrreglos de pirofosfato de geranilo <sup>25</sup>.

En las plantas se han caracterizado miles de terpenos, estos compuestos tienen un origen biosintético en común, ya que están formados por unidades de isopreno y variaciones en estas unidades <sup>25</sup>. Los terpenos en plantas siguen las rutas de síntesis del ácido mevalónico (MVA) y del gliceraldehído-3-fosfato (DXP) que tiene como producto final al pirofosfato de isopentenilo (IPP), pirofosfato de dimetil-alilo (DMAPP) y por consecuencia los monoterpenos y sesquiterpenos. La isomería es muy común entre los terpenoides, y cuando se aíslan de las plantas se pueden obtener pares de isómeros como el caso del nerol y geraniol, que son isómeros *cis* y *trans* respectivamente.

En los terpenos reportados hasta ahora en el mezcal <sup>3</sup>, tequila <sup>2</sup> y agave para tequila (*Tequilana weber* variedad azul) <sup>30</sup> se encuentran terpenos y sesquiterpenos.

### 2. 3. 1 Monoterpenos y sesquiterpenos

El punto de ebullición de la mayoría de los monoterpenos es de aproximadamente 140 a 180 °C y pueden dividirse en tres grupos: en acíclicos, monocíclicos y bicíclicos, pueden ser hidrocarburos no saturados o saturados. El punto de ebullición de la mayoría de los sesquiterpenos, está por arriba de los 200 °C, y forman la fracción de punto de ebullición más alto de los aceites esenciales. Los compuestos pueden presentar insaturaciones con estructuras tan diversas como son: acíclicos, monocíclicos, bicíclicos y tricíclicos. Tanto monoterpenos y sesquiterpenos pueden presentar grupos funcionales, los más comunes con hidroxilos, cetonas y aldehidos <sup>31</sup>.

### 2. 3. 2 Rutas de biogénesis

El conocimiento fundamental de los aspectos químicos de los terpenoides fue elucidado por los trabajos realizados por Wallach y Ruzicka <sup>25</sup>, con su "Regla del isopreno biogenético", pero esta teoría no explica como se realiza la biosíntesis.

La ruta biosintética de los isoprenoides fue descubierta por Konrad Bloch y Lynen en 1956. En dicha ruta de biosíntesis se elucidó que el precursor de la biosíntesis de los terpenoides es el pirofosfato de isopentenilo y que a su vez tiene como precursor a la acetil-CoA. La ruta de síntesis del pirofosfato de isopentenilo se denominó la ruta del acetato-mevalonato, también llamada ruta del ácido mevalónico. Esta ruta se inicia a partir de acetil-CoA que se genera a partir de ácido pirúvico. El acetil-CoA se acetila para formar aceto-acetil-CoA, y posteriormente formar el ácido mevalónico, el cual es fosfatado para formar el mevalonato-5-difosfato y que finalmente por isomerización forma el pirofosfato de isopentenilo <sup>29, 32, 33</sup> (Figura 3).

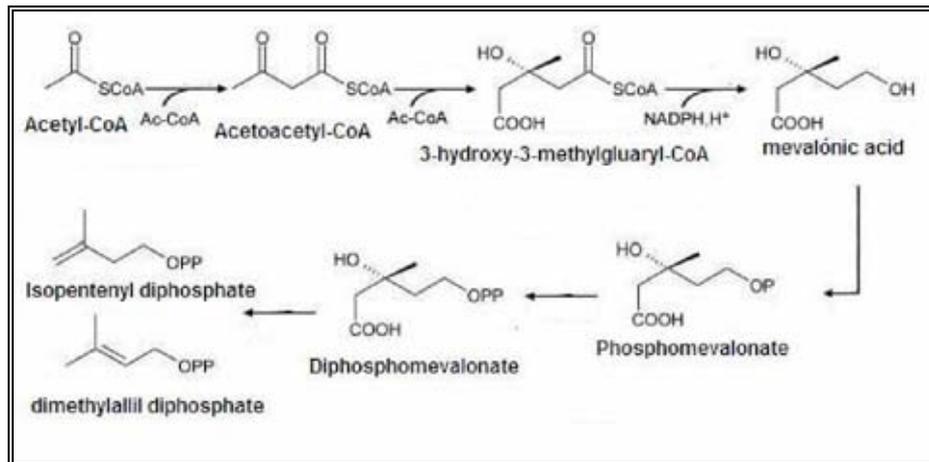


Figura 3. Síntesis de Pirofosfato de isopentenilo y Pirofosfato de dimetil-alilo a partir de acetil-CoA por la ruta del ácido mevalónico<sup>33</sup>.

En estudios recientes utilizando como marcador carbono 13 (C<sup>13</sup>) se demostró la existencia de una ruta diferente a la del ácido mevalónico (mevalonato independiente) para la biosíntesis de terpenos en plástidos de la célula (cloroplastos, leucoplastos y cromoplastos), eubacterias, algas y plantas primitivas. La ruta inicia con el gliceraldehído-3-fosfato (GAP) que se forma a partir de ácido pirúvico, por lo que la ruta se denomina GAP-piruvato o ruta DXP (debido al intermediario 1-desoxi-xilulosa-5-fosfato). En esta vía el GAP-Piruvato es convertido a 1-desoxi-xilulosa-5-fosfato por la enzima DXP-sintasa, y posteriormente a 2-metil-D-eritrol-4-fosfato por la enzima DXP-reductasa, finalmente por isomerización forma el pirofosfato de isopentenilo<sup>31</sup> (Figura 4).

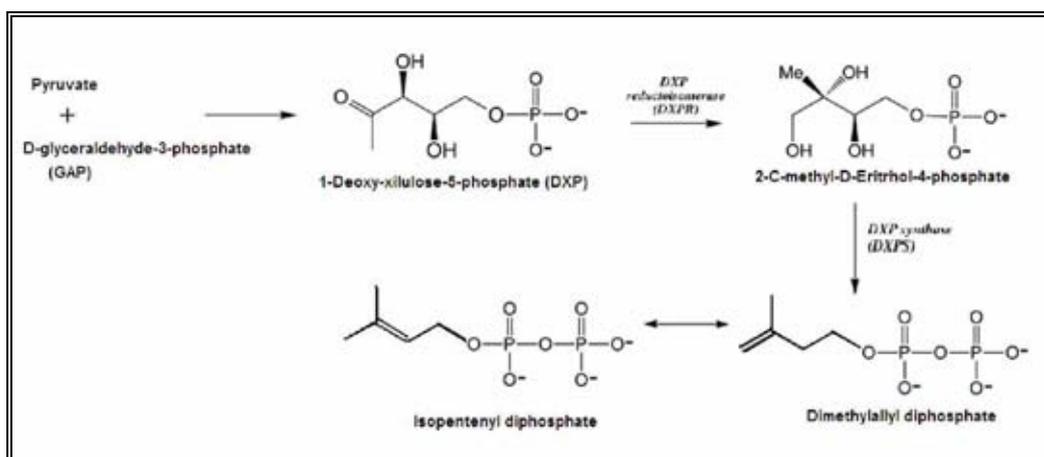


Figura 4. Síntesis de Pirofosfato de isopentenilo y Pirofosfato de dimetil-alilo a partir de Gliceraldehído-3-fosfato por la vía DXP<sup>33</sup>.

Se puede asegurar que la ruta del ácido mevalónico (MVA) se realiza en el citoplasma de la célula y es la responsable principalmente de la síntesis de esteroides y sesquiterpenos. Mientras que la ruta GAP-Piruvato (DXP) se realiza en plástidos (cloroplastos y leucoplastos) para generar compuestos diferentes a sesquiterpenos como isopreno, carotenoides, monoterpénos y diterpenos. La Figura 5 muestra el esquema simplificado y los sitios de biosíntesis de los diferentes terpenos en célula, la Figura 6 muestra la comparación general entre las dos rutas de biosíntesis de terpenos.

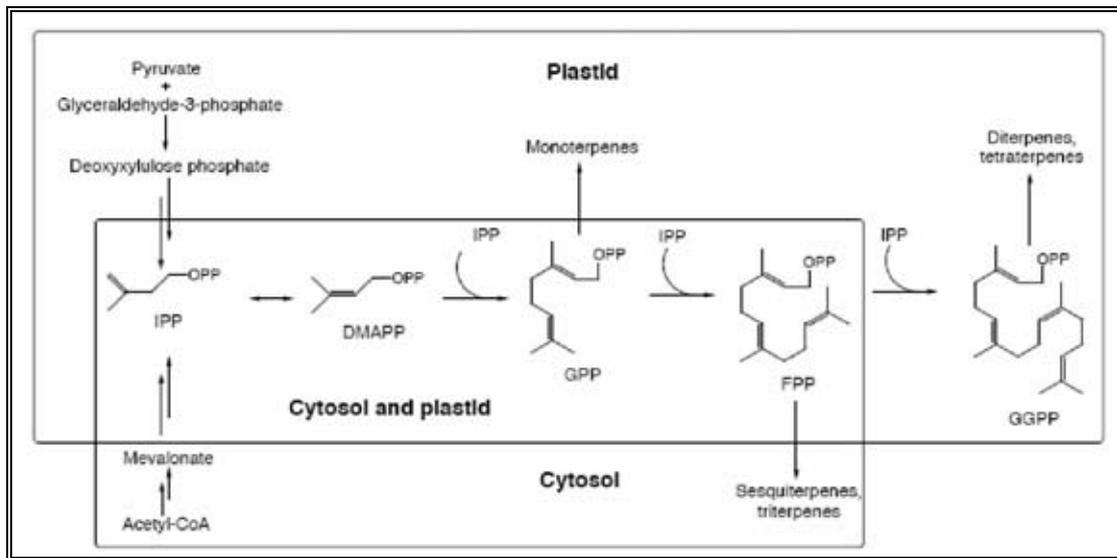


Figura 5. Esquema simplificado de las rutas de biosíntesis en célula <sup>34</sup>.

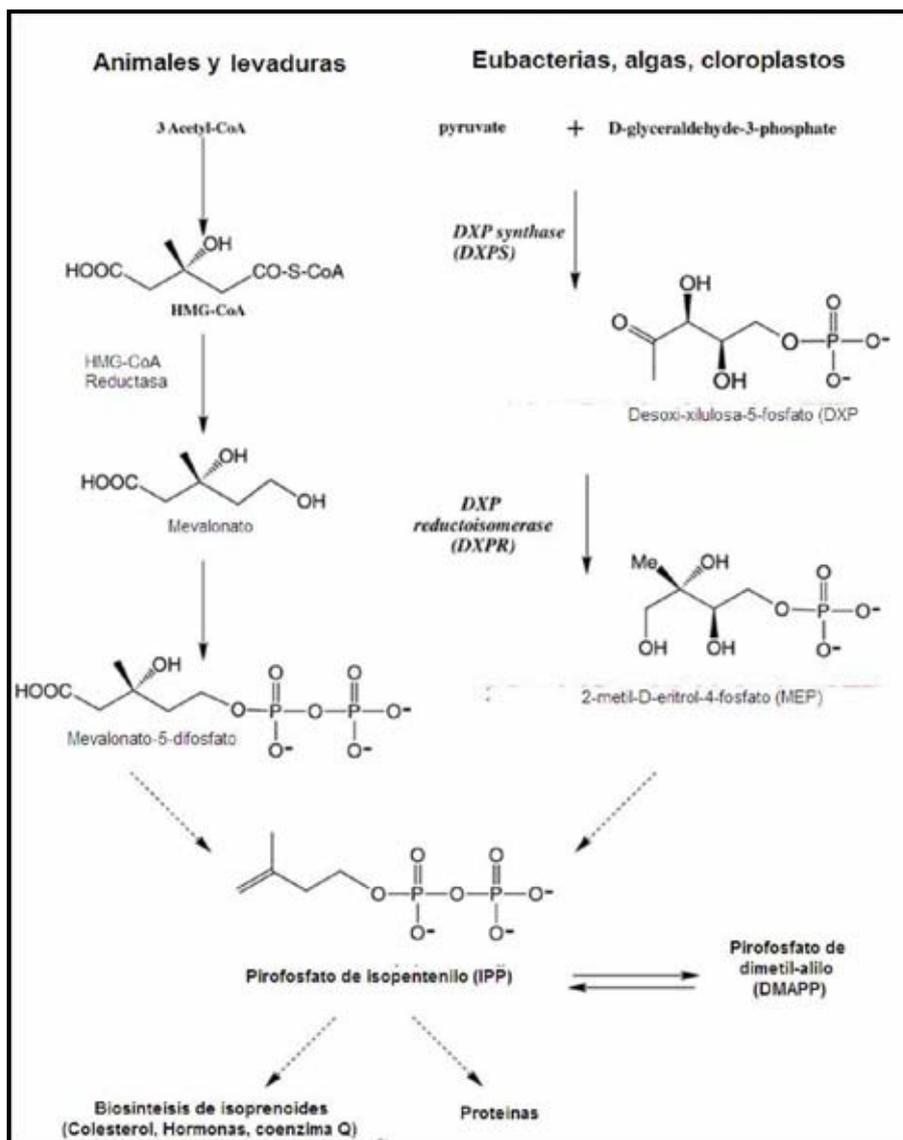


Figura 6. Rutas de biosíntesis de terpenos, a la izquierda la vía del ácido mevalónico (MVA), a la derecha la vía del GAP-Piruvato (DXP) <sup>29</sup>.

## 2.4 Microextracción en fase sólida.

La microextracción en fase sólida (MEFS) es una técnica de preparación de muestra desarrollada alrededor de 1990 por J. Pawliszyn y colaboradores. La MEFS consiste en una fibra de sílice fundida recubierta por una fase estacionaria <sup>35</sup>. Los analitos son directamente extraídos de la muestra y concentrados en la fase estacionaria. Esta técnica se puede utilizar en análisis de rutina en conjunto con equipos de cromatografía de gases o de líquidos.

Esta técnica presenta las siguientes ventajas frente a otros métodos de extracción:

- La extracción se puede realizar sobre muestras sólidas, líquidas o gaseosas
- El tiempo total de análisis es relativamente corto
- Es una técnica libre de disolventes
- Con las fases estacionarias comerciales que existen en el mercado (no más de 7) se puede realizar la extracción de una gran diversidad de analitos
- El límite de detección es del orden de ng/mL <sup>36</sup>

El principio en el que se basa la MEFS es la partición de los analitos entre la matriz de la muestra y el recubrimiento de la fibra, el transporte de los analitos desde la matriz de la muestra hasta la fibra comienza en el momento en que la fibra entra en contacto con la muestra y la extracción termina cuando la concentración de analito ha alcanzado el equilibrio de distribución entre la fibra y la muestra <sup>35</sup>. Esta no es una técnica de extracción exhaustiva, tiene un máximo de sensibilidad en el equilibrio de partición de los analitos, se obtiene una relación proporcional de los analitos adsorbidos por la fibra y su concentración inicial en la matriz de la muestra antes de alcanzar el equilibrio de partición, por lo tanto el equilibrio completo no es necesario para el análisis cuantitativo.

Entre las diferentes fibras que se encuentran actualmente en el mercado están: Polidimetilsiloxano (PDMS) con diferentes espesores (7, 30 y 100  $\mu\text{m}$ ) Polidimetilsiloxano-Divinilbenceno (PDMS/DVB) con espesores de 60 y 65 $\mu\text{m}$  (para CLAR y CG respectivamente), Poliacrilato (PA) de 85  $\mu\text{m}$ , Carbowax (Polietilenglicol)-Divinilbenceno (CW/DVB) espesores de 65 y 70 $\mu\text{m}$ , Carboxen (Carbón activado)-polidimetilsiloxano (CAR/PDMS) espesores de 75 y 85 $\mu\text{m}$ , Carbowax-Resina templada (CW/TPR) de 50  $\mu\text{m}$ , y Divinilbenceno-Carboxen-Polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) 50/30  $\mu\text{m}$ . La Figura 7 muestra un cuadro con las propiedades de las fibras de MEFS comerciales.

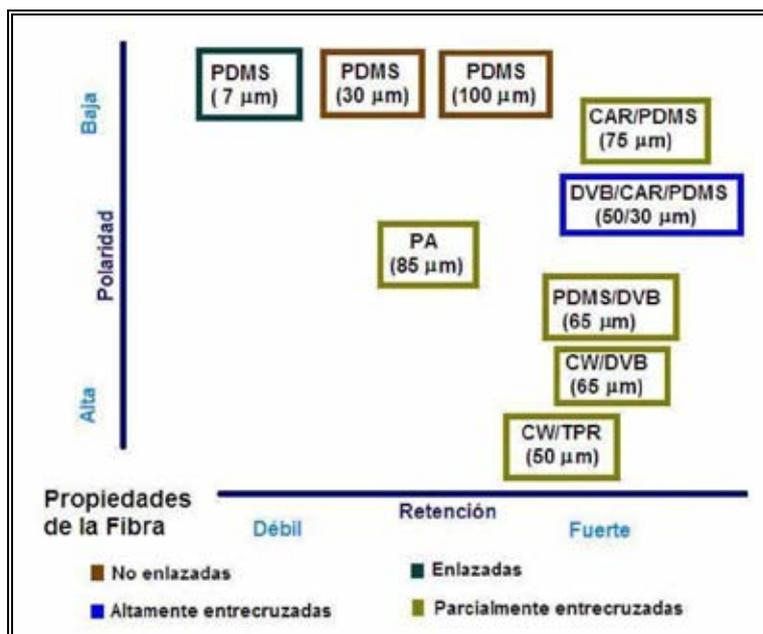


Figura 7. Fibras comerciales para MEFS <sup>36</sup>.

La Figura 8 describe el dispositivo manual comercial para la MEFS. Este dispositivo consiste esencialmente de una jeringa modificada que tiene un émbolo de resorte y un contenedor para albergar el émbolo. Unido al contenedor sobresale una aguja de acero inoxidable el cual encierra una aguja más delgada también de acero, que lleva montada una pieza de sílice fundida muy delgada. La parte de sílice fundida está recubierta con el material adsorbente que funciona como fase estacionaria durante la extracción de analitos. La fibra por si misma es químicamente inerte y muy estable a altas temperaturas. La aguja que sirve para cubrir la fase estacionaria también sirve para perforar el septum del vial que contiene la muestra, una vez dentro del vial, la fase estacionaria se expone directamente a la muestra o solo al espacio de cabeza (headspace) de la misma.

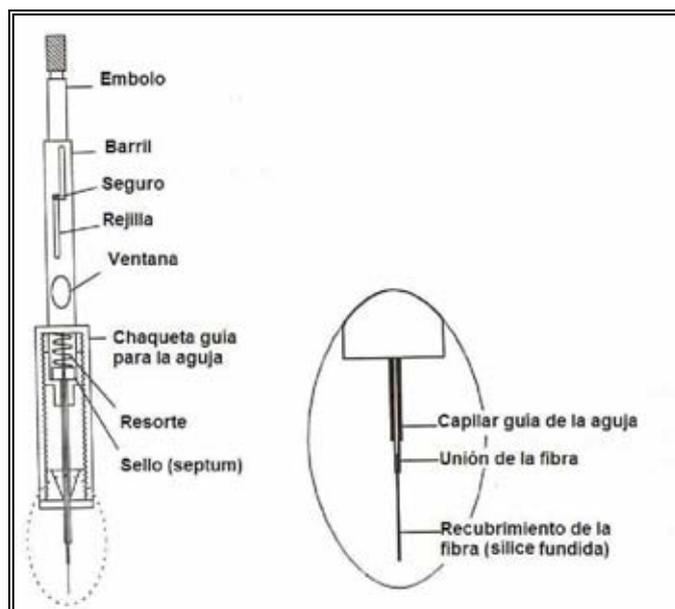


Figura 8. Dispositivo comercial de MEFS <sup>35</sup>

#### 2. 4. 1 Formas de extracción en MEFS.

Las formas de extracción de los analitos por MEFS son: extracción en headspace (en espacio de cabeza), extracción directa y extracción protegida con membrana.

La MEFS en modo “headspace” se utiliza para compuestos volátiles, donde la matriz en estudio se encuentra en estado sólido o líquido con compuestos de alto peso molecular. Los analitos son transportados a través del aire enriquecido a la fibra y de esta manera la fibra es protegida de interferencias de alto peso molecular o compuestos no volátiles <sup>36</sup>.

En la MEFS en modo de inmersión, la fibra se sumerge directamente en la muestra líquida, los analitos son entonces transportados directamente de la matriz hacia la fase de extracción. Se debe trabajar con matrices líquidas y que se encuentren relativamente limpias o libres de interferencias que puedan dañar a la fibra ó al sistema cromatográfico <sup>36</sup>.

Existe una tercer forma de extracción, es MEFS protegida por membrana, en la cual se utiliza una membrana para proteger a la fibra de posibles interferencias. Es común cuando la muestra es muy sucia (contiene posibles interferencias) y los analitos son de baja volatilidad y no puede ser usada la extracción por “headspace” <sup>36</sup>. Una ventaja más de esta extracción es que la membrana puede añadir selectividad al proceso, la

desventaja es que la cinética de extracción se vuelve más lenta. La Figura 9 muestra el esquema de las 3 formas de extracción en MEFS.

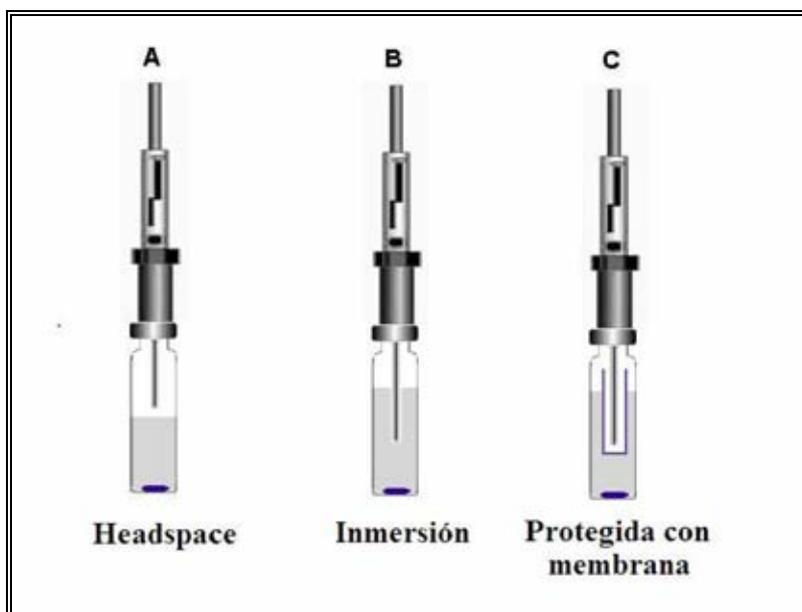


Figura 9. Esquema general de las tres formas de extracción por MEFS. A) Headspace, B) Inmersión y C) Extracción protegidas con membrana <sup>35</sup>.

La técnica de MEFS presenta varias ventajas y es muy sencilla de aplicar, la Figura 10 muestra los dos pasos generales: 1) extracción de compuestos volátiles de la matriz y 2) inyección de la fibra que contiene los analitos en un instrumento analítico (cromatógrafo de gases).

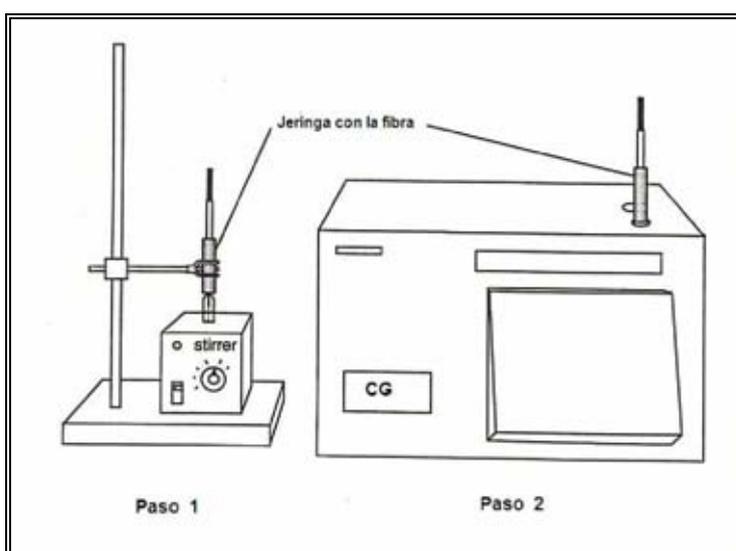


Figura 10. Procedimiento de análisis por MEFS-CG. Paso 1: equilibrio de los analitos entre la fibra y la muestra. Paso 2: la transferencia de la fibra para desorber los analitos en el cromatógrafo <sup>35</sup>.

## 2. 4. 2 Aplicaciones de MEFS en alimentos y bebidas

Las matrices de alimentos suelen ser muy diversas y heterogéneas, de manera que es complicado encontrar técnicas de extracción de compuestos volátiles sencillas, por ello la MEFS ha sido aplicada desde sus inicios en alimentos y bebidas como criterio de calidad, identificación de compuestos responsables de aroma, identificación de compuestos no deseados como contaminantes, entre otros propósitos. En vegetales y frutas se ha reportado el uso de la MEFS para determinar contaminantes de pesticidas, compuestos responsables de aroma, volátiles indicadores del grado de madurez y compuestos producto de la descomposición. En el análisis de jugos de frutas y otras bebidas se han desarrollado metodologías por MEFS para identificar volátiles en estas matrices. Se han identificado ésteres, alcoholes, aldehídos y compuestos azufrados como responsables del aroma en jugos de frutas, refrescos, té, y café <sup>37, 36</sup>. En bebidas alcohólicas como cerveza, vino, brandy, tequila y mezcal <sup>36-40</sup> también se han determinado una gran cantidad de compuestos responsables del aroma <sup>36</sup>. En productos lácteos se han identificado diversos compuestos relacionados con su composición y calidad del producto. En alimentos también ha sido muy utilizada la MEFS para la determinación de contaminantes en prácticamente cualquier tipo de alimento <sup>41</sup>.

## 2. 5 Cromatografía de gases acoplado a Espectrometría de masas (CG-EM)

La cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM) es la técnica analítica mas ampliamente usada para el análisis de mezclas complejas. El poder de esta metodología reside en la unión de dos poderosas técnicas en un solo sistema acoplado, en el cual, la cromatografía de gases (CG) se emplea para separar los componentes de una mezcla basada en sus diferentes afinidades por la fase estacionaria en la columna y la espectrometría de masas (EM) se emplea no solo para detectar y cuantificar los diferentes analitos que eluyen de la columna, sino que además provee información definitiva sobre su identidad.

La cromatografía de gases es un método de separación basado en el equilibrio de reparto y elución de la muestra entre dos fases: una estacionaria que consta de una película delgada de compuestos diversos de alto punto de ebullición que recubren las paredes del capilar; y una móvil que es un gas acarreador el cual es inerte a los analitos

(normalmente N<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> ó He)<sup>42</sup>. La separación de los analitos depende directamente de la afinidad de estos por la fase estacionaria, así los compuestos menos afines a la fase estacionaria serán empujados por el gas acarreador más rápidamente, saliendo de la columna primero. La cromatografía de gases está limitada a muestras volátiles y no es adecuada para muestras termolábiles, es decir, deben ser térmicamente estables, con peso molecular relativamente bajo o deben ser susceptibles de derivatizarse. La desventaja de la CG es que no permite por sí sola identificar los compuestos que presentan una señal en el cromatograma, se debe tener un estándar sobre todo en muestras complejas. Los tiempos de retención de los analitos están en función de los equilibrios de distribución que se presentan en la columna y que son característicos de cada compuesto. A pesar de ello, el tiempo de retención no es una prueba irrefutable para la identificación de un compuesto, ya que el tiempo de retención es característico pero no exclusivo para un compuesto. Para solucionar esto, se desarrolló el uso de una técnica llamada espectrometría de masas que acoplada a la cromatografía de gases (CG-EM) permite la identificación de los analitos separados. Usualmente se emplea espectrometría de masas para la confirmación de la identidad del pico cromatográfico<sup>43, 44</sup>.

En resumen un espectrómetro de masas consiste básicamente en un generador de iones, un analizador o separador másico, un detector y un registrador que permita tener permanentemente las señales generadas. Las moléculas gaseosas obtenidas del cromatógrafo se ionizan por diversas técnicas, una de ellas es el impacto de electrones donde las moléculas son ionizadas por el choque de las mismas con electrones liberados por un filamento, estos iones son acelerados por un campo eléctrico y se enfocan mediante campos eléctricos. Los iones acelerados pasan a alguno de los diversos tipos de analizadores de masas. En la mayoría de los analizadores de masas, los fragmentos son separados selectivamente debido a su relación masa/carga y chocan con un detector en distintos momentos. El choque de los iones con el detector produce una señal amplificada por el transductor, con lo que se obtiene un espectro de masas. Estos resultados permiten elucidar la estructura de los analitos presentes<sup>45</sup>. Esta técnica es muy sensible, ya que alcanza límites de detección del orden de picogramos, por lo que puede ser altamente selectiva. El análisis por EM se puede escoger entre varios modos de ionización y en dos modos de análisis del espectro: Con barrido total de iones (SCAN por sus siglas en inglés) y por monitoreo selectivo de iones (SIM, por sus siglas

en inglés) <sup>46</sup>. La selectividad en el análisis por CG-EM es sobresaliente ya que provee evidencia concluyente de la presencia de un compuesto debido a la combinación de información proporcionada por el cromatógrafo de gases y la información estructural proveniente del espectrómetro de masas <sup>3,47</sup>.

## **2.6 Análisis estadístico multivariado**

### **2. 6. 1. Análisis de componentes principales (ACP)**

El Análisis de Componentes Principales (ACP) es una técnica estadística de síntesis de la información, o reducción de la dimensión (número de variables) del estudio, es decir, ante una gran cantidad de datos con muchas variables, el objetivo debe ser reducirlos a un menor número pero tratando de perder la menor cantidad de información posible. La reducción de las variables es lo que da como resultado a los nuevos componentes principales o factores, los cuales son una combinación lineal de las variables originales siendo además independientes entre sí. El primer componente principal trata de explicar la máxima variación posible en los datos en una dirección, el segundo componente explica la variación una vez eliminada la explicada por el primer componente y así sucesivamente<sup>48</sup>. Se pueden construir tantos componentes principales como dimensiones tiene el espacio definido por las variables manifiestas, por ello a partir de una matriz con  $m$  variables, se pueden construir  $m$  componentes <sup>49</sup>.

En términos matemáticos, las componentes principales son los autovectores o vectores propios de la matriz de correlación y la técnica para encontrar estos autovectores se llama análisis propio. A cada componente principal (es decir, autovector) le corresponde un autovalor que proporciona la cantidad de varianza en el conjunto de datos que se encuentra explicada por esa componente principal <sup>49</sup>. Como se mencionó anteriormente, cada nuevo vector (componente) construido explica la mayor varianza, por lo que cada nuevo componente incorporado incrementa la varianza explicada acumulada y reduce la varianza residual; cuando este modelo contiene  $m$  vectores (componentes), la varianza acumulada es del 100% y la residual es entonces de cero. La tabla que presenta estos resultados se denomina tabla de residual.

El objetivo principal del ACP es la representación gráfica de las medidas numéricas de varias variables en un espacio de 2 o 3 dimensiones donde nuestros sentidos puedan

percibir la relación que guardan las muestras y que a simple vista son imposibles de observar. Al trazar el diagrama de componentes se representa la mayor o menor semejanza en la distribución de los terpenos, formando así, grupos a lo largo de los componentes trazados.

#### 2. 6. 2. Análisis de conglomerados

El análisis de conglomerados (análisis de “*cluster*”) es un método para dividir un grupo de objetos en una serie de clases de manera que los objetos similares se encuentren en la misma clase. El análisis de conglomerados busca objetos que se encuentren próximos en el espacio de las variables. Para la búsqueda de conglomerados se inicia considerando que cada objeto conforma un conglomerado de tamaño uno y compara la distancia entre estos, los dos puntos que se encuentren más próximos se unen para formar uno nuevo. Las distancias entre los conglomerados se comparan de nuevo y se combinan los dos conglomerados que se encuentren más próximos. Este procedimiento se repite indefinidamente hasta agrupar todos los puntos <sup>48</sup>. El método más simple y utilizado para calcular la distancia entre los puntos es conocido como método del “vecino mas próximo” (“nearest neighbor”), el cual calcula el promedio de las distancias entre pares de observaciones de dos conglomerados (cálculo de la distancia euclídea al cuadrado). La etapa en la que se detiene la formación de grupos que determina el número de conglomerados queda a juicio de la persona que realiza el análisis. El agrupamiento que utiliza este método es jerárquico, es decir que una vez que se ha asignado un conglomerado no se puede invertir este proceso. Las repetidas etapas de agrupación se pueden mostrar en un dendrograma.

### **2.7 Estudios previos en la determinación de terpenos y lípidos en agave, tequila y mezcal.**

Anteriormente se han realizado otros trabajos de determinación de terpenos en *A. tequilana weber* var azul <sup>30</sup>, *A. salmiana* y *A. angustifolia* <sup>50</sup>. En ellos se reportó el uso de destilación por arrastre de vapor acoplado a MEFS-CG-EM, encontrando perfiles de terpenos para los diferentes tipos de agave estudiados y en los cuales se optimizaron las condiciones del análisis cromatográficos, la desventaja principal de esta metodología fue la cantidad de muestra utilizada, debido a que para cada extracción se requirió de

160g de agave. También para estos tres tipos de agave mencionados se determinó el perfil de ácidos grasos mediante el análisis de sus respectivos ésteres metílicos <sup>51</sup>.

Para el caso del tequila se ha reportado un trabajo previo de la determinación de terpenos en esta bebida, en éste se utilizó como técnica de extracción de muestra la MEFS y la extracción líquido-líquido (ELL) para su posterior análisis por CG-EM. En dicho trabajo se determinó el perfil de terpenos en 18 diferentes muestras de tequila <sup>38</sup> y en el que se incluye también una muestra de mezcal. Posteriormente se realizó un trabajo acerca del contenido de los principales compuestos orgánicos del mezcal, dentro de este trabajo se incluyó la identificación y cuantificación de algunos terpenos en esta bebida <sup>3</sup>.

El análisis de compuestos volátiles por cromatografía de gases ha sido utilizado incluso en la taxonomía de plantas, ya que mediante el análisis de estos compuestos se han explorado las relaciones filogenéticas y los niveles de diferenciación entre especies de plantas <sup>52</sup>. En este caso fue de gran ayuda para la delimitación correcta de algunas poblaciones del género *Abies*, a pesar de que en este estudio no se realizó la identificación de los compuestos químicos y solo se utilizó la identificación de los picos cromatográficos. Por lo anterior es posible pensar que al realizar la identificación de los diferentes compuestos, los resultados de este trabajo se puedan ampliar y aplicar en la taxonomía de otras plantas.

Anteriormente también se realizó la determinación de lípidos simples en agave mezcalero por cromatografía de gases <sup>53</sup>, en este trabajo se reportaron las concentraciones de ácidos grasos y lípidos simples en agave y el correspondiente perfil de ácidos grasos para cada tipo de agave. Es importante continuar con la caracterización química del agave mezcalero por su importancia cultural y económica en nuestro país. El estudio del contenido de otros compuestos químicos como los terpenos en el agave mezcalero es parte importante de un extenso trabajo para la caracterización química del agave mezcalero.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo General

- Identificar y cuantificar los terpenos presentes en diferentes especies de agave mezcalero utilizando microextracción en fase sólida y cromatografía de gases-espectrometría de masas, para contribuir a la caracterización química de estas plantas.

#### 3.2 Objetivos particulares

- Desarrollar y optimizar un procedimiento para la identificación y cuantificación de terpenos en agave mezcalero por Microextracción en Fase Sólida acoplada a Cromatografía de Gases – Espectrometría de Masas (MEFS-CG-EM).
- Aplicar la técnica desarrollada para identificar y cuantificar terpenos presentes en 6 especies de agave mezcalero: 1) *A. salmiana* var. *salmiana*, 2) *A. duranguensis*, 3) *A. karwinskii*, 4) *A. cupreata*, 5) *A. salmiana* ssp. *crassispina* y 6) *A. angustifolia*.
- Determinar el perfil de terpenos en agave mediante la técnica desarrollada por MEFS-CG-EM.
- Analizar los resultados obtenidos y relacionar semejanzas en la composición de terpenos de los diferentes agaves mezcaleros estudiados mediante análisis estadístico multivariado.

## 4. PARTE EXPERIMENTAL

### 4.1 Materiales y Equipo

- Procesador de alimentos Moulinex
- Agitador Vortex Thermoline
- Estufa de secado J.M. Ortíz
- Balanza analítica Startorius Modelo CP124S
- Jeringas Hamilton de vidrio de 10, 50 y 250  $\mu\text{L}$
- Agitador magnético de 5mm x 3mm
- Material de vidrio común de laboratorio
- Viales de 7 mL con tapón horadado de polipropileno con septa de teflón
- Parrilla con agitador magnético PMC modelo 720 Series
- Fibras para MEFS: Polidimetilsiloxano-Divinilbenceno (PDMS-DVB 65 $\mu\text{m}$ ), Carbowax-Divinilbenceno (CW-DVB 65 $\mu\text{m}$ ), Carboxen-polidimetilsiloxano (CAR-PDMS 75  $\mu\text{m}$ ) y Poliacrilato (PA 85 $\mu\text{m}$ ). Todas las fibras adquiridas de Supelco Bellefonte P.A., USA
- Soporte de la fibra para inyección manual (Supelco Bellefonte P.A., USA)

### 4.2 Acondicionamiento de las fibras para MEFS

Las fibras fueron acondicionadas de acuerdo a las especificaciones del proveedor, como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Condiciones para el acondicionamiento de las fibras

Fibra	Espesor de la película	Temperatura de acondicionamiento ( $^{\circ}\text{C}$ )	Tiempo de acondicionamiento (hr)
PDMS-DVB	65 $\mu\text{m}$	250	0.5
CW-DVB	65 $\mu\text{m}$	220	2
CAR-PDMS	75 $\mu\text{m}$	300	1-2
PA	85 $\mu\text{m}$	300	2

### **4. 3 Estándares**

Estándares: linalol (Fluka Chemika, Sigma-Aldrich Suiza, pureza 95%), terpinen-4-ol (Fluka Chemika, Sigma-Aldrich Suiza, pureza 99%),  $\alpha$ -terpineol (Aldrich, pureza 97%), nerol (Fluka Chemika, Sigma-Aldrich Suiza , pureza 96%), geraniol (Fluka Chemika, Sigma-Aldrich Suiza, pureza 99%) y eugenol (Fluka Chemika, Sigma-Aldrich Suiza, pureza 90%).

Las soluciones estándar se prepararon pesando entre 10 y 20 mg de cada estándar por separado, se aforaron con etanol en matraces de 10 mL, obteniendo soluciones concentradas de estándares de terpenos entre 1000 y 2000 ppm. Se sellaron y almacenaron en refrigeración para su uso posterior.

### **4. 4 Reactivos**

Alcohol etílico anhidro (J. T. Baker, 99% de pureza), cloroformo (J. T. Baker, 99.9% de Pureza), Acetona (Reproquifin 99% de pureza). Agua desionizada.

### **4. 5 Muestras**

Se analizaron 6 variedades de agave, de diferentes lugares de la república mexicana incluidos en el territorio de la declaración de protección a la denominación de origen del mezcal. La Tabla 5 Muestra el origen y edad de las muestras analizadas. Las piñas en todos los casos con aproximadamente un año de castración, listas para su horneado, a excepción de *Agave salmiana* var. *salmiana* y *Agave angustifolia*, que fueron recolectadas directamente del campo y colocadas en condiciones de congelamiento hasta su uso.

Tabla 5. Muestras de agave analizadas.

Agave	Origen (Municipio y Estado)	Ejido	Edad
<i>Agave salmiana</i> Otto ex salm-Dyck ssp. <i>crassispina</i> (Trel.)Gentry (Maguey cimarrón)	Charcas, San Luis Potosí	Miguel Hidalgo	8 años
<i>Agave angustifolia</i> Haw. (Maguey espadín)	Santiago Matatlán, Oaxaca	Espina dorada	7 años
<i>Agave cupreata</i> Trel & A. Berger ( Maguey ancho, bravo o de mezcal)	Chilapa de Álvarez, Guerrero	Miraflor	8 años
<i>Agave karwinskii</i> Zucc. (Maguey cirial o tobasiche)	Santa Catarina, Oaxaca	Santa Catarina	8 años
	San Baltazar Chichicapam, Oaxaca	San Baltazar	7 años
<i>Agave salmiana</i> var. <i>salmiana</i> Otto ex salm-Dick (Maguey verde o mezcalero)	San Felipe, Guanajuato	El Carretón	8 años
<i>Agave duranguensis</i> Gentry (Maguey cenizo)	Nombre de Dios, Durango	La Constanca	8 años

#### 4. 6 Preparación de la muestra.

Las cabezas de agave fueron descongeladas y cortadas en pequeños trozos tomando de diferentes zonas de la cabeza del agave, se juntaron y mezclaron.

Para la obtención del jugo de agave se cortaron en trozos aproximadamente 30 g de agave, los cuales se estrujaron con un exprimidor de limones. Del jugo obtenido se tomaron 3 mL para cada análisis.

#### 4. 7 Determinación de humedad

Para la determinación de humedad se colocaron aproximadamente 10 g de agave molido y homogenizado en un pesafiltro. Se colocaron en la estufa de vacío a 50 °C a secar completamente (hasta peso constante) lo cual ocurrió a las 45 horas, se peso la muestra seca y por diferencia se calculó la humedad de cada tipo de agave. Este procedimiento se realizó por triplicado para cada muestra de agave.

#### **4. 8 Análisis cromatográfico**

Se utilizó un cromatógrafo de gases (6890 Agilent Technologies) acoplado a un Detector selectivo de Masas (5973 Agilent Technologies) con inyector splits/splitless y columna capilar de sílice fundida ZB-5 (5% difenil 95% Polidimetilsiloxano) de 30 m de longitud x 250 µm de diámetro interno x 0.25 µm de grosor de película (Zebron Phenomenex, USA). Se utilizó He como gas acarreador a flujo constante de 1 mL/min. Temperatura del inyector: 250 °C, en modo “splitless” (1 min). Programa de temperatura: Temperatura inicial 40 °C isotérmicamente durante 1 min, rampa de 5 °C/min, hasta 210 °C y rampa de 10 °C/min, hasta 280 °C, durante 5 min. La temperatura de la línea de transferencia fue de 280 °C, la temperatura de la fuente de ionización fue de 230°C y la temperatura del analizador (cuadrupolar) fue de 150 °C. Los análisis se realizaron por impacto electrónico a 70 eV, se utilizó el modo de barrido total del espectro (SCAN) de 50 a 550 m/z. Las condiciones mencionadas fueron tomadas de trabajos anteriormente reportados para el análisis de terpenos en tequila<sup>3</sup> y agave para tequila<sup>30, 50</sup> por CG-EM.

#### **4. 9 Identificación de terpenos**

Para la identificación de los terpenos en las muestras de agave, se compararon los tiempos de retención y los espectros de masas obtenidos de las muestras con los obtenidos de los estándares y de los espectros de masas de la base de datos de la biblioteca de espectros de masas del NIST (The NIST Mass Spectral Search Programa for the NIST/EPA/NIH Mass Spectra Library versión 2.0 build 19 Nov. 2000).

#### **4. 10 Cuantificación de terpenos**

La cuantificación se realizó con base en el área del pico cromatográfico de cada compuesto, utilizando curvas de calibración absolutas (estandarización externa). Para elaborar cada curva de calibración se utilizó un vial con 3mL de agua desionizada con los 6 estándares de terpenos a cuantificar en las concentraciones señaladas para cada punto de la curva, se realizó el mismo proceso de extracción de terpenos obtenido en la optimización del método y se obtuvo la ecuación de la recta.

## **4. 11 Microextracción en fase sólida**

### **4. 11. 1 Selección de parámetros de la MEFS**

Para optimizar la adsorción de los analitos en la fibra y las condiciones de extracción, fue necesario considerar diversos factores que influyen en la eficiencia de la extracción como son: el tipo de fibra, la temperatura de extracción, tiempo de extracción, fuerza iónica y agitación de la muestra.

#### **4. 11. 1. 1 Selección de la preparación de muestra**

Para determinar el uso de agave molido (muestra sólida) o jugo de agave (muestra líquida) se realizó un análisis comparativo con ambas muestras, la preparación de la muestra molida se realizó cortando en trozos aproximadamente 30 g de agave, los cuales se molieron en procesador de alimentos (picadora eléctrica). Para el caso de la muestra líquida la muestra se preparó como se detalla en el inciso 4.6 preparación de muestra. En un vial de 7 mL con tapón horadado de polipropileno con septum de teflón se colocó 1 g de agave molido y se realizó la extracción con fibra PDMS-DVB a 60 °C durante 30 minutos, posteriormente se realizó el procedimiento con la muestra líquida, en este caso se adicionó 1 mL de jugo de agave en un vial con tapón horadado y septum de teflón, se realizó la extracción con la fibra PDMS-DVB a 60 °C durante 30 min.

#### **4. 11. 1. 2 Selección de la cantidad de muestra**

De acuerdo a los resultados del inciso anterior se seleccionó trabajar con la muestra líquida. Para determinar la cantidad de muestra a utilizar se realizaron extracciones con 1, 2 y 3 mL de jugo de agave, las extracciones se realizaron con la fibra PDMS-DVB a 60 °C durante 30 min.

#### **4. 11. 1. 3 Selección del tipo de fibra**

De acuerdo con los resultados del inciso anterior se seleccionó trabajar con un volumen de 3 mL de jugo de agave. En el presente trabajo se evaluaron 4 diferentes fibras para determinar cual era la más eficiente en la extracción de terpenos. Se realizaron

extracciones con las fibras: PDMS-DVB, CW-DVB, CAR-PDMS y PA. En todos los casos las extracciones se realizaron a 60 °C durante 30 min.

#### **4. 11. 1. 4 Temperatura de extracción**

De acuerdo a los resultados del inciso anterior se eligió la fibra PDMS-DVB para realizar el estudio de la temperatura de extracción. Se realizaron extracciones a: temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C), 60 y 80 °C. En todos los casos las extracciones se realizaron con tiempo de extracción de 30 min.

#### **4. 11. 1. 5 Perfil de tiempo de extracción**

Se seleccionó seguir trabajando a 60 °C de acuerdo a los resultados del inciso anterior. Para determinar el perfil de tiempo extracción se realizaron extracciones a: 20, 30, 40, 50 y 60 minutos con las condiciones obtenidas.

#### **4. 11. 1. 6 Efecto de la fuerza iónica**

Para determinar el efecto de la fuerza iónica mediante la adición de NaCl al jugo de agave, se realizaron extracciones con: 1.0, 1.2 y 1.4 g de NaCl. En este caso el tiempo de extracción fue de 60 minutos debido a los resultados obtenidos en el perfil de tiempo de extracción.

#### **4. 11. 1. 7 Efecto de la agitación**

Para determinar el efecto de la agitación de la muestra, se realizaron extracciones sin agitación y con agitación constante a 1200 rpm.

### **4. 12 Análisis de terpenos por MEFS-CG-EM**

Después de la optimización de los parámetros para la MEFS se llegó a las siguientes condiciones y el procedimiento fue el siguiente: Se colocó una alícuota de 3.0 mL de jugo de agave en un vial de 7 mL con tapón horadado de polipropileno con septum de teflón, se adicionó 1.0 g de NaCl y un agitador magnético (5mm x 3mm), se colocó en

una parrilla manteniendo la muestra a 60 °C mediante baño María y agitación constante de 1200 rpm. La muestra se mantuvo en estas condiciones durante 5 minutos (tiempo de equilibrio entre la muestra y su espacio de cabeza) después de transcurrido este tiempo se insertó la fibra dentro del vial manteniéndola expuesta en el espacio de cabeza durante 60 minutos. Una vez transcurrido este tiempo se retrajo la fibra en el dispositivo, se retiró la fibra del vial y se colocó inmediatamente en el inyector del CG-EM durante 10 minutos para la desorción de los analitos.

## **5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **5. 1 Determinación de humedad**

Los resultados en la determinación de humedad de los agaves muestran la diferencia que puede existir entre las diversas especies de agave, para el presente trabajo la cantidad de agua en la muestra nos dio una referencia de la cantidad de jugo que se puede obtener para de cada una de las especies de agave, en general la humedad de los agaves se determinó entre 60.46 y 85.25%, mientras que el rendimiento en la obtención del jugo de agave resultó entre 40 y 60%.

### **5. 2 Selección de parámetros para MEFS-CG-EM**

Para la optimización de las condiciones de Microextracción se estudiaron las siguientes variables: Preparación de la muestra, tipo de fibra, temperatura de extracción, tiempo de extracción, fuerza iónica (adición de NaCl) y agitación. Algunas condiciones que se utilizaron inicialmente para la optimización fueron tomadas de trabajos similares anteriormente reportados <sup>27, 29</sup>. En todos los análisis realizados para la optimización de la metodología de extracción de terpenos se utilizó *Agave salmiana* var *salmiana*.

#### **5. 2. 1 Selección de la preparación de muestra**

Existen terpenos que presentan alta solubilidad en agua y algunos de los reportados para el *Agave tequilana weber* <sup>30</sup>, en mezcal <sup>2</sup> y tequila <sup>3</sup> son solubles en agua y etanol. La solubilidad de algunos de los terpenos identificados varía entre 2.5mg/L para terpenos no oxigenados como  $\alpha$ -pineno y hasta 2450 mg/L para algunos como eugenol que contienen sustituyentes hidroxilados. Debido a que estos compuestos son solubles en agua se decidió realizar la extracción con la muestra molida y con el jugo de agave, el cual debe de contener la mayor parte de los terpenos solubles en agua del agave.

La Figura 11 muestra la comparación de la extracción entre jugo de agave y agave molido, como se puede observar la extracción es mayor cuando se utiliza la muestra líquida, esta mayor eficiencia en la extracción de terpenos puede deberse en gran medida a que al hacer el jugo los terpenos solubles en fase acuosa quedan mas expuestos al ambiente que cuando se extrae de la muestra sólida. Lo anterior es debido a

que en la muestra sólida los terpenos pueden quedar dentro de la misma matriz, evitando que puedan exponerse al “headspace” de donde son extraídos por la fibra; mientras que cuando se obtiene el jugo de agave después de estrujar la muestra, los terpenos quedan en el jugo, logrando una mayor concentración de éstos en el “headspace” y por consecuencia una mayor eficiencia en la extracción.

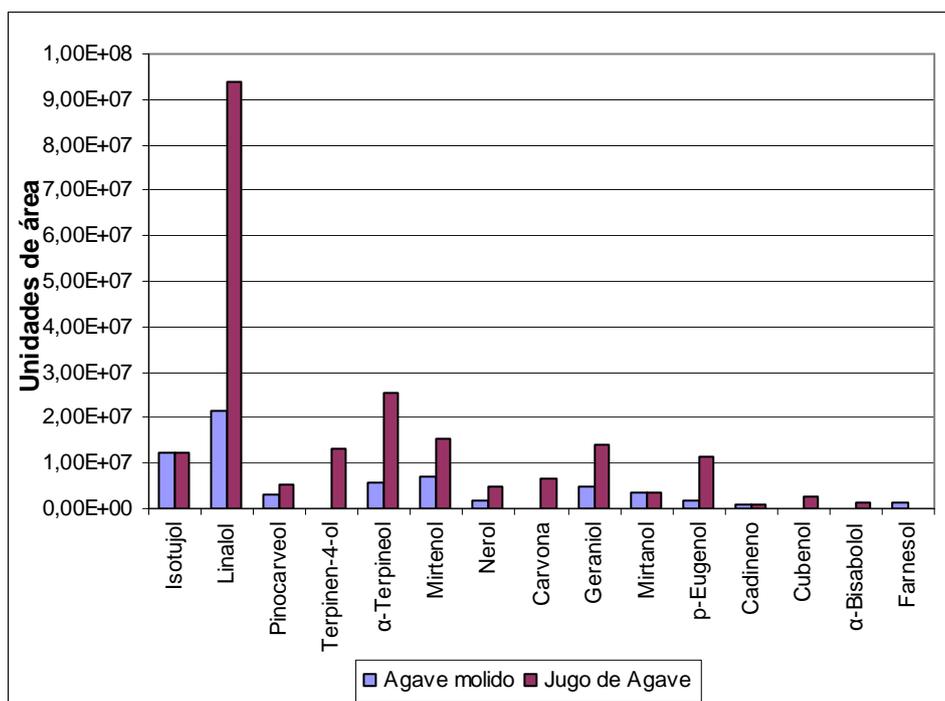


Figura 11. Efecto de la preparación de muestra en la extracción de terpenos de *Agave salmiana* var *salmiana* (n=3, CV<10%).

### 5. 2. 2 Selección de la cantidad de muestra

De acuerdo a los resultados en el inciso anterior se decidió utilizar jugo de agave para la extracción de terpenos. Para observar el efecto del volumen de muestra se realizaron extracciones con volúmenes de 1, 2 y 3 mL. Como se puede observar en la Figura 12, la mayor extracción se realizó cuando se utilizó un volumen de 3 mL. También se puede observar en la gráfica que la tendencia del incremento de respuesta es mayor de 1 a 2 mL que de 2 a 3 mL, de acuerdo a esta tendencia se esperaba que si se aumentaba a 4 mL la cantidad de muestra, la variación de la respuesta no sería considerable, además que al cambiar a este volumen de muestra (4mL) la dificultad para colocar la fibra dentro del vial era mayor; por ello se decidió no utilizar volúmenes mayores de 3 mL,

ya que éste se consideró adecuado para el tamaño del vial y el espacio requerido para la exposición de la fibra en el “headspace” de la muestra.

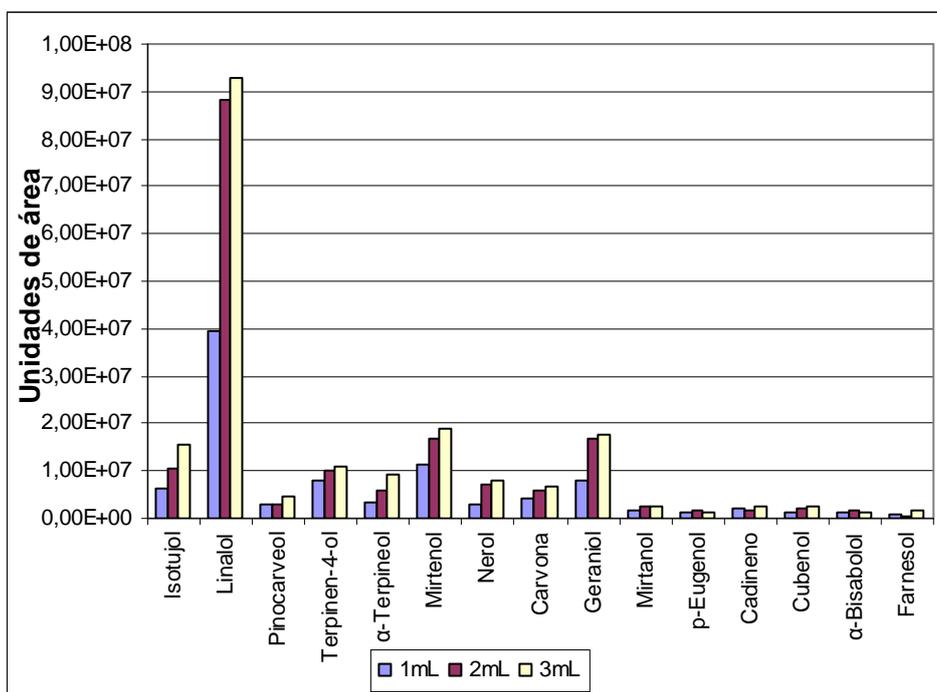


Figura 12. Efecto de la cantidad de muestra en la extracción de terpenos de *Agave salmiana* var *salmiana* (n=3, CV<10%).

Por los resultados obtenidos se decidió utilizar 3 mL de jugo de agave para las siguientes pruebas.

### 5. 2. 3 Selección del tipo de fibra

Para el análisis de terpenos en diferentes especies de agave y en tequila por MEFS se han reportado varias fibras en su extracción, como son la fibra PDMS-DVB, PA <sup>30, 38, 51</sup> CW-DVB <sup>54</sup> DVB-CAR-PDMS StableFlex <sup>37, 55, 56</sup>, por ello durante la optimización de la extracción de terpenos en agave se realizaron pruebas con fibras de diferentes características, las fibras que se utilizaron para la extracción de terpenos son las siguientes: PDMS-DVB, CW-DVB, CAR-PDMS y PA.

Al realizar la comparación de la extracción de terpenos con diferentes fibras, se esperaba que las fibras polares como PA y CW-DVB tuvieran una mejor extracción debido a que los terpenos que se extraen tienen características polares por el grupo hidroxilo, en especial la fibra de PA se ha reportado como una de las fibras preferidas en la extracción de compuestos fenólicos y alcoholes en diversos alimentos y bebidas

como jugos, frutas, vegetales y vinos <sup>36</sup>. La Figura 13 muestra la extracción de terpenos del jugo de *Agave salmiana* var. *salmiana*.

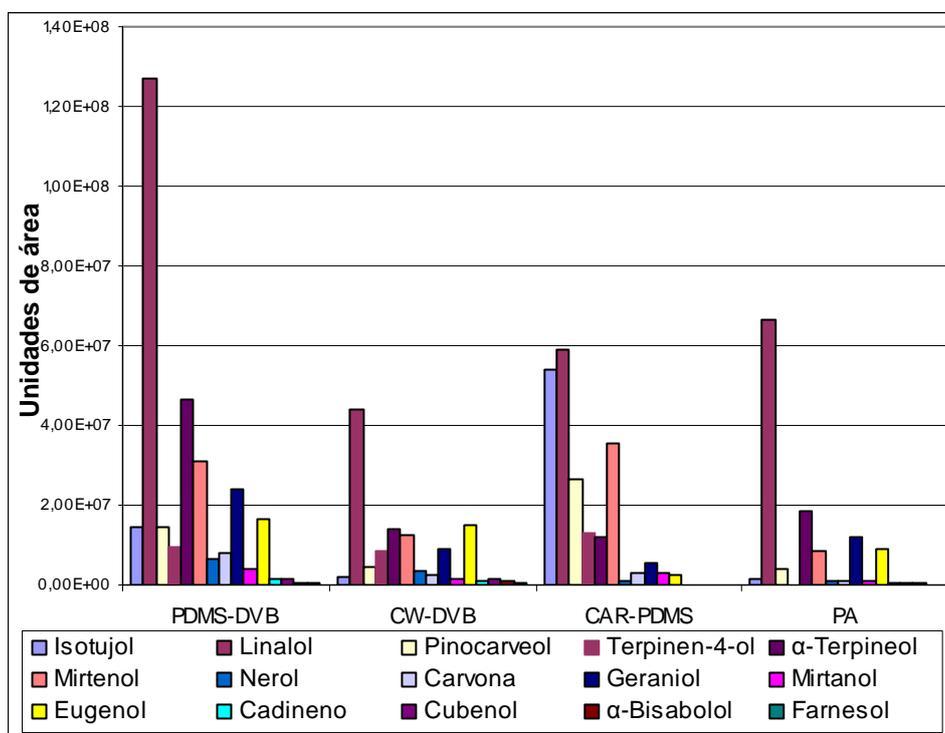


Figura 13. Efecto del tipo de fibra en la extracción de terpenos de *Agave salmiana* var. *salmiana* (n=3, CV<10%).

Al comparar la extracción con las diferentes fibras se puede notar que la fibra PDMS-DVB presentó una extracción más eficiente en general para todos los terpenos. La fibra PDMS-DVB, es recomendada generalmente para compuestos polares y de bajo peso molecular, ya que tienen mayor capacidad de retención y distribución de los analitos en la fibra, probablemente esta característica ayudó a que esta fibra fuera más eficiente en la extracción de terpenos que las otras fibras, incluida la fibra de PA. Cabe señalar que ya en trabajos anteriores se había reportado buena eficiencia en la extracción de monoterpenos y sesquiterpenos en diferentes especies de agave con la fibra PDMS-DVB <sup>51</sup>.

La fibra de PA presentó también buena extracción en la mayoría de los terpenos, aunque por su carácter polar se esperaba que tuviera la mejor extracción de los terpenos; esto no resultó ser así, ya que a pesar de presentar una buena extracción, ésta no fue más eficiente que la obtenida con la fibra PDMS-DVB.

La fibra de CAR-PDMS presentó una muy buena extracción en los terpenos más volátiles. Como podemos observar en la Figura 13 con esta fibra se obtuvieron muy buenos resultados en la extracción de dichos terpenos, incluso se observó la mayor extracción para el “isotujol” que con cualquier otra fibra, éste es el terpeno con mayor volatilidad entre los presentes en el *Agave salmiana* var *salmiana*, por otro lado para los terpenos que tienen menor volatilidad la extracción con esta fibra fue muy pobre e incluso para el caso de los sesquiterpenos la extracción resultó nula. La fibra de CAR-PDMS es recomendada para analitos de bajo peso molecular y con alta volatilidad, pero su uso es más común en moléculas de baja polaridad.

La fibra de CW-DVB presentó en la extracción de la mayoría de los terpenos una respuesta menor que la fibra de PDMS-DVB, pero a diferencia de la fibra de CAR-PDMS con esta si se obtuvo respuesta en todos los terpenos presentes en *Agave salmiana* var. *salmiana*. Esto es debido probablemente a que la fibra CW-DVB también tiene mayor retención sobre todo en analitos de bajo peso molecular y alta volatilidad, pero es recomendada para uso en moléculas de polaridad alta, a diferencia de la fibra CAR-PDMS que es utilizada para compuestos de menor polaridad.

Al analizar estos resultados se decidió utilizar la fibra PDMS-DVB para las siguientes extracciones, ya que con ésta se obtuvieron los mejores resultados.

#### **5. 2. 4 Temperatura de extracción**

En trabajos anteriormente reportados para el análisis de terpenos en diferentes especies de agave por MEFS, se reportó el uso de temperatura de extracción de 60 °C<sup>30,50</sup>, con la intención de observar el efecto de la temperatura de extracción en el presente estudio se realizaron extracciones a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C), 60 y 80 °C.

Como se observa en la Figura 14 la mejor temperatura de extracción fue a 60 °C. Se observó que a 80 °C la extracción es menor que a 60 °C, esto obedece a que a pesar de que a esta temperatura los compuestos volátiles están en mayor concentración en el “headspace” de la muestra en el vial, las altas temperaturas provocan la desorción de los analitos en la fibra. Mientras que a temperatura ambiente la volatilización de los analitos

es menor, lo que repercute en la baja concentración de los analitos en el “headspace” y por consecuencia en la extracción.

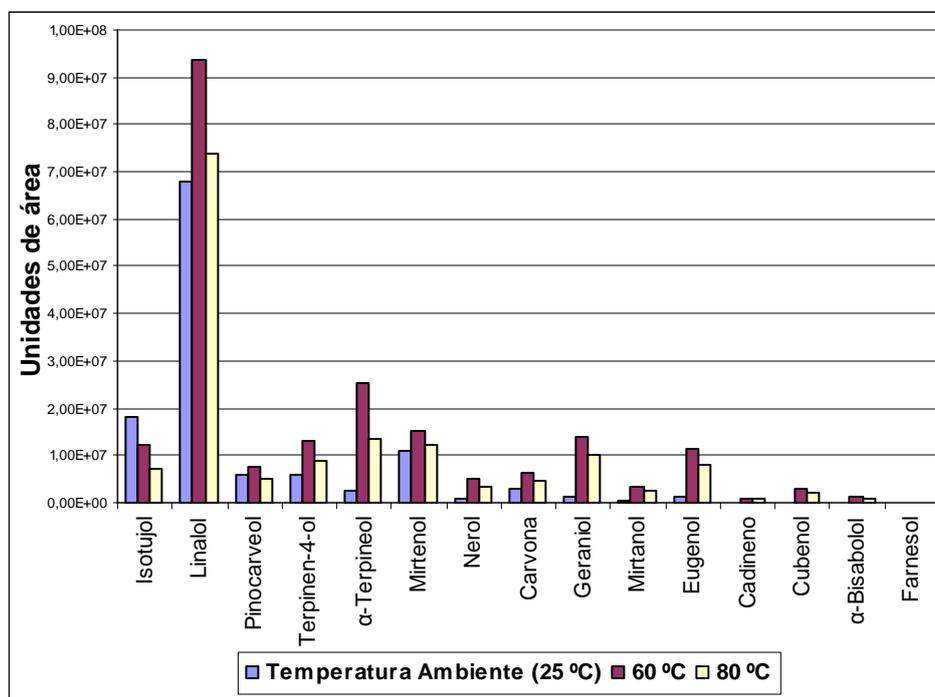


Figura 14. Efecto de la temperatura en la extracción de terpenos de *Agave salmiana* var. *salmiana* (n=3, CV<10%).

La Figura 14 también permite observar que el “isotujol” tiene la mayor extracción a temperatura ambiente, probablemente explicado por su alta volatilidad, ya que de los terpenos identificados en *Agave salmiana* var. *salmiana* este es el terpeno más volátil de los identificados. Por otro lado también se puede notar que el “pinocarveol” presentó una mejor extracción a temperatura ambiente que a 80 °C. También es visible que la extracción es más eficiente a 80 °C que a temperatura ambiente en la extracción de la mayoría de los terpenos.

Debido a los resultados obtenidos para los siguientes análisis se utilizó temperatura de 60 °C en las extracciones.

### 5. 2. 5 Perfil de tiempo de extracción

Como se puede observar en la Figura 15 que muestra el perfil de tiempo de extracción de terpenos, la mayor extracción se obtuvo a 60 minutos, aunque algunos alcanzan el equilibrio desde los 40 min de extracción. En el recuadro de la Figura 15 se observa con

mayor detalle el perfil de extracción de los terpenos identificados que se encuentran en menores concentraciones.

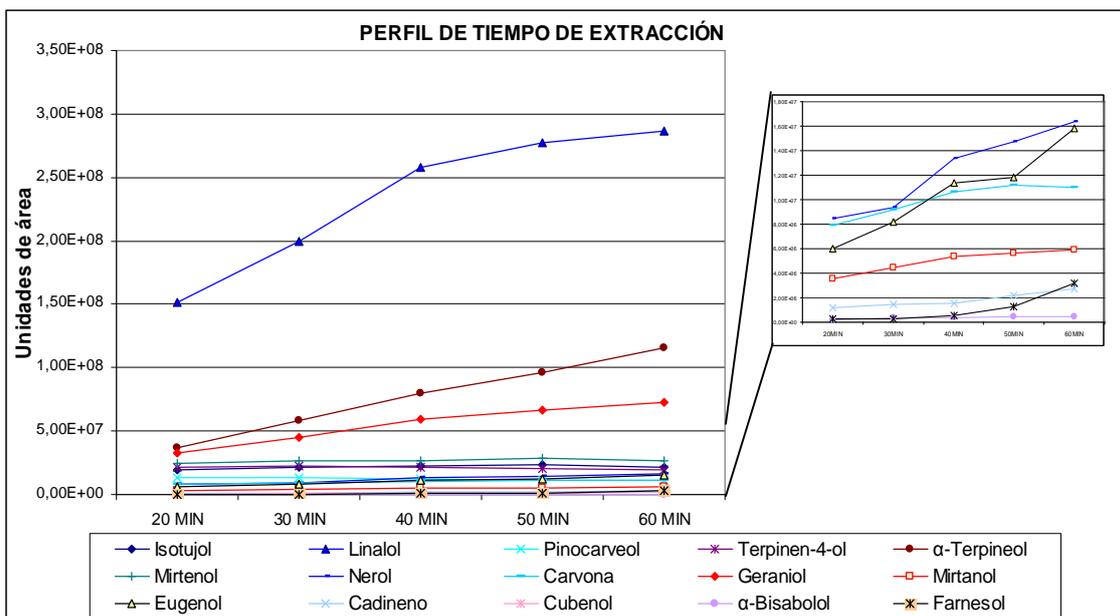


Figura 15. Perfil de tiempo de extracción de terpenos de *Agave salmiana* var *salmiana* (n=3, CV<10%).

En la gráfica anterior se puede observar también que algunos terpenos como el  $\alpha$ -terpineol, geraniol, eugenol y nerol no alcanzan el equilibrio aún cuando transcurrieron los 60 minutos de extracción, a pesar de ello no se utilizaron tiempos más largos debido a que el tiempo total del experimento se extendería demasiado.

De acuerdo a los resultados obtenidos en este punto se utilizó 60 min de tiempo de extracción para los siguientes análisis.

### 5. 2. 6 Efecto de la adición de NaCl

La adición de NaCl aumenta la fuerza iónica y por lo tanto favorece la volatilización de algunos compuestos, para estudiar el efecto de la adición de sal en la extracción de terpenos se adicionó 1.0 g de NaCl a la muestra y como se puede ver en la Figura 16, la extracción de terpenos mejoró ligeramente.

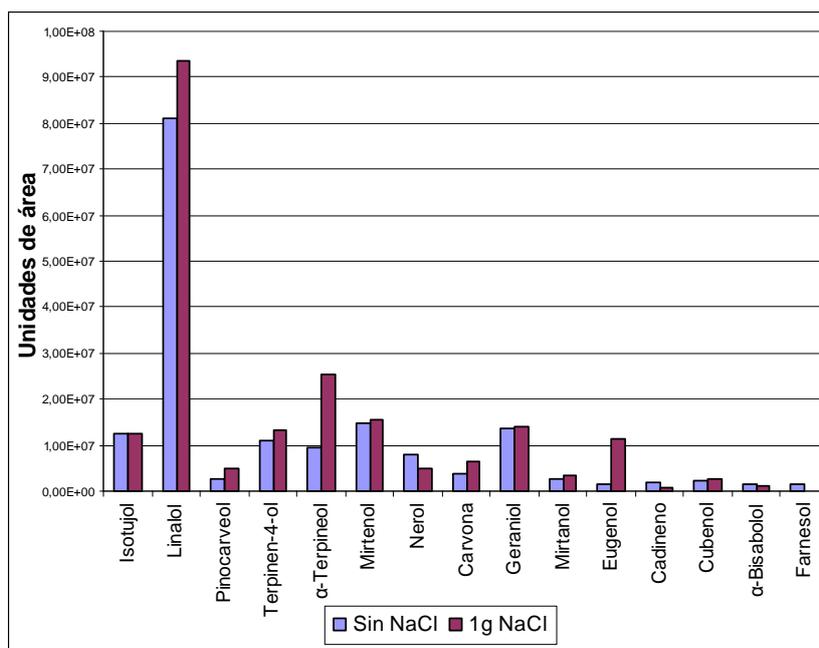


Figura 16. Efecto de la adición de sal en la extracción de terpenos de *Agave salmiana* var *salmiana* (n=3, CV<10%).

Cuando se comparó el efecto de la cantidad de sal adicionando 1.0, 1.2 y 1.4 g de NaCl se observó que no existe una diferencia significativa en la extracción con dichas cantidades de sal empleada, ya que el coeficiente de variación de los análisis con las diferentes cantidades de NaCl agregada no fue mayor de 8.76% en los terpenos identificados, por lo que se decidió utilizar para los siguientes análisis 1.0 g de NaCl.

### 5. 2. 7 Efecto de la agitación

Al estudiar la agitación de la muestra se observó que con 1200 rpm se obtiene una mejor extracción que sin agitación, esto se debe a que al estar en movimiento la matriz, los analitos pueden ser liberados más fácilmente y la transferencia de masa es mayor que cuando éstos permanecen estáticos. El uso de 3 mL de jugo de agave favoreció en gran medida que la agitación fuera homogénea, ya que con volúmenes menores la agitación se vuelve muy brusca, impidiendo el movimiento homogéneo de la muestra.

### 5. 3 Identificación de terpenos

Una vez establecida la metodología se analizaron 6 tipos de agave en los cuales se identificaron un total de 26 terpenos.

El cromatograma iónico total que resultó del análisis por CG-EM para cada uno de los agaves en estudio obtenidos con la metodología descrita se muestra en las Figuras 17 a 22. Identificación de los compuestos en la Tabla 7.

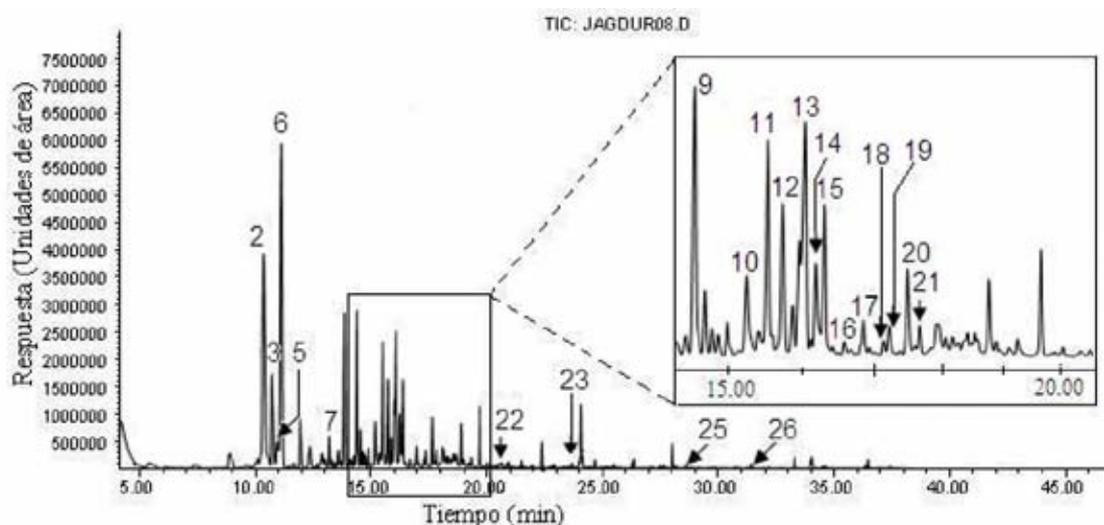


Figura 17. Cromatograma iónico total del análisis de *A. duranguensis* por MEFS-CG-EM. 1. Isotujol, 2.  $\alpha$ -Felandreno, 3.  $\alpha$ -Terpineno, 4. *p*-Cimeno, 5. *m*-Cimeno, 6.  $\beta$ -Felandreno, 7. Linalol, 8. Pinocarveol, 9. Verbenol, 10. Mentol, 11. Terpinen-4-ol, 12.  $\alpha$ -Terpineol, 13. Mirtenol, 14. Borneol, 15. Piperitol, 16. Nerol, 17. Isogeraniol, 18. Citral, 19. Carvona, 20. Geraniol, 21. Mirtanol, 22. Eugenol, 23. Cadineno, 24. Cubenol, 25.  $\alpha$ -Bisabolol, 26. Farnesol. Condiciones cromatográficas descritas en inciso 4.8.

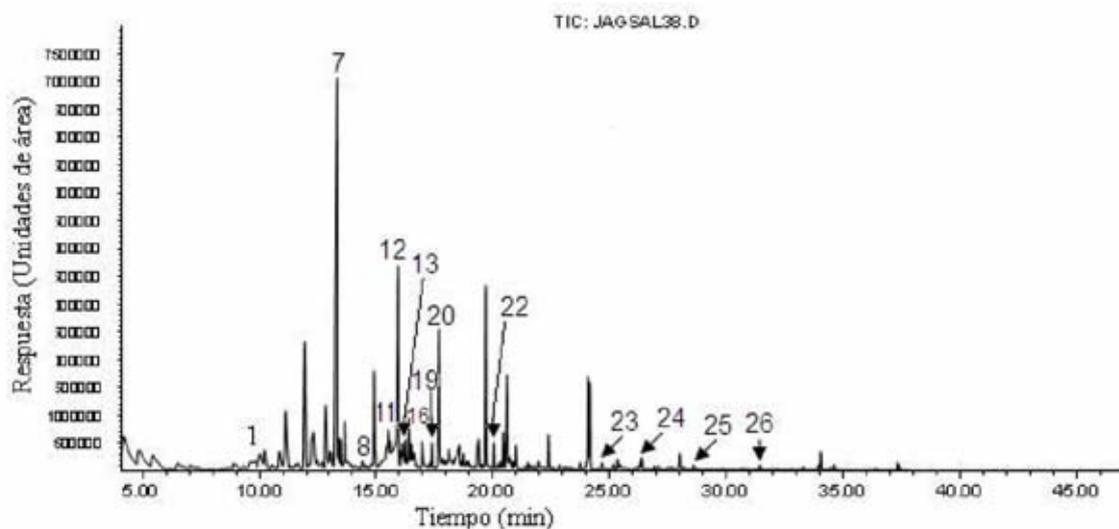


Figura 18. Cromatograma iónico total del análisis de *A. salmiana* var. *salmiana* por MEFS-CG-EM. Identificación de los compuestos en la Figura 17.

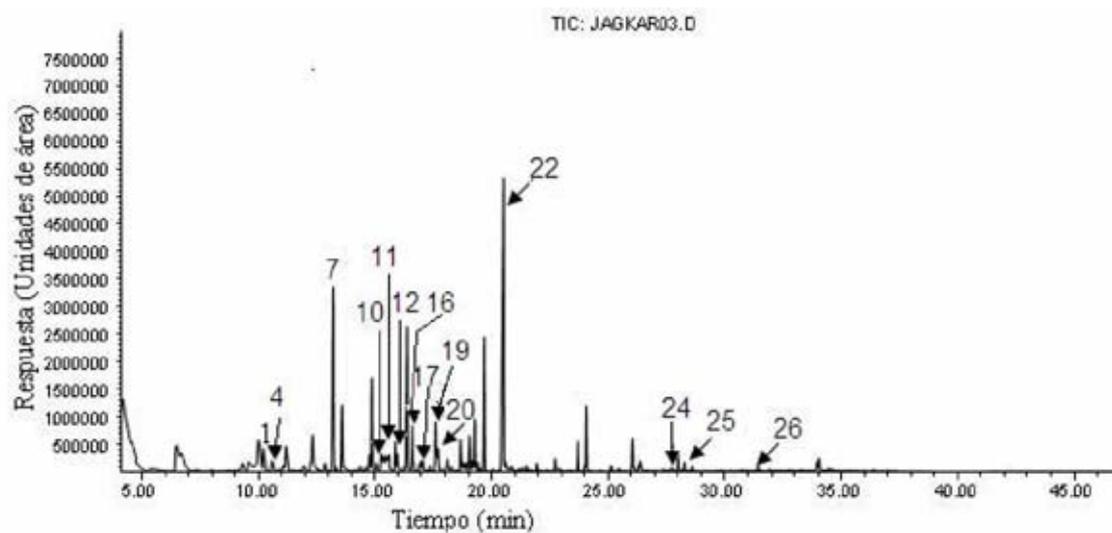


Figura 19. Cromatograma iónico total del análisis de *A. karwinskii* por MEFS-CG-EM. Identificación de los compuestos en la Figura 17.

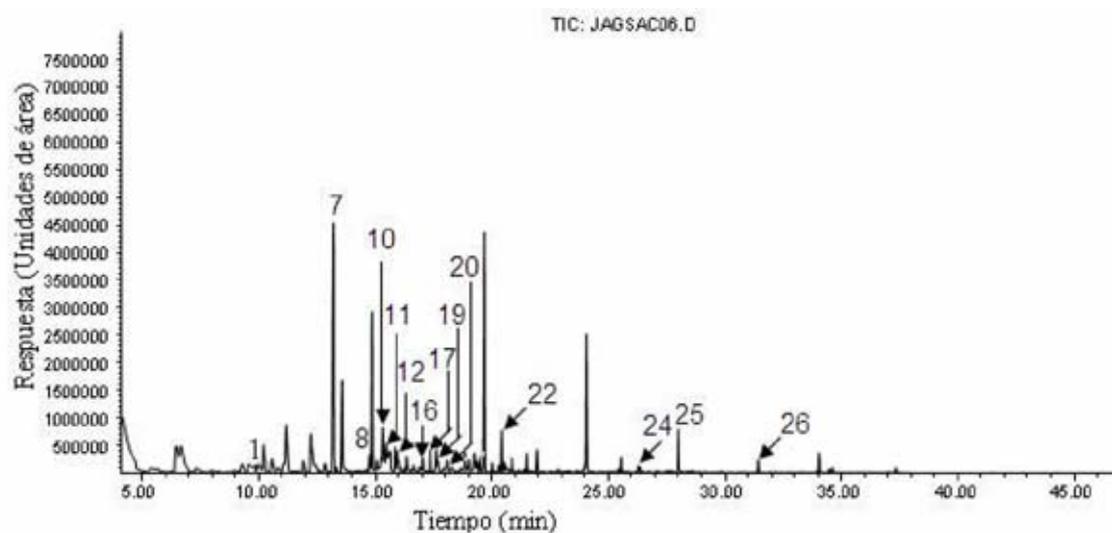


Figura 20. Cromatograma iónico total del análisis de *A. salmiana* spp. *crassispina* por MEFS-CG-EM. Identificación de los compuestos en la Figura 17.

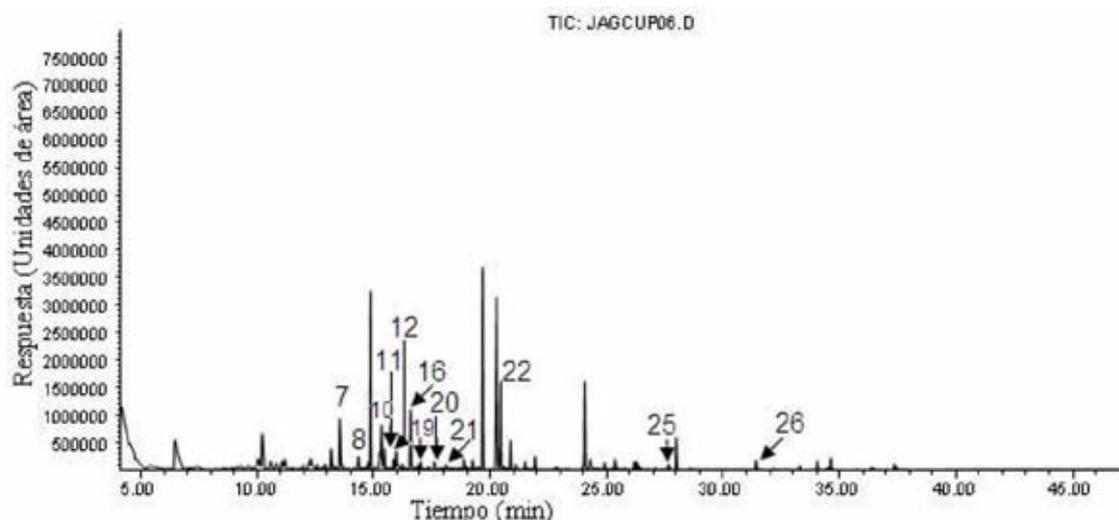


Figura 21. Cromatograma iónico total del análisis de *A. cupreata* por MEFS-CG-EM. Identificación de los compuestos en la Figura 17.

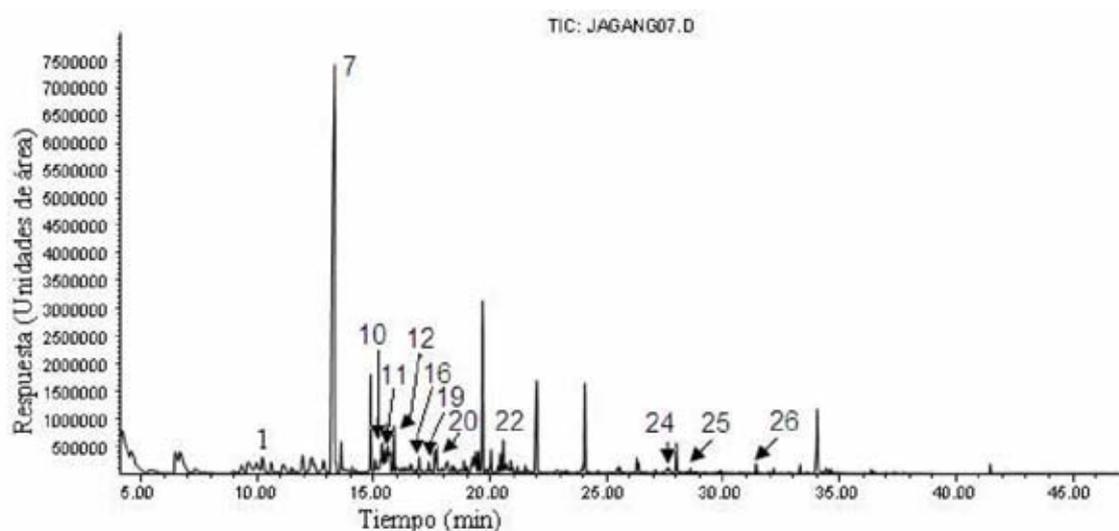


Figura 22. Cromatograma iónico total del análisis de *A. angustifolia* por MEFS-CG-EM. Identificación de los compuestos en la Figura 17.

Los terpenos identificados se muestran en la Tabla 6. La resolución obtenida para los terpenos en todos los cromatogramas fue suficiente para identificarlos y en su caso cuantificarlos. La identificación de los terpenos se realizó mediante la biblioteca del espectrómetro de masas y en algunos casos señalados en la tabla se compararon con tiempos de retención y espectros de masas obtenidos de estándares puros de los terpenos.

En la Tabla 6 se observa que el *A. duranguensis* contiene la mayor cantidad de terpenos, ya que en este agave se identificaron 22 de ellos, los otros 5 agaves contienen entre 12 y 14 terpenos identificados. *A. cupreata* y *A. angustifolia* fueron los agaves con la menor cantidad de terpenos identificados, ya que solo se identificaron 12 en cada uno de ellos, uno menos que los identificados en el *A. salmiana* var. *salmiana*. En contraste, en *A. karwinskii* y *A. salmiana* ssp. *crassispina* se identificaron 14 terpenos.

Tabla 6. Terpenos presentes en 6 diferentes tipos de agave mezcalero.

#	Tr	Terpeno	<i>A. salmiana</i> var. <i>salmiana</i>	<i>A.</i> <i>angustifolia</i>	<i>A.</i> <i>karwinskii</i>	<i>A. salmiana</i> ssp. <i>crassispina</i>	<i>A.</i> <i>cupreata</i>	<i>A.</i> <i>duranguensis</i>
1	10.002	Isotujol	•	•	•	•		
2	10.336	$\alpha$ -Felandreno						•
3	10.695	$\alpha$ -Terpineno *						•
4	10.916	<i>p</i> -Cimeno *			•			
5	10.934	<i>m</i> -Cimeno						•
6	11.102	$\beta$ -Felandreno						•
7	13.220	Linalol *	•	•	•	•	•	•
8	14.360	Pinocarveol	•			•	•	
9	14.527	Verbenol						•
10	15.349	Mentol		•	•	•	•	•
11	15.485	Terpinen-4-ol *	•	•	•	•	•	•
12	15.873	$\alpha$ -Terpineol *	•	•	•	•	•	•
13	16.043	Mirtenol	•					•
14	16.228	Borneol						•
15	16.366	Piperitol						•
16	16.914	Nerol *	•	•	•	•	•	•
17	17.050	Isogeraniol			•	•		•
18	17.285	Citral						•
19	17.368	Carvona	•	•	•	•	•	•
20	17.640	Geraniol *	•	•	•	•	•	•
21	17.821	Mirtanol					•	•
22	20.435	Eugenol *	•	•	•	•	•	•
23	24.676	Cadineno	•					•
24	27.757	Cubenol	•	•	•	•		
25	28.392	$\alpha$ -Bisabolol *	•	•	•	•	•	•
26	31.595	Farnesol *	•	•	•	•	•	•

Tr Tiempo de retención.

• Terpeno presente en el agave.

\* Se utilizó estándar puro para comprobar el tiempo de retención y espectro de masas del compuesto.

La Figura 23 muestra en forma gráfica los terpenos identificados en los 6 tipos de agave; en ella se puede observar el perfil de terpenos identificados en los agaves. Esta gráfica permite observar que los terpenos que se encontraron en mayor proporción fueron linalol, terpinen-4-ol,  $\alpha$ -terpineol, geraniol y eugenol. En particular el linalol fue el terpeno mayoritario en 4 de los agaves estudiados: *A. salmiana* var. *salmiana*, *A. salmiana* ssp. *crassispina*, *A. cupreata* y *A. angustifolia*. En *A. karwinskii* se encontró como el segundo mayoritario, solo después del eugenol. En el caso particular de *A.*

*duranguensis*, se identificaron los terpenos  $\alpha$ - felandreno,  $\beta$ -felandreno y  $\alpha$ -terpineno los cuales son visiblemente mayores en proporción que el linalol.

Se observa también que *A. salmiana* var. *salmiana* y *A. duranguensis* muestran la mayor concentración de terpenos en general, mientras que *A. cupreata* presenta la menor concentración de terpenos.

De los 26 terpenos identificados, 22 son monoterpenos y 4 sesquiterpenos (cadineno, cubenol,  $\alpha$ -bisabolol y farnesol). En la figura 23 también podemos observar que linalol, mentol, terpinen-4-ol,  $\alpha$ -terpineol, nerol, carvona, geraniol y eugenol son los mas abundantes en los agaves estudiados, mientras que *p*-cimeno, citral y mirtanol solo aparecen en *A. duranguensis* y en menor proporción. En esta gráfica podemos resaltar que  $\alpha$ -felandreno y  $\beta$ -felandreno se identificaron solo en *A. duranguensis* y como se puede ver, su concentración debe de ser alta, pues su respuesta en el cromatógrafo es superior a la de linalol, el cual, como anteriormente se mencionó es el más abundante en la mayoría de los agaves estudiados.

También debemos mencionar que los 4 sesquiterpenos identificados (cadineno, cubenol,  $\alpha$ -bisabolol y farnesol) a pesar de identificarlos en varios de los agaves analizados siempre se obtuvieron con muy pobre respuesta en el cromatógrafo de gases como se puede notar claramente en la Figura 24. Esto es probablemente debido a que por su mayor peso molecular y por su menor volatilidad con respecto a los monoterpenos la concentración en el “headspace” es menor y por lo tanto su extracción también es menor.

Del total de terpenos identificados solo 9 de ellos: linalol, terpinen-4-ol,  $\alpha$ -terpineol, nerol, carvona, geraniol, eugenol,  $\alpha$ -bisabolol y farnesol se identificaron en todos los agaves estudiados y es de resaltar que los 9 son terpenos oxigenados, 8 de ellos con grupo hidroxil y solo uno con grupo ceto.

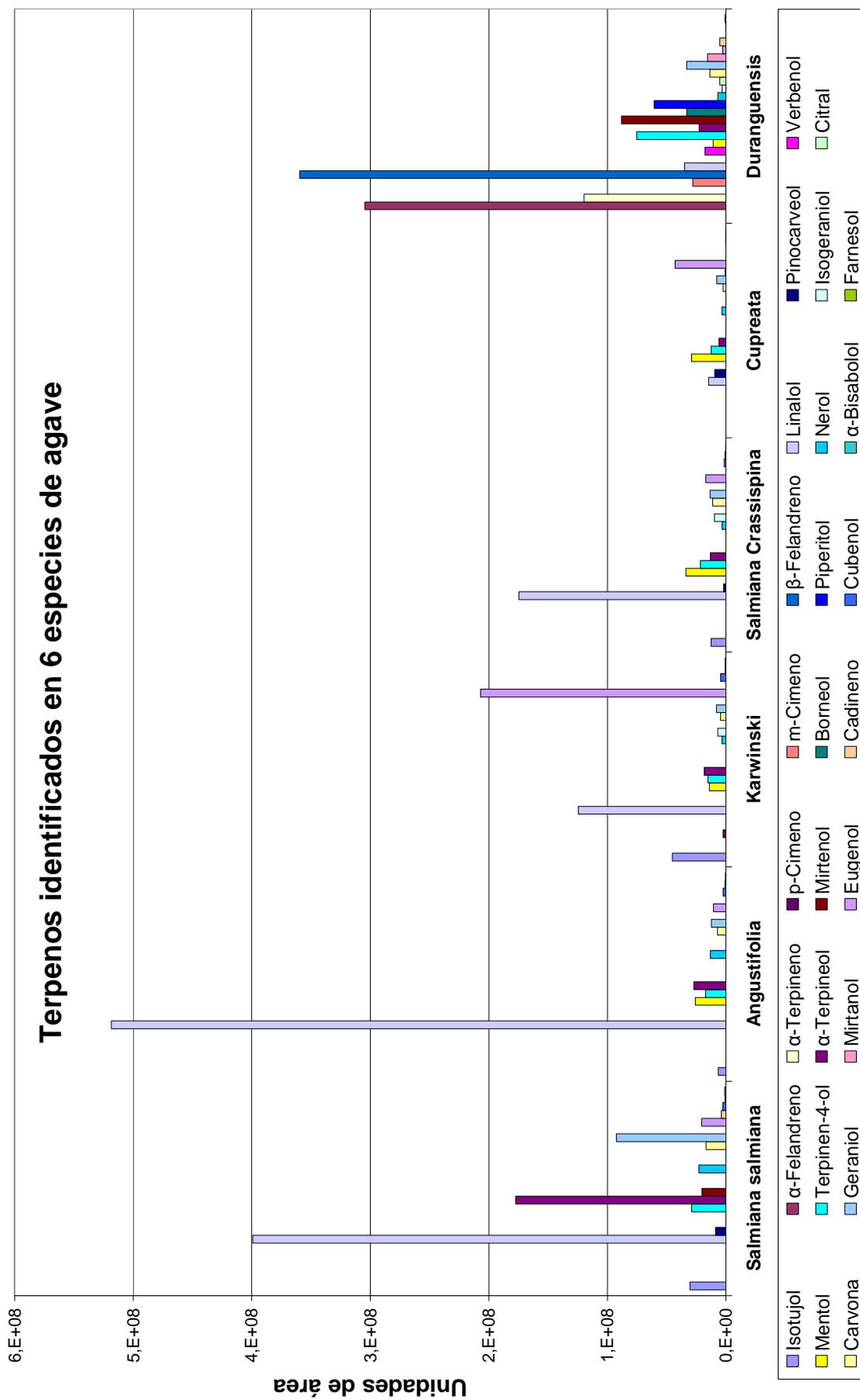


Figura 23. Terpenos identificados en 6 especies de agave mezcalero

Los sabores y aromas que generan los terpenos en el mezcal están en gran parte determinados por los terpenos oxigenados, ya que presentan un grupo polar que favorece su solubilidad en medios acuosos<sup>22</sup>. El aroma y sabor que obtendrá el mezcal se ve ampliamente influenciado por el tipo de terpenos que permanecen durante todo el proceso de elaboración, desde el agave hasta el mezcal. Anteriormente se han reportado algunos terpenos presentes en dicha bebida<sup>2</sup>, como: cimeno, linalol,  $\alpha$ -terpineol, terpinen-4-ol, borneol, geraniol, eugenol y farnesol mismos que en el presente estudio se identificaron también en el agave mezcalero. Cabe mencionar que seis de estos terpenos anteriormente identificados en mezcal también se identificaron en las 6 especies de agave estudiadas en el presente trabajo.

En base a algunos datos de estudios anteriores<sup>2</sup> y los resultados obtenidos en el presente trabajo se pueden observar algunos casos específicos:

El mezcal “Espina Dorada” es elaborado a partir de *A. angustifolia*, en ambos casos se identificaron los siguientes terpenos: linalol,  $\alpha$ -terpineol, eugenol y farnesol. Para la elaboración del mezcal “Casarrobias” se utiliza el *A. cupreata* como materia prima, en ambos casos se identificaron linalol,  $\alpha$ -terpineol, geraniol, eugenol y farnesol. El mezcal “Laguna Seca” es elaborado con *A. salmiana* ssp. *crassispina* y en ambos casos se identificaron linalol, terpinen-4-ol,  $\alpha$ -terpineol, geraniol, eugenol y farnesol. Algunos terpenos que se encuentran en el agave permanecen durante todo el proceso de elaboración del mezcal y llegan hasta el producto final, en el cual juegan un importante papel en las características organolépticas de este producto.

#### **5. 4 Análisis multivariado**

El análisis e interpretación de los resultados se complica cuando aumenta el número de muestras y variables en un estudio. En el presente trabajo durante el análisis cualitativo obtuvimos datos de 6 muestras (agave) y 26 variables (terpenos); con la intención de analizar con mayor profundidad estos datos y encontrar similitudes entre los perfiles de terpenos de las especies de agave estudiadas de manera clara se empleó el análisis de componentes principales (ACP) y el análisis de conglomerados.

#### 5. 4. 1. Análisis de componentes principales

Se aplicó el método análisis de componentes principales (ACP) a los datos obtenidos con el programa Statgraphics Centurion XV, se incluyeron las 6 muestras de agave y los 26 terpenos identificados. Después de ingresar y procesar los datos en el programa se obtuvieron los diagramas de componentes principales en 2 y 3 dimensiones.

La Figura 24 muestra el diagrama de los dos primeros componentes principales (2 dimensiones) para el análisis de terpenos en los 6 tipos de agave mezcalero en estudio. En este caso se explica la semejanza en la distribución de terpenos de las muestras a lo largo del primer y segundo componentes. Es importante mencionar que se utilizaron los 26 terpenos, debido a que el análisis multivariado precisamente incluye en una misma gráfica todas las variables presentes en el estudio, esto con la finalidad de realizar la interpretación global de los resultados.

Si se analiza sólo el primer componente se puede ver que los taxa se separan en dos grupos, el primero formado por *A. duranguensis*, el segundo por el resto de los agaves. Cabe recordar que el primer componente principal explica la mayor varianza de los datos. Cuando se analiza solo el segundo componente, se pueden observar también dos grupos, pero en este caso el primero lo conformó solo el *A. salmiana* var. *salmiana* y el segundo el resto de los agaves.

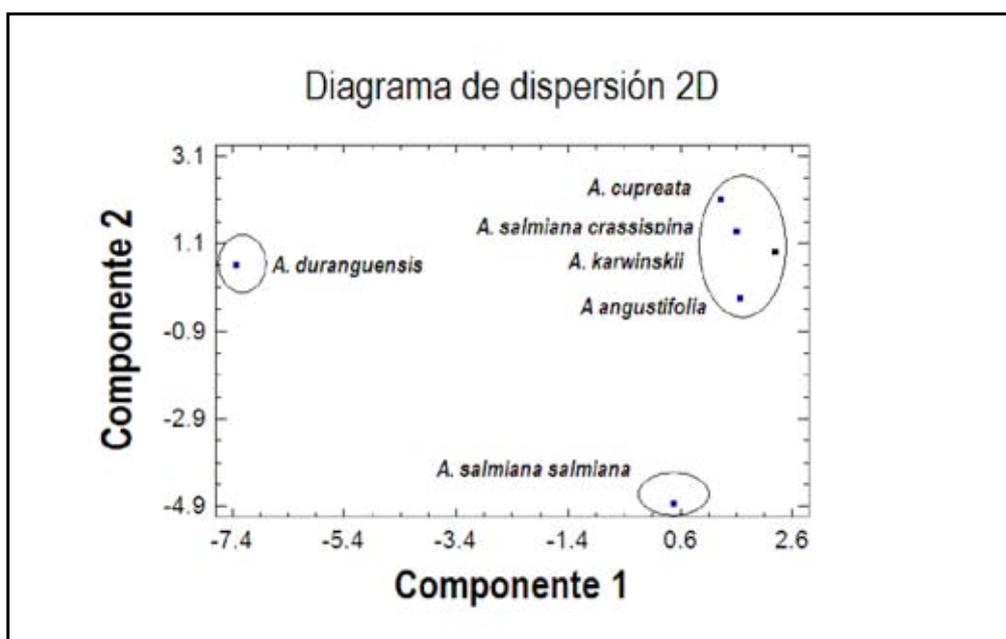


Figura 24. Diagrama de dispersión de los dos primeros componentes principales (dos dimensiones) en el análisis de los terpenos de agave mezcalero.

Al examinar el diagrama con los dos componentes principales trazados se puede observar que se forman tres grupos, el primero formado por *A. angustifolia*, *A. karwinskii*, *A. salmiana* ssp. *crassispina* y *A. cupreata*. El segundo grupo lo forma *A. salmiana* var. *salmiana* y el tercer grupo formado por el *A. duranguensis*, siendo así consistente con lo que anteriormente se había observado al examinar por separado el primer y segundo componentes.

La Figura 25 muestra el diagrama de los tres primeros componentes principales (3 dimensiones), es decir, se incluye el tercer componente principal en el diagrama, en el se observa que se forman cuatro grupos: el primero formado por *A. angustifolia*, *A. salmiana* ssp. *crassispina* y *A. cupreata*, el segundo por *A. karwinskii*, el tercero por *A. salmiana* var. *salmiana* y el cuarto por *A. duranguensis*. Se puede observar que en el diagrama 3D el *A. karwinskii* formó un nuevo grupo con respecto al diagrama 2D, ya que este agave se separó de *A. angustifolia*, *A. salmiana* ssp. *crassispina* y *A. cupreata* a lo largo del tercer componente principal.

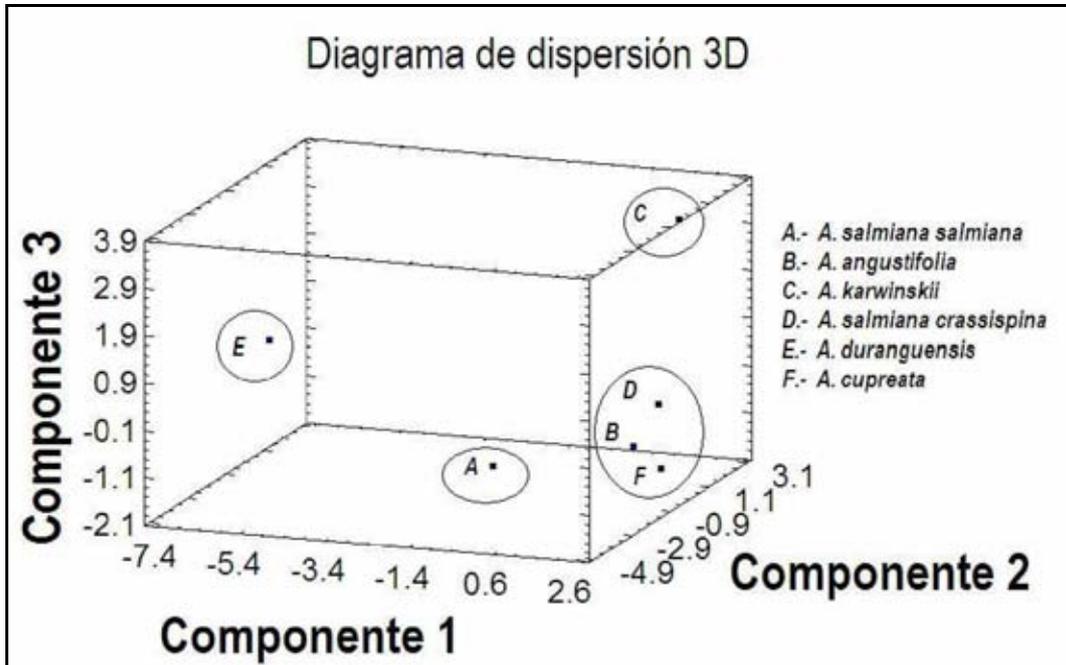


Figura 25. Diagrama de dispersión de los tres primeros componentes principales (3 dimensiones) en el análisis de los terpenos de agave mezcalero.

Con estos resultados podemos concluir la cercana relación entre los perfiles de terpenos de *A. angustifolia*, *A. salmiana* ssp. *crassispina* y *A. cupreata*. y no así de *A. karwinskii*, *A. salmiana* var. *salmiana* y *A. duranguensis*.

#### 5. 4. 2. Análisis de conglomerados

Se aplicó el método de conglomerados mediante el programa Statgraphics Centurion XV, al igual que en el ACP se incluyeron las 6 muestras de agave y los 26 terpenos identificados. Después de ingresar y procesar los datos en el programa se obtuvo el dendrograma correspondiente.

La Figura 26 muestra el dendrograma obtenido de los datos de terpenos en los 6 agaves en estudio. Como se puede observar los resultados son consistentes con lo obtenido en los resultados del ACP, podemos observar que los agaves que presentan una mayor similitud son *A. salmiana* ssp. *crassispina* y *A. cupreata*; posteriormente el segundo conglomerado lo forman estos dos agaves con el *A. angustifolia*. Una vez más al formar un nuevo conglomerado este grupo de tres agaves se une con *A. salmiana* var. *salmiana* y finalmente se forma un último grupo con *A. duranguensis*, este último es evidentemente el agave que presenta la menor similitud entre los analizados, esto se pudo observar anteriormente en el análisis de componentes principales. La información que nos da el análisis de conglomerados confirma la relación cercana entre los agaves *A. angustifolia*, *A. salmiana* ssp. *crassispina* y *A. cupreata*.

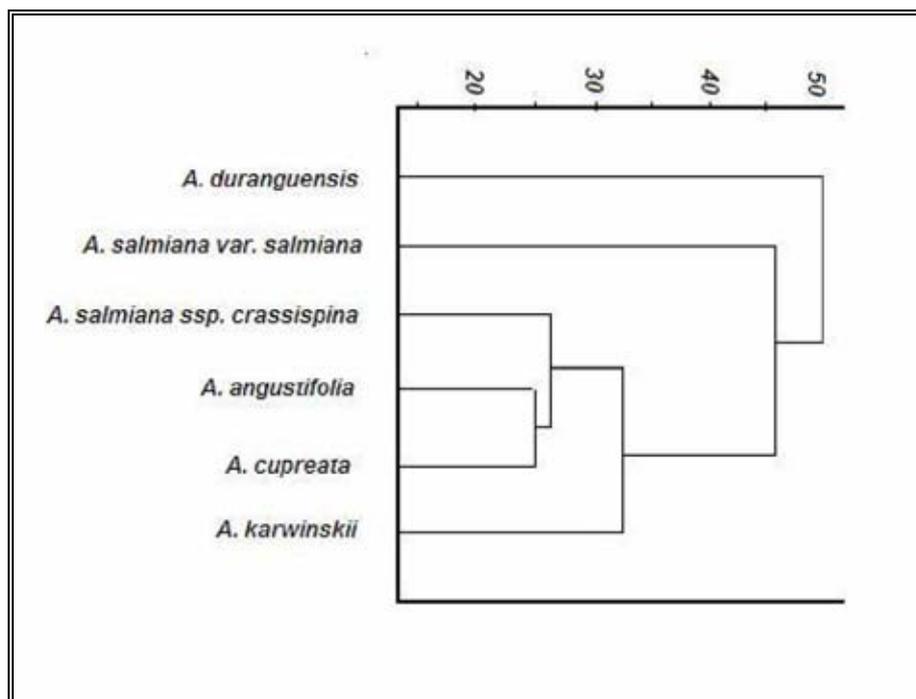


Figura 26. Dendrograma del análisis de terpenos en agave mezcalero.

En esta parte es importante mencionar que en un trabajo anterior se analizaron los ácidos grasos de 5 de los 6 agaves en estudio, faltando sólo el *A. duranguensis*<sup>53</sup>. Comparando algunas de las semejanzas entre los dendrogramas del perfil de ácidos grasos y de terpenos, se observa que el *A. angustifolia* y *A. cupreata* son los 2 tipos de agave que tienen la mayor similitud en ambos casos; sin embargo cuando se analizó el dendrograma del perfil de los ácidos grasos ( Figura 27) se observó que *A. salmiana ssp crassispina* presenta la menor similitud entre los 5 agaves analizados, mientras que en el dendrograma del perfil de terpenos se presentan dentro de un conglomerado junto con *A. cupreata* y *A. angustifolia*.

La figura 27 muestra el dendrograma de 5 agaves a partir de sus concentraciones de ácidos grasos<sup>53</sup>.

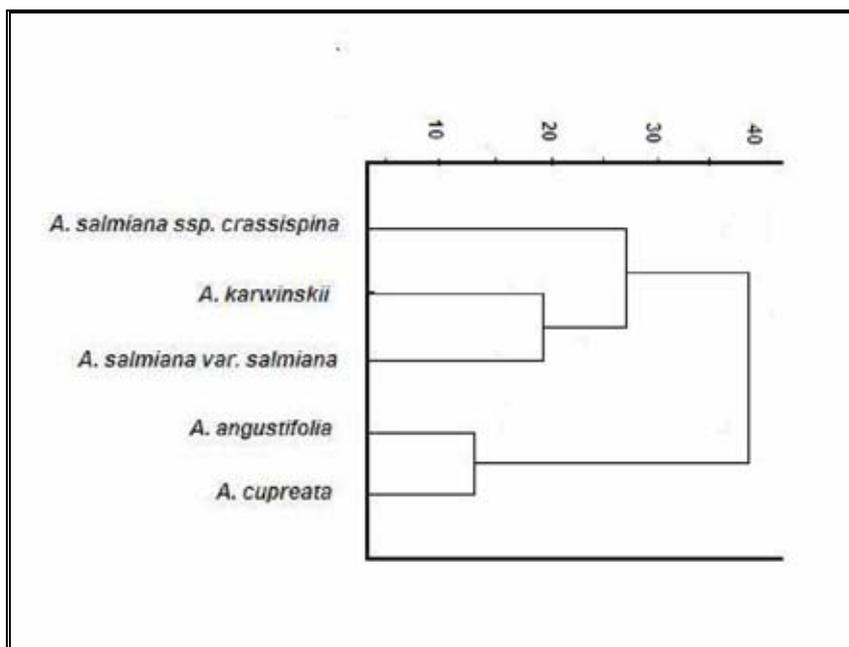


Figura 27. Dendrograma de 5 tipos de agave, construido a partir de sus concentraciones de ácidos grasos.

## 5. 5 Cuantificación de terpenos

Para la cuantificación se utilizaron 6 terpenos que anteriormente se identificaron en todos los agaves estudiados en el análisis cualitativo: linalol, terpinen-4-ol,  $\alpha$ -terpineol, nerol, geraniol y eugenol.

### 5. 5. 1 Linealidad del método

La linealidad del método se evaluó para los 6 terpenos cuantificados. Para estos terpenos se realizaron dos curvas de calibración con soluciones estándar como se describe en el punto 4. 10. En la primera se utilizó concentraciones de 1 a 25 ng/mL y en la segunda de 25 a 300 ng/mL.

La Tabla 7 muestra el coeficiente de correlación ( $r$ ) para cada uno de los terpenos cuantificados en los dos rangos de concentración utilizados. Como se observa la linealidad es aceptable, pues en todos los casos  $r^2$  es igual o superior a 0.9933.

Tabla 7. Linealidad del método (n = 4)

Terpeno	Intervalo lineal (ng/mL)	r <sup>2</sup>
Linalol	1-25	0.9993
	25-300	0.9957
Terpinen-4-ol	1-25	0.9987
	25-300	0.9953
α-Terpineol	1-25	0.9987
	25-300	0.9933
Nerol	1-25	0.9997
	25-300	0.9981
Geraniol	1-25	0.9997
	25-300	0.9985
Eugenol	1-25	0.9997
	25-300	0.9975

### 5. 5. 2 Limite de detección y cuantificación

Los límites de detección y cuantificación se determinaron mediante soluciones estándar de terpenos en concentración de 1 ng/mL. Se calculó la desviación estándar con la cual se obtuvieron los límites de detección (LD = 2DE) y de cuantificación (LQ = 10DE) para los terpenos cuantificados. La Tabla 8 muestra los valores de límite de detección y cuantificación de los terpenos cuantificados.

Tabla 8. Límites de detección y cuantificación (n=4)

Terpeno	DE (ng/mL)	CV (%)	LD (ng/mL)	LQ (ng/mL)
Linalol	0.089	8.9	0.18	0.89
Terpinen-4-ol	0.027	2.7	0.05	0.27
α-Terpineol	0.075	7.5	0.15	0.75
Nerol	0.071	7.1	0.14	0.71
Geraniol	0.065	6.5	0.13	0.65
Eugenol	0.041	4.1	0.08	0.41

### 5. 5. 3. Cuantificación de terpenos en agave

La cuantificación se realizó por medio de estandarización externa (curvas de calibración absoluta), se realizaron dos curvas de diferente concentración con la finalidad de cubrir el amplio rango de concentraciones que presentaron los terpenos elegidos para su cuantificación. La cuantificación se realizó sin el porcentaje de recobro, debido a que, al hacer la extracción del jugo de agave con ayuda del estrujado del agave, lo que se logra

es la exposición y liberación de los terpenos junto con el jugo. Por consecuencia se parte del hecho que la muestra (jugo de agave) se comporta de una manera semejante al agua desionizada adicionada con los estándares de terpenos durante la extracción por MEFS y que el porcentaje de recobro sería el mismo en ambos casos.

La Tabla 9 muestra los resultados de la cuantificación de 6 terpenos identificados en todos los agaves. En *A. duranguensis* y *A. salmiana* var. *salmiana* se cuantificaron los 6 terpenos. En *A. salmiana* ssp. *crassispina* y *A. angustifolia* se cuantificaron 5 terpenos, en *A. cupreata* solo se cuantificaron 3 terpenos y finalmente el agave que presenta la menor concentración fue *A. karwinskii* en el cual solo se cuantificaron 2 terpenos. En la Tabla 9, al final de cada columna se puede observar la suma de la concentración de los terpenos cuantificados para cada tipo de agave, esto con la finalidad de observar la diferencia de las concentraciones totales de los terpenos entre los agaves estudiados. En esta Tabla se puede observar que el agave que presenta la mayor concentración total de terpenos fue *A. duranguensis* con 7.36 µg/100g de agave, seguido por *A. salmiana* var. *salmiana* con una concentración de 7.17 µg/100g de agave. Es de notar que en ambos agaves se encontraron terpenos con alta concentración, tal es el caso del linalol en *A. salmiana* var. *salmiana* y terpinen-4-ol en *A. duranguensis*. En *A. angustifolia* y *A. salmiana* ssp. *crassispina*, se observó una concentración total de terpenos de 3.31 y 1.18 µg/100g de agave respectivamente, mientras que los agaves con la menor concentración de terpenos fueron *A. karwinskii* y *A. cupreata* con concentraciones totales de terpenos de 0.44 y 0.35 µg/100g de agave respectivamente.

En la Tabla 9 también se presenta la suma total de cada terpeno en los diferentes agaves, estos valores se encuentran al final de cada fila, en ellos podemos observar los terpenos que se presentan en mayor concentración y es un reflejo de la abundancia de estos en los diferentes agaves estudiados. En estos resultados se puede notar que el linalol fue el de mayor concentración en *A. salmiana* var. *salmiana* con 4.28 µg/100g de agave, además de ser el único terpeno cuantificado en todos los agaves con concentraciones que van desde 0.14 µg/100g de agave en *A. cupreata* hasta 4.28 µg/100g de agave en *A. salmiana* var. *salmiana*. Además de lo anterior y como se podría esperar, el linalol fue el terpeno con mayor concentración total encontrado en los agaves con 7.12 µg/100g de agave.

El Terpinen-4-ol fue el segundo con mayor concentración total en todos los agaves, con 5.42 µg/100g de agave, esto en gran parte debido a que en *A. duranguensis* se cuantificó en 4.20 µg/100g de agave, lo cual representó la segunda concentración mas alta para un terpeno en un agave.

Tabla 9. Cuantificación de terpenos presentes en agave mezcalero, (n= 3).

#	Agave	<i>A. salmiana</i> ssp. <i>crassispina</i>		<i>A. salmiana</i> var. <i>salmiana</i>		<i>A. angustifolia</i>		<i>A. duranguensis</i>		<i>A. cupreata</i>		<i>A. karwinski</i>		Total (µg/100g)
		(µg/100g)	CV (%)	(µg/100g)	CV (%)	(µg/100g)	CV (%)	(µg/100g)	CV (%)	(µg/100g)	CV (%)	(µg/100g)	CV (%)	
1	<b>Linalol</b>	0.53	2.8	4.28	6.0	1.24	6.6	0.73	4.1	0.14	5.1	0.20	6.8	<b>7.12</b>
2	<b>Terpinen-4-ol</b>	0.25	9.3	0.29	6.1	0.68	6.7	4.20	1.9	NQ	-	NQ	-	<b>5.42</b>
3	<b>α-Terpineol</b>	0.14	8.5	1.51	5.0	1.05	4.0	0.72	3.7	0.14	3.5	NQ	-	<b>3.56</b>
4	<b>Nerol</b>	NQ	-	0.24	6.4	NQ	-	0.16	1.7	NQ	-	NQ	-	<b>0.40</b>
5	<b>Geraniol</b>	0.14	4.9	0.52	5.5	0.19	7.5	1.43	3.9	0.07	6.8	NQ	-	<b>2.35</b>
6	<b>Eugenol</b>	0.12	2.4	0.33	8.0	0.15	6.5	0.12	9.9	NQ	-	0.24	4.1	<b>0.96</b>
	<b>Total</b> (µg/100g)	<b>1.18</b>		<b>7.17</b>		<b>3.31</b>		<b>7.36</b>		<b>0.35</b>		<b>0.44</b>		

Los valores están reportados en µg por cada 100 g de agave.

NQ. No cuantificado

El nerol se cuantificó en menor concentración total. Esto se puede observar en el contenido total de cada terpeno, debido principalmente a que sólo se cuantificó en *A. salmiana* var. *salmiana* y *A. duranguensis*, con concentraciones de 0.24 y 0.16 µg/100g de agave respectivamente, dando con ello una concentración total de 0.40 µg/100g de agave, además fue el terpeno cuantificado en el menor número de agaves, solo en los dos mencionados.

El geraniol se cuantificó en menor concentración en un agave, siendo en el *A. cupreata* con 0.07 µg/100g de agave, a pesar de ello este terpeno se cuantificó en cinco agaves y sólo en *A. karwinski* no fue posible su cuantificación.

## 6. CONCLUSIONES

Se desarrolló un método por microextracción en fase sólida seguida de cromatografía de gases-espectrometría de masas (MEFS-CG-EM) para la extracción, identificación y cuantificación de terpenos en agave mezcalero. El método desarrollado presentó buena linealidad, pues en el rango de concentración de 1 a 300 ng/mL tuvo coeficientes de correlación ( $r^2$ ) superiores a 0.9933. La precisión del método también fue aceptable con coeficientes de variación menores a 10% en todos los terpenos cuantificados.

La metodología desarrollada por MEFS-CG-EM fue una técnica bastante simple, requirió de una sola etapa en la extracción, se utilizó poca cantidad de muestra, no se utilizan disolventes, es de fácil manipulación y con un montaje experimental de bajo costo.

Se identificaron 26 terpenos, de los cuales no todos se identificaron en todos los agaves analizados, de estos sólo 9 se presentaron en todos los agaves. De los terpenos identificados 22 fueron monoterpenos y sólo 4 sesquiterpenos.

En el *A. duranguensis* se identificaron 22 terpenos, siendo este el agave con mayor cantidad de estos compuestos, mientras que en el resto de los agaves se identificaron entre 12 y 14 terpenos en cada uno de ellos.

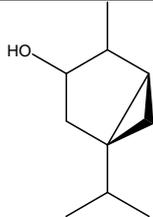
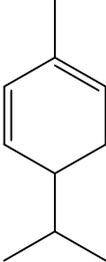
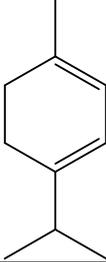
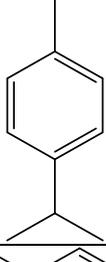
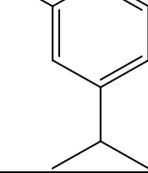
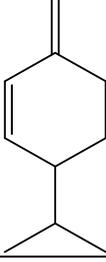
El linalol fue en general el terpeno con mayor concentración de los 6 cuantificados, mientras que nerol fue el de menor concentración. El *A. duranguensis* y *A. salmiana* var. *salmiana* fueron los agaves con la mayor concentración de terpenos.

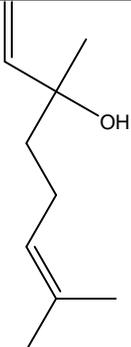
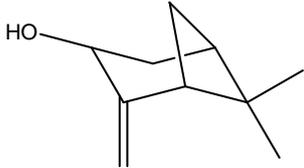
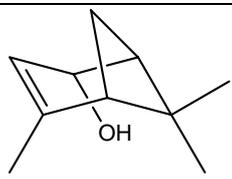
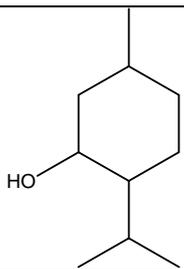
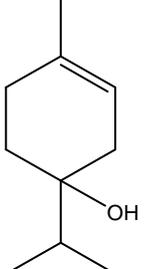
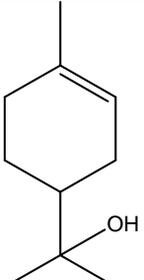
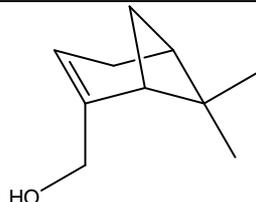
Se encontraron perfiles de terpenos particulares y característicos en cada uno de los agaves analizados y pueden ser responsables en cierta medida de las características de aroma de cada mezcal. El análisis multivariado muestra que los agaves con mayor similitud en su perfil de terpenos fueron *A. angustifolia*, *A. salmiana* ssp. *crassisipina* y *A. cupreata*, mientras que el agave con menor similitud de entre los analizados fue *A. duranguensis*.

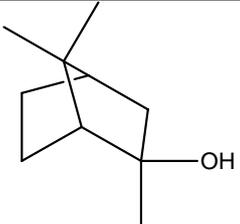
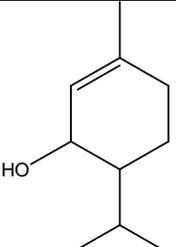
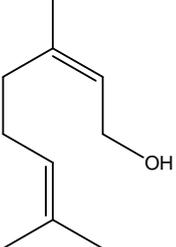
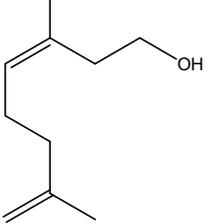
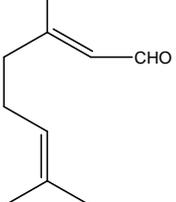
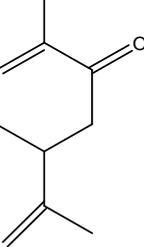
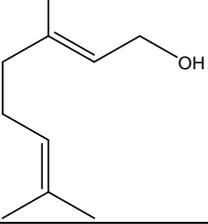
## 7. ANEXOS

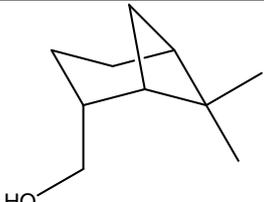
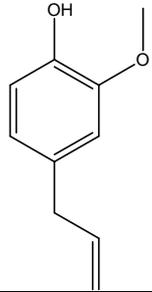
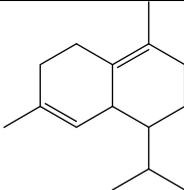
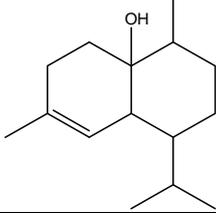
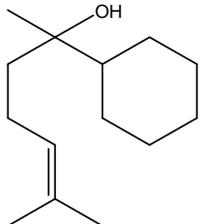
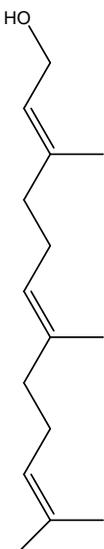
En la Tabla A1 se presentan los terpenos identificados en el presente estudio, su estructura y el origen de donde se ha aislado o identificado anteriormente.

Tabla A1. Características principales de algunos terpenos<sup>31, 34, 37, 54 - 66</sup>.

Terpeno	Estructura	Fórmula y peso molecular	Características principales
Isotujol		C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O PM 154	Componente en aceites esenciales de plantas y árboles como tuja y artemisia. Aislado de los pétalos de tanacétos o tanárida y del árbol de guarea.
$\alpha$ -Felandreno		C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> PM 136	Componente del aceite esencial de eucalipto, cítricos, menta, entre otros. Identificado en pimienta negra, arbustos de juníperos. Involucrado en el mecanismo de defensa de árboles de coníferas.
$\alpha$ -Terpineno		C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> PM 136	Constituyente de aceites esenciales de cítricos, juníperos, eucalipto, pinos. Identificado en pimienta negra Asociado al olor a limón.
<i>p</i> -Cimeno		C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> PM 134	Ampliamente distribuido en aceites de plantas como turpentina en aceites de santolina, juníperos, cítricos y muchas otras. Identificado como parte de las secreciones de defensa de algunos insectos. Usado en industrias de sabores y perfumes. Identificado en pimienta negra.
<i>m</i> -Cimeno		C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> PM 134	Presente en aceite de <i>Ribes nigrum</i> (grosellero negro), juníperos. Identificado como parte de las secreciones de defensa de algunos insectos.
$\beta$ -felandreno		C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> PM 136	Ampliamente distribuido en aceites esenciales de eucalipto, santolina, angélica, lavándula, juníperos, menta, pino, entre otros. Identificado en pimienta negra. Utilizado como ingrediente de sabor.

<b>Linalol</b>		$C_{10}H_{18}O$ PM 154	Constituyente de muchos aceites esenciales como rosa, santolina, tuja lavanda, juníperos, menta. Identificado como parte de las secreciones de defensa de algunos insectos. Identificado en pimienta negra. (Usado ampliamente en la industria de perfumería.
<b>Pinocarveol</b>		$C_{10}H_{16}O$ PM 152	Constituyente del aceite de eucalipto, Ledum (arbusto perene), juníperos, Torilis japonica, entre otros.
<b>Verbenol</b>		$C_{10}H_{16}O$ PM 152	Presente en la terpentina de algunos árboles, componente del atrayente sexual de <i>Ips confusus</i> (insecto descortezador de pinos) y feromona de otros escarabajos. Involucrado en el mecanismo de defensa de árboles de coníferas.
<b>Mentol</b>		$C_{10}H_{20}O$ PM 156	Encontrado en gran cantidad de aceites esenciales de árboles y plantas. Presente especialmente en grandes cantidades en aceite esencial de menta y otras plantas aromáticas. Utilizado ampliamente en perfumes, sabores, aromas, anestésicos, analgésicos, entre otros usos.
<b>Terpinen – 4 -ol</b>		$C_{10}H_{18}O$ PM 154	Aislado de hojas de eucalipto. Identificado como parte de las secreciones de defensa de algunos insectos. Identificado en pimienta negra, juníperos, santonina, tuja. Encontrado en aceite esencial de lavanda. Ingrediente en perfumes.
<b><math>\alpha</math>- Terpineol</b>		$C_{10}H_{18}O$ PM 154	Todos los isómeros de este terpeno aparecen ampliamente en aceites esenciales de plantas del genero <i>Artemisia</i> , en canela, juníperos, tuja, santolina, árbol de guarea, pimienta negra y eucalipto.
<b>Mirtenol</b>		$C_{10}H_{16}O$ PM 152	Aislado del Mirto o Arrayán (arbusto aromático) y otras plantas aromáticas.

<b>Borneol</b>		$C_{10}H_{18}O$ PM 154	Borneol y su acetato son usados en la industria de la perfumería. Encontrada en la cúrcuma aromática, en la canela y otras plantas. Identificado en pimienta negra. Componente del aceite de valeriana, manzanilla y lavanda. Usado medicinalmente como anestésico y analgésico en China y Japón.
<b>Piperitol</b>		$C_{10}H_{18}O$ PM 154	Aislado del aceite esencial de menta, eucalipto y <i>Andropogon sp</i> (planta de la familia de las poáceas).
<b>Nerol</b>		$C_{10}H_{18}O$ PM 154	Constituyente de muchos aceites esenciales incluidos de plantas y flores como la bergamota. Usado ampliamente en la industria de la perfumería.
<b>Isogeraniol</b>		$C_{10}H_{18}O$ PM 154	Encontrado en aceites esenciales con aroma de rosas.
<b>Citral</b>		$C_{10}H_{16}O$ PM 152	Frecuente en aceite esencial de limón, naranja y otros cítricos. Importante en la industria de los aromas en alimentos y perfumería.
<b>Carvona</b>		$C_{10}H_{14}O$ PM 150	Constituyente de varios aceites esenciales como el de la <i>carum carvi</i> (carvia o comino de prado), de artemisa y de la menta. Ingrediente en varios sabores artificiales.
<b>Geraniol</b>		$C_{10}H_{18}O$ PM 154	Constituyente del aceite de geranios. Se puede encontrar en estado libre y como éster en aceites esenciales de varias plantas. Olor fragante, utilizado en aromas artificiales de rosas. Usado ampliamente en perfumería.

<b>Mirtanol</b>		$C_{10}H_{18}O$ PM 154	Raramente se encuentra en forma natural. Aislado de <i>Chamaecyparis formosensis</i> (árbol endémico de Taiwan).
<b>p - Eugenol</b>		$C_{10}H_{12}O_2$ PM 164	Molécula considerada como fenilpropanoide, Extraído de aceites esenciales, principalmente de clavo, nuez y canela. Identificado en pimienta negra. Utilizado como anestésico, antiséptico, perfumería. Utilizado en la industria de saborizantes Conocido como feromona de algunos insectos, principalmente moscas.
<b>Cadineno</b>		$C_{15}H_{24}$ PM 204	Constituyente del aceite esencial de algunas plantas y flores como citroneta y árbol de guarea. Identificado en pimienta negra. Identificado en algunos vinos.
<b>Cubenol</b>		$C_{15}H_{26}O$ PM 222	Constituyente en aceites esenciales de juníferos y otras plantas, árboles y flores.
<b>α - Bisabolol</b>		$C_{15}H_{26}O$ PM 222	Identificado en pimienta negra. Constituyente del aceite esencial de pinos, <i>matricaria chamomilla</i> (Manzanilla ) y <i>Populus balsamifera</i> (bálsamo de Judea) Utilizado como agente antiinflamatorio.
<b>Farnesol</b>		$C_{15}H_{26}O$ PM 222	Identificado en pimienta negra. Utilizado en la industria de la perfumería. Ampliamente difundido en hojas, flores y raíces de plantas y árboles. Encontrado en secreciones de insectos. En mamíferos se ha determinado que son importantes como sustancias de comunicación, conducta y usados en secreciones para marcar territorio. Reconocido como agente antibacterial, incluso como regulador de proliferación celular en tumores, por lo que es considerado como posible anticancerígeno.

## Curvas de calibración absoluta para la cuantificación de terpenos

Las figuras A1 a A6 muestran las curvas de calibración absoluta para la cuantificación de terpenos.

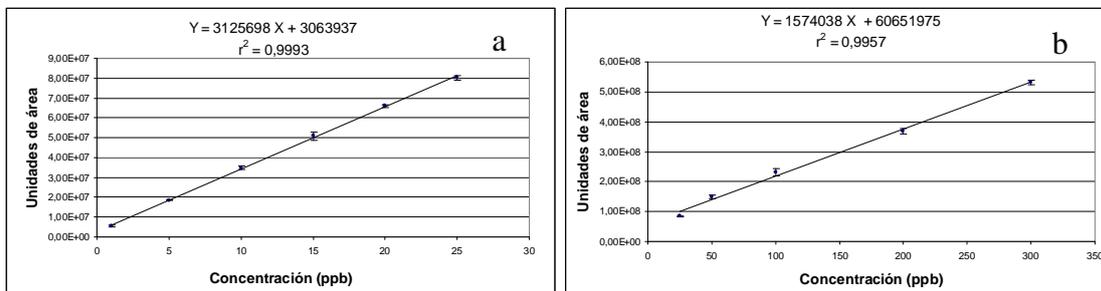


Figura A1. Curvas de calibración absoluta (estandarización externa) para linalol en concentraciones de: a) 1 a 25 ppb y b) 25 a 300 ppb

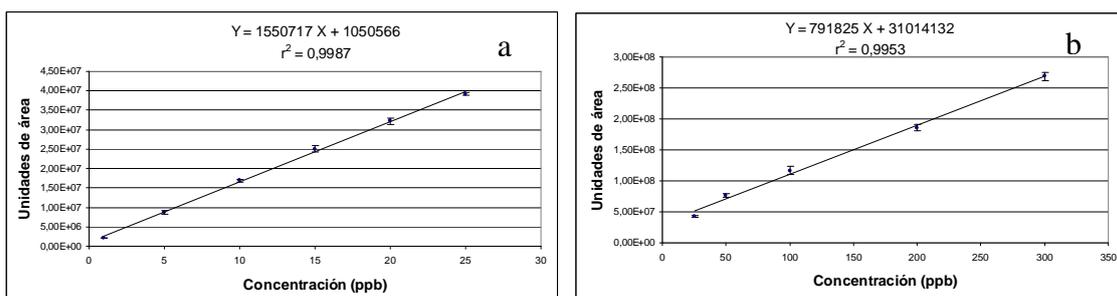


Figura A2. Curvas de calibración absoluta (estandarización externa) para Terpinen-4-ol en concentraciones de: a) 1 a 25 ppb y b) 25 a 300 ppb

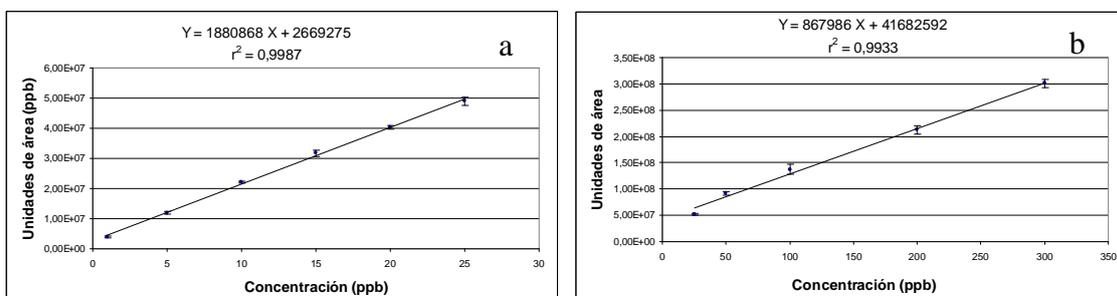


Figura A3. Curvas de calibración absoluta (estandarización externa) para  $\alpha$  - Terpineol en concentraciones de: a) 1 a 25 ppb y b) 25 a 300 ppb

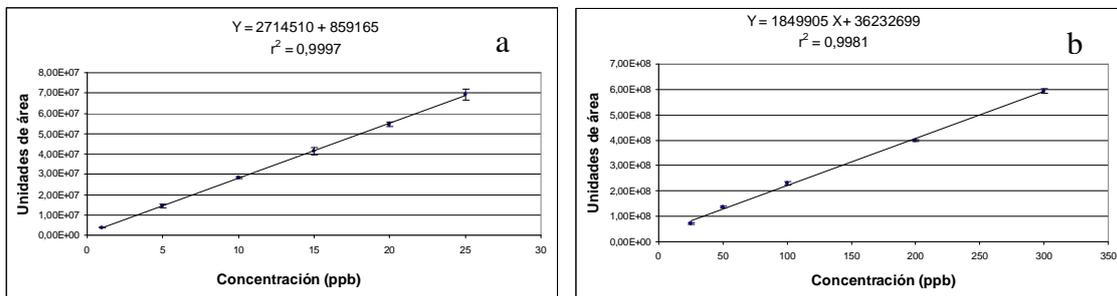


Figura A4. Curvas de calibración absoluta (estandarización externa) para Nerol en concentraciones de: a)1 a 25 ppb y b) 25 a 300 ppb

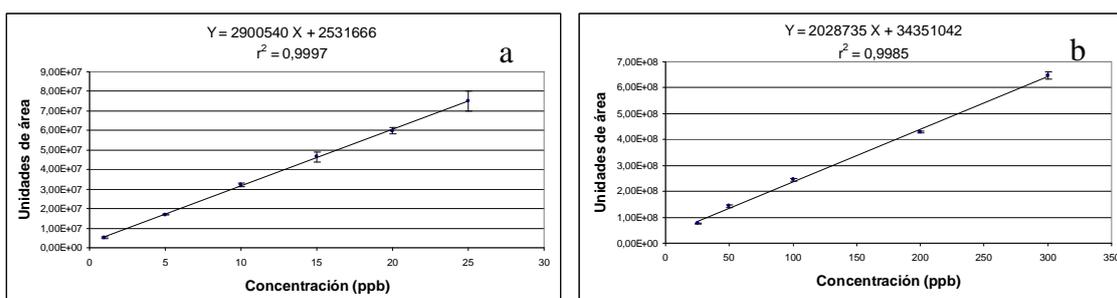


Figura A5. Curvas de calibración absoluta (estandarización externa) para Geraniol en concentraciones de: a)1 a 25 ppb y b) 25 a 300 ppb

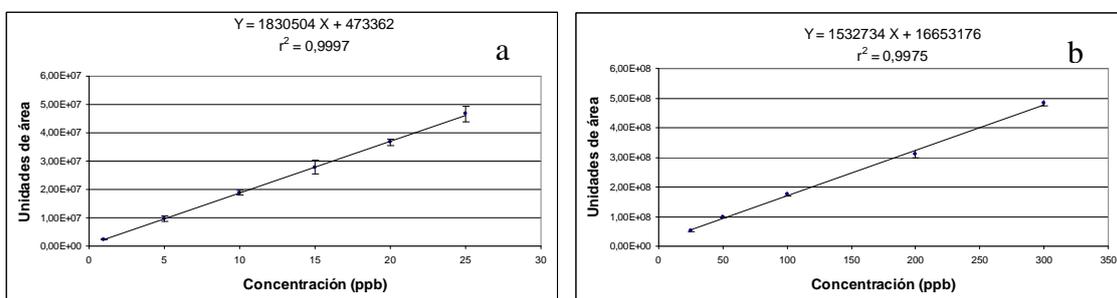


Figura A6. Curvas de calibración absoluta (estandarización externa) para Eugenol en concentraciones de: a)1 a 25 ppb y b) 25 a 300 ppb

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. Quiroz, J. *Mezcal: Orígenes, elaboración y recetas*. Códice Ediciones mexicanas. Mérida, México 1997. 43 p.
2. Reyes, D. A. Determinación de los principales compuestos orgánicos del mezcal por cromatografía de gases capilar – espectrometría de masas. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM, México, 2006.
3. Juárez, R. Determinación de Terpenos en Tequila 100% Agave. Tesis de maestría. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México, 2006.
4. Ruvalcaba, J. *El Maguey Manso. Historia y presente de Epazoyucan, Hidalgo*. Universidad Autónoma Chapingo. México 1983. 123 p.
5. Granados, D. *Los agaves en México*. Universidad Autónoma Chapingo, México, 1993. 252 p.
6. Aguirre, J. *El Maguey Mezcalero potosino*. Consejo Nacional Potosino de Ciencia y Tecnología. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. México, 2001. 87 p.
7. Goncálvez de Lima, L. O. *El Maguey y el pulque en los códices mexicanos*. Fondo de Cultura Económica. México, 1978. Cap 1, pp 13- 23.
8. Acuayte, E. situación actual del sistema producto maguey-mezcal en el estado de Oaxaca. Tesis de licenciatura. UACH. Chapingo, México. 2006.
9. García-Mendoza, A. Distribution of Agave (Agavaceae) in México. *Cact. Succ. J. (U.S.)* 74 (2002) 177-186.
10. Rocha, M. Good-Ávila, S. Molina-Freaner, F. Pollination biology an adaptative radiation of *agavaceae* with special emphasis on the genus *Agave*. *Aliso* 22 (2007) 329-344.
11. García-Mendoza, Riqueza de las familias Agavaceae y Nolinaceae en México. *Bol. Soc. Bot. México*, 56 (1995) 7-24
12. Dahlgren, R. M. Clifford, H. T. Yeo, P. F. The family of monocotiledons. *Structure, Evolution and Taxonomy*. Springer-verlag, Berlín, 1985. 520 p.
13. Nobel, P. Los incomparables agaves y cactus. Editorial Trillas. México, 1998. Cap 2 y 3. pp 10-58
14. Parson, J. R. Darling, J. Maguey (*Agave ssp*) Utilization in Mesoamerican civilization: A case for precolumbian “pastoralism”. *Bol. Soc. Bot. México* 66 (2000) 81-91.

15. Nobel, P. S. *Environmental biology of Agaves and Cacti*. Cambridge University. 1988. 263 p.
16. Breitug, J. The cactus and succulent journal. Yearbook. The Agaves. Ed. Charles Glas/ Robert Foster. 1968. pp. 51-95.
17. Gentry, H. S. *Agaves of Continental North America*. The University of Arizona Press. 1982. pp. 335-609.
18. [www.conabio.gob.mx/institucion/proyectos/resultados/anexos](http://www.conabio.gob.mx/institucion/proyectos/resultados/anexos) recuperado 3 de Junio de 2008.
19. Norma Oficial Mexicana. NOM-070-SCFI-1994. Bebidas alcohólicas. Mezcal-Especificaciones. Diario Oficial de la Federación. 12 de Julio de 1997.
20. Declaración general de la protección a la denominación de origen "Mezcal". Diario Oficial de la Federación, México. D.F., 28 de Noviembre de 1994.
21. Ley de la Propiedad Industrial. Título quinto, capítulo I. Diario Oficial de la Federación, ultima reforma publicada 25 de Enero de 2006.
22. De León, A. Escalante, P. González, I. Barba, A. El mezcal, una mezcla natural de alcoholes y feromonas. *Bebidas Mexicanas*, Junio/Julio 2006, 10-18.
23. Ortiz, E. Ramales, M. El proceso de elaboración del mezcal. *Bebidas Mexicanas*. Diciembre 2006/Enero 2007. 28-32
24. Valenzuela-Zapata, A. *El agave tequilero: Su cultivo e industrialización*. Monsanto, México, 1994. 119 p.
25. Mann, J. Davidson, R.S. Hobbs, J.B. *Natural Products. Their Chemistry and biological significance*. Ed Longmann Cientific and technical. Cap 5 Terpenoids, pp 289-359
26. Fernández-García, F. Imhof, M. Schlichtherle-Cerny, H. Olivier, J. Terpenoids and benzenoids in La Serena cheese made at different seasons of the year with a *Cynara cardunculus* extract as coagulant. *International Dairy Journal* 18 (2008) 147–157.
27. Banchio, E. Zygadlo, J. Valladares, G. Effects of mechanical wounding on essential oil composition and emission of volatiles from *Minthostachys mollis*. *J. Chem. Ecol.* 31 (2005) 719 – 727
28. Romero, J. López, P. Rubio, C. Strategies for single-drop microextraction optimisation and validation Application to the detection of potential antimicrobial agents. *J. Chromatog. A*, 1166 (2007) 24–29
29. Heldt, H. *Plant biochemistry and molecular biology*. New York, Oxford University. 1997. 522 p.

30. Bobadilla, A. Caracterización de terpenos en el *Agave tequilana* Weber variedad azul y su evolución en la producción de tequila. Tesis de maestría. Facultad de Química. UNAM, México, 2003.
31. Conolly, J. D. Hill, R. A. Dictionary of terpenoids Vol. 1 Mono and sesquiterpenoids. Ed. London Chapman and Hall. 1991.
32. Davies, D. Giovanelli, J. *Bioquímica vegetal*. Editorial Omega S. A. Barcelona 1969. 504 p.
33. Rhomer, M. The discovery of a mevalonate independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. *NPR. Nat. Prod. Rep.* 16 (1999) 565-574
34. Phillips, M. A. Croteau, R. B. Resin-based defenses in conifers. *Trends in plant science. Review.* 5 (1999) 184 – 190
35. Janus Pawlitzyn. *Solid Phase Microextraction. Theory and practice*. Ed. Wiley-VCH. 1997
36. Kataoka H. Lord, Pawlitzyn, J. Review. Application of SPME in food analysis. *J Chromatogr. A.* 880 (2000) 35-62
37. Klimanova, E. Holadova, K. Aroma profiles of five basil (*Ocimum basilicum* L.) cultivars grown under conventional and organic conditions. *Food Chem.* 107 (2008) 464-472
38. Peña, A. Capella, S. Juarez, R. Determination of terpenes in tequila by solid phase microextraction-gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatog. A,* 1134 (2006) 291-297
39. De León-Rodríguez, A. González-Hernández, L. Barba de la Rosa, A. Characterization of volatile compounds of mezcal, an ethnic alcoholic beverage obtained from *Agave salmiana*. *J. Agric. Food. Chem.* 54 (2006) 1337-1341
40. Vallejo-Córdoba, P. Tequila volatile characterization and ethyl ester determination by solid phase microextraction gas chromatography/mass spectrometry análisis. *J. Agric. Food. Chem.* 52 (2004) 5567-5571.
41. Dimitra A. Lambropoulou, D. A. Konstantinou, I. K. Recent developments in headspace microextraction techniques for the analysis of environmental contaminants in different matrices. *Journal of Chromatography A,* 1152 (2007) 70–96.
42. Mc Nair, H. M. & Miller, J. M., *Basic Gas Chromatography*, Editorial John Wiley & Sons Inc., 1 ft edition, New York, U.S.A., 1998. 200 p.
43. Skoog, D. James, F. Holler, J. Timothy, A. *Principios de análisis instrumental*. Ed. Mc Graw Hill, España. 2001. pp. 271 – 275.

44. Palmer, P. T. Gas Chromatography/Mass Spectrometry. San Francisco State University USA. in Encyclopaedia of Analytical Chemistry. Applications, Theory and Instrumentation. pp.11728.Vol. 13 Food. Universitat de Valencia, España
45. Rubinson, Judith. Rubinson Kenneth. Química Analítica Contemporánea. México, Prentice Hall, 2000. pp. 381-389.
46. Willard, H. Merritt, L. Dean, J. Métodos de análisis instrumental. Compañía Editorial Continental. 1988. Cap. 15 – 19. pp. 477-628.
47. Ramírez, E. Determinación de capsaicina y dehidrocapsaicina en alimentos por Microextracción en Fase Sólida-Extracción Directa-Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (MEFS-ED-CG-EM). Tesis de maestría. Facultad de Química. UNAM. 2007. 82 p.
48. Miller J. N., Miller J. C., Estadística y Quimiometría para Química Analítica, Prentice Hall, 4 a edición, Madrid, España, 2002. Cap. 8. pp. 221-248.
49. Ramis, G. Álvarez-Coque, C. Quimiometría. Editorial Síntesis, S. A. 2001. Cap. 7. pp. 157-181.
50. Medina, A. Determinación de terpenos en *Agave tequilana* Weber var. Azul, *Agave angustifolia*, *Agave salmiana* y en sus respectivas bebidas alcohólicas. Tesis. Facultad de Química. UNAM. 2004. 54 p.
51. Peña, A. Díaz, L. Medina, A. Characterization of three *Agave* species by gas chromatography and solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry. J. Chromatog. A, 1027 (2004) 131-136
52. Nava Cruz, Y. Espinosa-García, F. J. Furnier-Whitelaw, G. R. Niveles y patrones de variación química en resinas de las hojas del género *Abies* del norte de México. Agrociencia 40 (2006) 229-238.
53. Martínez, J. Determinación de lípidos simples en agave mezcalero por cromatografía de gases. Tesis de maestría. Facultad de Química. UNAM, México, 2007.
54. Coelho, E. Rocha, S. Delgadillo, I. Headspace-SPME applied to varietal volatile components evolution during *Vitis vinifera* L. Anal. Chem. Acta 563 (2006) 204-214
55. Vichi, S. Riu-Aumatell, M. Mora-Pons, M Guadayol, J. HS-SPME coupled to GC/MS for quality control of *Juniperus communis* L. berries used for gin aromatization. Food Chem. 105 (2007) 1748–1754
56. Jirovetz, L. Buchbauer, G. Benoit, M. Geissler, M. Aroma compound analysis of *Piper nigrum* and *Piper guineense* essential oils from Cameroon using SPME-GC, SPME-GC-MS and olfactometry. J. Chromatog. A, 976 (2002) 265–275

57. Misra, R. CRC. Handbook of terpenoids: monoterpenoids. Vol. 1 Acyclic and monocyclic diterpenoids. Ed. Sukh dev. Florida, USA. 1982.
58. Granger, R. Campbell, L. Johnston, G. (+)- And (-)-borneol: efficacious positive modulators of GABA action at human recombinant  $\alpha_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\gamma_{2L}$  GABA<sub>A</sub> receptors. *Biochem. Pharmacol.* 69 (2005) 1101 – 1111
59. Liu, K. Rossi, P. Ferrari, B. Berti, L. Composition, irregular terpenoids, chemical variability and antibacterial activity of the essential oil from *Santolina corsica*. *Phytochemistry* 68 (2007) 1698–1705
60. Lee, H. Finckbeiner, S. Yu, J. Wiemer, D. Characterization of (*E,E*)-farnesol and its fatty acid esters from anal scent glands of nutria (*Myocastor coypus*) by gas chromatography–mass spectrometry and gas chromatography–infrared spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1165 (2007) 136–143.
61. Banthorpe, D. V. Mann, J. Short communication monoterpene glucosides from petals of *tanacetum vulgare*. *Phytochemistry* 11(1971)2589 - 2591.
62. Lago, H. Soares, M. Batista-Pereira, L.G. Silva, F. Fernández, J. Volatile oil from *Guarea macrophylla* ssp. *tuberculata*: Seasonal variation and electroantennographic detection by *Hypsipyla grandella*. *Phytochemistry* 67 (2006) 589–594
63. Ivarsson, P. Birgersson, G. Regulation and biosynthesis of pheromone components in the double spined bark beetle *Ips duplicatus* (Coleoptera: Scolytidae). *J. Insect. Physiol.* 41(1995) 843 – 849
64. Rudloff, E. V. Lapp, M. Yeh, F. Chemosystematic study of *Thuja plicata*: multivariate analysis of leaf oil terpene composition. *Biochem. Syst. and Ecol.* 16 (1988) 119 - 125.
65. Farine, J. P. Everaerts, C. Brossut, C. Defensive Secretions of Nymphs and Adults of Five Species of Pyrrhocoridae (Insecta: Heteroptera). *Biochem. Syst. and Ecol.* 21 (1993) 363-371.
66. Siderhust, M. S. Jang, E. B. Female-biased attraction of oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel), to a blend of host fruit volatiles from *Terminalia catappa* L. *J. Chem. Ecol.* 32 (2006) 2513 – 2524.