



UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE LA MIXTECA

**“IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ALGUNOS
ALCOHOLES EN LA DESTILACIÓN Y RECTIFICACIÓN
DEL MEZCAL OBTENIDO DE AGAVE *POTATORUM*
ZUCC”**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO EN ALIMENTOS**

PRESENTA:

JESICA ARIADNA JIMÉNEZ MENDOZA

DIRECTOR DE TESIS:

M. C. VANIA SHUHUA ROBLES GONZÁLEZ

ASESORA DE TESIS:

DRA. ROSA ISELA GUZMÁN GERÓNIMO

HUAJUAPAN DE LEÓN, OAXACA, JULIO DEL 2009

Este trabajo se llevó a cabo en los Laboratorios de Físicoquímica y Análisis Instrumental del Instituto de Agroindustrias de la Universidad Tecnológica de la Mixteca.

RESUMEN

Se identificó y cuantificó el metanol, 2-butanol, 1-propanol, 2-metil-1-propanol, 1-butanol y 3-metil-1-butanol, durante las etapas de la destilación y rectificación del mezcal elaborado artesanalmente obtenido a partir de *Agave potatorum* Zucc (Tobalá) mediante la técnica de cromatografía de gases. Las eficiencias de separación en la etapa de destilación fueron para el metanol del 99%, 2-butanol del 49%, propanol del 66%, 2-metil-1-propanol del 81%, butanol del 12% y para el 3-metil-1-butanol del 88%, mientras que en la rectificación las eficiencias fueron del 87, 97, 88, 92, 42 y 95% respectivamente. Con respecto a la etapa de la destilación, se recomienda hacer la separación de la cabeza y el corazón a los 70 minutos mientras que en la rectificación a los 45 minutos. No se sustenta la colecta de la cola por el comportamiento mostrado respecto a la concentración de los alcoholes.

*A mi madre, a toda mi familia y a Dios
por concederme salud y fuerza
para seguir adelante...*

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Mercedes G. López Pérez por su ejemplo, dedicación y sus enseñanzas.

A la M.C. Araceli Vera Guzmán por el apoyo y la información proporcionada.

A la Dra. Rosa Isela Guzmán Gerónimo y al M.C. Vania Shuhua Robles González por dirigirme y asesorarme en ésta tesis.

A la Dirección del Consejo Mexicano Regulador de la Calidad del Mezcal (COMERCAM), por el apoyo durante mi estancia para la finalización del presente proyecto.

A mis maestros, que fueron parte fundamental para saberme guiar y proporcionarme los conocimientos necesarios para continuar mis estudios.

INDICE

	Página
Resumen.....	ii
Dedicatoria.....	iii
Agradecimientos.....	iv
Índice.....	v
Indice de Figuras.....	viii
Índice de Tablas.....	ix
Lista de Abreviaturas.....	x
<hr/>	
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Planteamiento del problema.....	1
1.1.1 Generalidades del mezcal.....	1
1.1.2 Agave <i>potatorum</i> Zucc.	2
1.1.3 Proceso de elaboración del mezcal.....	3
1.1.3.1 Recolección y corte.....	5
1.1.3.2 Cocción.....	5
1.1.3.3 Triturado.....	5
1.1.3.4 Fermentación.....	5
1.1.3.5 Destilación y Rectificación.....	6
1.2 Importancia del estudio.....	7
1.3 Limitaciones del estudio.....	7
<hr/>	
2. ANÁLISIS DE FUNDAMENTOS.....	8
2.1 Compuestos volátiles en bebidas alcohólicas destiladas provenientes de Agave.....	8

2.2	Importancia del proceso de destilación sobre el perfil de compuestos volátiles en bebidas alcohólicas destiladas de Agave.....	9
2.3	Técnicas analíticas para compuestos químicos volátiles.....	10
2.3.1	Cromatografía de gases.....	10
2.3.2	Método del estándar interno.....	11
<hr/>		
3.	HIPÓTESIS.....	13
<hr/>		
4.	OBJETIVOS.....	13
4.1	Objetivo general.....	13
4.2	Objetivos específicos.....	13
<hr/>		
5.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
5.1	Materia Prima.....	15
5.2	Equipo.....	15
5.3	Metodología.....	15
5.3.1	Obtención de la muestra.....	15
5.3.2	Determinación de alcoholes y metanol en mezcal por cromatografía de gases.....	15
5.3.2.1	Estándar interno.....	15
5.3.2.2	Preparación de las soluciones patrón.....	16
5.3.2.3	Curva de calibración.....	16
5.3.2.4	Preparación de la muestra.....	16
5.3.2.5	Condiciones de operación del cromatógrafo de gases.....	17
5.3.2.6	Cuantificación de los alcoholes de estudio.....	18
5.3.2.7	Cinéticas de los alcoholes de estudio.....	18

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	19
6.1 Proceso de elaboración artesanal del mezcal obtenido de <i>Agave potatorum</i> Zucc por el productor de Santa María Albarradas.....	19
6.2 Identificación y cuantificación de los alcoholes de la destilación y rectificación del mezcal.....	23
6.2.1 Identificación de los alcoholes de la destilación y rectificación del mezcal.....	23
6.2.2 Cuantificación de los alcoholes de la destilación y rectificación del mezcal.....	25
6.3 Análisis del comportamiento de los alcoholes de la destilación y rectificación del mezcal.....	29
<hr/>	
7. CONCLUSIONES.....	33
<hr/>	
8. PERSPECTIVAS.....	35
<hr/>	
9. LITERATURA CITADA.....	36
<hr/>	
ANEXO 1.....	40
ANEXO 2.....	42

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Planta de <i>Agave potatorum</i> Zucc.....	3
Figura 2. Proceso de elaboración del mezcal.....	4
Figura 3. Sistema de cromatografía de gases.....	11
Figura 4. Plan de trabajo	14
Figura 5. Método de destilación y rectificación del mosto fermentado de <i>Agave potatorum</i> Zucc realizado por el productor.....	20
Figura 6. Equipo de destilación artesanal utilizado por el productor.....	21
Figura 7. Ajuste del grado alcohólico por parte del productor.....	22
Figura 8. Cromatograma representativo de los estándares.....	24
Figura 9. Cromatograma representativo obtenido de la etapa de rectificación a los 90 minutos de las muestras.....	24
Figura 10. Cinética de la concentración de algunos alcoholes durante la destilación artesanal de <i>Agave potatorum</i> Zucc.....	27
Figura 11. Cinética de la concentración de algunos alcoholes durante la rectificación artesanal de <i>Agave potatorum</i> Zucc.....	28
Figura 12. Curva de calibración de las soluciones patrón.....	40

INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Concentración de las soluciones patrón de los analizados alcoholes.....	16
Tabla 2. Diluciones de la solución patrón concentrada para la curva de calibración.....	17
Tabla 3. Tiempos de retención promedio (minutos) encontrados para las soluciones patrón y para las muestras.....	23
Tabla 4. Concentración de alcoholes durante la destilación.....	25
Tabla 5. Concentración de alcoholes durante la rectificación.....	25
Tabla 6. Concentración inicial y final de los alcoholes de la destilación y rectificación.....	26
Tabla 7. Ecuaciones de las soluciones patrón.....	41
Tabla 8. Concentración (C2) del metanol durante la destilación.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS

NOM	Norma Oficial Mexicana
CG	Cromatógrafo de gases
t_R	Tiempo de retención
t_{RE}	Tiempo de retención del estándar
t_{RM}	Tiempo de retención de la muestra
TC	Tiempo de colecta
Ac	Área del compuesto
As	Área del estándar
Ac/As	Área del compuesto/Área del estándar
C1	Concentración del compuesto en ppm
FD	Factor de dilución
C2	Concentración del compuesto C1*Factor de dilución
y	Relación de áreas
m	Pendiente de la recta
b	Ordenada al origen de la recta

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Planteamiento del problema

1.1.1 Generalidades del mezcal. La palabra mezcal se deriva de la palabra náhuatl “*mexcalli*” que significa agave cocido en horno. El mezcal, según la NOM-070-SCFI-1994, es una bebida alcohólica regional obtenida por destilación y rectificación de mostos preparados, directa y originalmente, con los azúcares extraídos de las cabezas maduras de las siguientes especies de agaves: *Agave potatorum* Zucc, *Agave angustifolia* Haw, *Agave esperrima* Jacobi, *Agave weberi* Cela, *Agave salmiana* Otto y otras especies, siempre y cuando no sean utilizadas como materia prima para otras denominaciones de origen dentro del estado. Cada una de las cuales se someten a una hidrólisis o cocción, y posteriormente a una fermentación alcohólica con levaduras, cultivadas o no, siendo susceptible de efectuarse un enriquecimiento hasta con 20% de otros carbohidratos, siempre y cuando no se eliminen los componentes que le confieren las características a este producto.

De acuerdo a sus características organolépticas se describe al mezcal como un líquido de olor y sabor *sui generis*, estos atributos sensoriales varían de acuerdo a los tipos de agaves utilizados y al proceso de elaboración. El mezcal puede ser incoloro o ligeramente amarillo cuando es reposado o añejado en recipientes de madera de roble blanco o encino, o cuando se aboca sin reposarlo o añejarlo. Es decir, un factor que influye en su sabor es el tiempo de maduración después de la destilación.

Con base en las características adquiridas durante el tiempo de maduración, el mezcal se puede clasificar en:

- a) mezcales jóvenes, los cuales son embotellados justo después de la destilación,
- b) reposados, almacenados durante 12 meses en barricas y
- c) añejos, sujetos a un proceso de maduración de por lo menos un año en barricas de roble blanco o encino.

Mientras que, de acuerdo a los carbohidratos empleados para su elaboración, el mezcal se clasifica en tipo I ó 100 % agave, el cual es elaborado exclusivamente con azúcares procedentes del agave y en tipo II, al que se le adicionan hasta un 20 % de carbohidratos que no son de agave (NOM-070-SCFI-1994). Si bien esas son las clasificaciones que les da la normatividad mexicana a los diferentes tipos de mezcal, estas no representan la tradición oaxaqueña. Un ejemplo de ello, es el mezcal añejado, ya que si bien se produce en el estado de Oaxaca, no corresponde a sus costumbres ni al proceso de elaboración del mezcal. Para añejar un mezcal, lo que se hace por tradición es almacenar mezcal en botellas de vidrio que se guardan en lugares cerrados y que se abren al término de dos o más años, y su sabor se suaviza, al tiempo de intensificarse sus características organolépticas.

1.1.2 Agave *potatorum* Zucc. Entre los agaves permitidos por la NOM-070-SCFI-1994 para la elaboración del mezcal, se encuentra el Agave *potatorum* Zucc (Figura 1). Esta especie es muy apreciada por los productores del mezcal por la suavidad de su pulpa, ya que tiene poca fibra y un alto contenido de azúcares, lo que da lugar a un mezcal de un bouquet exquisito. Esta planta se desarrolla sin dificultad en altitudes mayores a los 1,300 m pero menores a los 2,500 m, prefiriendo suelos ricos en materia orgánica.



Figura 1. Planta de *Agave potatorum* Zucc

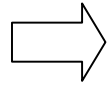
El tiempo que tarda para llegar a la maduración es de siete años, tiempo en que está listo para la producción del mezcal. Cabe señalar que de ésta especie se obtiene el mezcal de mejor sabor.

La roseta es abierta, extendida y simétrica con 50 a 80 hojas, éstas son lanceoladas cortas, sin embargo, varían considerablemente en forma, tamaño y color dependiendo de la localidad. En la mayoría de los casos, son de 9 a 18 cm de ancho y de 25 a 40 cm de alto y de un color verde claro, verde grisáceo o blanco. La inflorescencia puede ser en panícula o en racimo de tres a seis cm de alto (Claridades Agropecuarias, 2000).

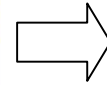
1.1.3 Proceso de elaboración del mezcal. Para la obtención del mezcal aún se continúa utilizando un proceso tradicional, es decir, se siguen usando hornos de tierra, molinos tipo chileno y fermentación natural con microorganismos silvestres en tinas de madera o cuero. Por tal motivo, en muchas ocasiones su calidad puede variar. Éste proceso de elaboración involucra principalmente las siguientes etapas (Figura 2):



Recolección y corte



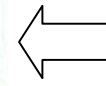
Cocción



Triturado



Destilación y Rectificación



Fermentación

Figura 2. Proceso de elaboración del mezcal

1.1.3.1 Recolección y corte. Para la recolección de la materia prima (agave o maguey) son necesarias ciertas condiciones o características, tales como la coloración verde-amarillenta en la base de las pencas y parda en la base del maguey. Desde el punto de vista bioquímico, el estado de madurez apropiado lo marca un alto contenido de azúcares que puedan ser aprovechados por los microorganismos para la generación de alcohol.

Posteriormente, en el corte o jima de las pencas, la finalidad es eliminar aquellos órganos de la planta (hojas o pencas) que no son útiles para su procesamiento.

1.1.3.2 Cocción. Las piñas son cocidas en hornos de piedra calentadas con vapor, con el objetivo de hidrolizar la inulina en fructosa, monosacárido apropiado para que se lleve a cabo la fermentación.

1.1.3.3 Triturado. Ésta etapa tiene como finalidad hacer que los monosacáridos obtenidos en la cocción estén más disponibles a la acción microbiana, así como a la captación de microorganismos del medio para favorecer la fermentación. El triturado se lleva a cabo generalmente utilizando un molino denominado “molino egipcio”. Éste se conforma de una rueda de aproximadamente 500 kg de peso unida a un eje y que es tirada por un caballo.

1.1.3.4 Fermentación. El jugo de Agave obtenido de las piñas cocidas se fermenta naturalmente con microorganismos nativos de la región y los productores no añaden inóculos de cepas comerciales para iniciar el proceso. En esta etapa los azúcares son transformados a etanol y otros compuestos como alcoholes con tres o más átomos de carbono y ésteres (López y Dufour 2001), compuestos responsables del aroma. En general, las propiedades organolépticas de una bebida alcohólica son determinadas por la composición de una mezcla de alcoholes, ésteres y otros compuestos provenientes de la planta (Minakata *et al.*, 2006).

Es decir la variedad de compuestos organolépticos generados en la fermentación, depende del tipo de microorganismo, de la materia prima y de las condiciones de fermentación.

1.1.3.5 Destilación y Rectificación. Una vez que se ha sido finalizado la etapa de fermentación, se realiza la separación y concentración del etanol y otros productos volátiles. Entre ellos alcoholes superiores, ésteres, ácidos, furanos, cetonas y terpenos, los cuales contribuyen a las características sensoriales propias del mezcal (López, 1999).

La destilación la realizan en ollas de barro o alambiques de cobre de 300 a 350 litros de capacidad, sin control de temperatura. En las ollas se vacía el mosto agotado y una parte de bagazo. La destilación de cada lote de mosto fermentado tarda de 3 a 4 horas. Como producto, se obtienen dos fracciones: la primera parte de la destilación conocida como “cabeza” (30-40° G.L) y la conocida como “colas” (6-30 °G.L). Para obtener el producto final se realiza una segunda destilación denominada “Rectificación”, la cual depende de cada productor. Las colas son destiladas y se fraccionan en dos partes: cabezas de refinado (45-75 °G.L) y las colas de ref inado (6-30 °G.L).

Para lograr el grado alcohólico final, se mezclan las puntas del destilado (cabezas y las colas provenientes de la etapa de la destilación) con las puntas de refinado (cabeza y colas provenientes de la etapa de la rectificación). Si éstas dan un grado alcohólico mayor de 50 °G.L se adicionan colas de refinado para obtener un mezcal entre 45-50 °G.L (Aragón, 1998).

Cabe mencionar que, la etapa de destilación es determinante para que el mezcal obtenga las características sensoriales de aceptación para el consumidor.

1.2 Importancia del estudio

Debido al aumento constante de la exportación del mezcal, también se ha generado un incremento en el ingreso de divisas al estado de Oaxaca. Esto debe conducir a mejorar las condiciones óptimas de operación de cada una de las etapas del proceso de elaboración del mezcal para obtener un producto de calidad, tales como la destilación. Etapa en la cual se deben monitorear los compuestos regulados por la Normatividad Mexicana. Específicamente para los destilados provenientes de *Agave potatorum* Zucc., cuya especie proporciona las mejores características organolépticas, entre ellas el olor y sabor.

1.3 Limitaciones del estudio

En el presente estudio no se realizó la cuantificación del etanol en el mezcal proveniente de *Agave potatorum* Zucc evaluado a diferentes tiempos de la etapa de destilación y rectificación.

2. ANÁLISIS DE FUNDAMENTOS

En el presente capítulo se describen los estudios reportados referentes con el análisis químico de algunos compuestos volátiles en bebidas alcohólicas, tales como el mezcal. Se han realizado estudios sobre las diversas etapas del proceso de elaboración del mezcal, pero los estudios las etapas de destilación y rectificación son escasos o nulos. Consecuentemente, es importante estudiar estas etapas debido a que en ellas se originan compuestos que repercuten sobre la composición de destilado final, así como en sus características organolépticas.

Por lo que, a continuación se presenta la información existente en este tema dentro de la literatura. Para el análisis de las bebidas alcohólicas se han utilizado varias técnicas analíticas, entre ellas se encuentra la cromatografía de gases, técnica que permite identificar y cuantificar las sustancias volátiles presentes en mayor concentración en bebidas alcohólicas destiladas provenientes de Agave.

2.1 Compuestos volátiles en bebidas alcohólicas destiladas provenientes de Agave

El aroma y sabor de las bebidas alcohólicas destiladas son producidos por un gran número de compuestos volátiles y no-volátiles, los cuales forman una mezcla compleja que define estos atributos sensoriales, y consecuentemente la aceptación por el consumidor. Se sabe que ciertos volátiles ejercen un mayor impacto en la percepción del sabor de todas las bebidas destiladas (Vallejo y González, 1999). Estas características se las proporcionan los diferentes grupos funcionales como los aldehídos, alcoholes, ésteres, ácidos, cetonas, furanos, entre otros.

Los aldehídos son compuestos químicos que van a proporcionar aromas a hojas verdes, hierbas o frutas cuando son de cadena corta o tonos amargos desagradables conforme aumenta la longitud de la cadena (Berry y Watson, 1987). Los ésteres contribuyen fuertemente al aroma frutal, principalmente los ésteres de ácidos grasos de cadena corta (Suárez, 2002). Los ácidos orgánicos producen sabores agrios, además los ácidos volátiles imparten aroma. Las cetonas tienen un impacto en el sabor de acuerdo a la longitud de la cadena (Fischer y Scout, 1997). Los furanos son usualmente formados de carbohidratos por la reacción de Maillard, el 5-hidroximetilfurfural tiene un aroma suave a caramelo, heno y tabaco y el furfural tiene un aroma y sabor a caramelo y cereal (Scarpellino y Soukup, 1993).

Por otra parte, los alcoholes y los ésteres en las bebidas alcohólicas son los más importantes cuantitativamente aunque su impacto en el aroma no es el mismo.

2.2 Importancia del proceso de destilación sobre el perfil de compuestos volátiles en bebidas alcohólicas destiladas de Agave

Los compuestos responsables del sabor y aroma de las bebidas alcohólicas son el 1-propanol y el 1-butanol. Estos compuestos son producidos por el tipo de levadura, carbohidratos y aminoácidos, en biosíntesis y catabolismo respectivamente (Nykanen y Suomailainen, 1983; Cacho y López, 1995). De manera similar, otros estudios añaden que los alcoholes superiores tienen un efecto sobre el sabor de las bebidas destiladas.

Por otro lado, la composición química de los destilados en bebidas alcohólicas tales como el tequila y el mezcal contribuye a la aceptación sensorial de los consumidores (Osorio *et al.*, 2005). Por esta razón es necesario realizar un balance en los compuestos del sabor y aroma, entre ellos los alcoholes superiores. Esto se puede realizar a través del monitoreo de las etapas de la destilación y rectificación en muestras de tequila, Prado-Ramírez *et al.*, (2005).

Los compuestos volátiles producidos en esta etapa que confieren el aroma son alcoholes con tres o más carbonos y ésteres de etilo (Peña-Álvarez *et al.*, 1999). En la etapa de la destilación dentro del proceso de elaboración artesanal del mezcal, la definición de los cortes del destilado (cabeza, corazón y cola) se realiza empíricamente. Esto provoca que no se tenga un control sobre el rendimiento del proceso y sobre la calidad de la bebida (Leal *et al.*, 2007).

2.3 Técnicas analíticas para compuestos químicos volátiles

El análisis comprende la identificación y cuantificación de los compuestos volátiles mediante la técnica de cromatografía de gases.

2.3.1 Cromatografía de gases. El reparto o partición de los componentes de la muestra con la fase estacionaria, se basa en sus diferentes solubilidades en esta fase a una temperatura dada. Por lo tanto, los componentes de la mezcla (solutos o analitos) se separan entre sí en base a sus presiones de vapor relativas y de acuerdo a sus afinidades con la fase estacionaria. Este tipo de proceso cromatográfico se denomina elución.

Los principales componentes en un sistema de cromatografía de gases (Figura 3) son: la fuente de gas acarreador, el sistema de inyección, el horno que contiene la columna, el detector y el sistema de registro e integración. La velocidad de flujo del gas acarreador se controla para asegurar tiempos de retención reproducibles y minimizar las variaciones y ruidos en el detector.

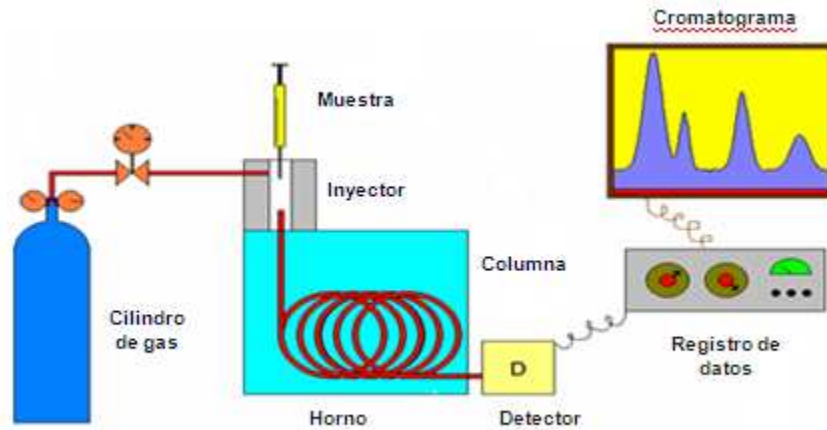


Figura 3. Sistema de cromatografía de gases

La muestra se inyecta (normalmente con una micro jeringa) en el inyector que se encuentra a alta temperatura donde se vaporiza y se transporta a la columna. La cual mide de 15 a 30 m de largo, y está cubierta en la parte interior por una película de un líquido de alto punto de ebullición (la fase estacionaria).

En la columna, la muestra se reparte entre la fase móvil y la estacionaria de modo de que los componentes individuales se separan en base a su solubilidad relativa en la fase líquida y a sus presiones de vapor relativas. Luego de la columna, el gas acarreador y la muestra pasan a través de un detector, donde se mide la cantidad de cada componente y se genera una señal eléctrica. Esta señal se transmite a un sistema de registro e integración, el cual genera un cromatograma que representa un registro del análisis. En la mayor parte de los casos, el sistema integra automáticamente el área de cada pico, realiza los cálculos e imprime un reporte con los resultados cuantitativos y los tiempos de retención.

2.3.2 Método del estándar interno

El método de estándar interno debe su nombre a la forma como se preparan las muestras a ser analizadas. El estándar interno es una sustancia que se añade a todas las muestras y estándares en cantidad conocida. Su adición no debe causar ningún tipo de interferencia en el análisis, y debe proporcionar una señal analítica similar al analito en el análisis pero distinguible del mismo. Además, el estándar interno no debe ser un constituyente de la matriz de estudio.

El método está basado en que cuando las señales del analito y del estándar interno responden proporcionalmente a las fluctuaciones del método y del instrumental empleado, entonces la razón de estas señales es independiente de tales fluctuaciones. De ésta forma el método compensa por errores provenientes de la manipulación de la muestra por analizar (Castillo, 2003).

Una representación de la relación o cociente de respuestas analito/estándar interno, como función de la concentración del analito, da una gráfica de calibración. Posteriormente con la ecuación de la recta $y = m x + b$ obtenida de la curva se sustituyen las variables en ésta y se calculan las concentraciones de la muestra problema.

3. HIPÓTESIS

La concentración de los alcoholes (metanol, 2-butanol, 1-propanol, 2-metil-1-propanol, 1-butanol y 3-metil-1-butanol) en los destilados obtenidos a partir de *Agave potatorum* Zucc varía gradualmente a lo largo de las etapas de la destilación y rectificación del proceso de elaboración del mezcal.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Identificar y cuantificar algunos de los alcoholes en mezcal elaborado artesanalmente proveniente de *Agave potatorum* Zucc, durante las etapas de destilación y rectificación.

4.2 Objetivos específicos

4.2.1 Colectar diferentes fracciones a diferentes tiempos en las etapas de destilación y rectificación del mezcal obtenido artesanalmente a partir de *Agave potatorum* Zucc.

4.2.2 Establecer las condiciones óptimas de operación del Cromatógrafo de gases para la identificación y cuantificación de las soluciones de los estándares (metanol, 2-butanol, 1-propanol, 2-metil-1-propanol, 1-butanol y 3-metil-1-butanol).

4.2.3 Identificar y cuantificar los alcoholes (metanol, 2-butanol, 1-propanol, 2-metil-1-propanol, 1-butanol y 3-metil-1-butanol) en las etapas de destilación y rectificación del mezcal obtenido a partir de *Agave potatorum* Zucc mediante la cromatografía de gases.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

En la presente sección se detalla la parte experimental (Figura 4), la cual comprende la obtención de los destilados y la evaluación de las etapas de destilación y rectificación del proceso de elaboración del mezcal. Cabe señalar, que las condiciones de destilación y rectificación fueron establecidas por el productor. En la Figura 4, se describe la identificación y cuantificación de algunos de los alcoholes analizados mediante cromatografía de gases, en muestras de destilados provenientes de *Agave potatorum* Zucc. Además se realizaron las cinéticas en la etapa de destilación y rectificación colectando las muestras cada diez y quince minutos respectivamente.

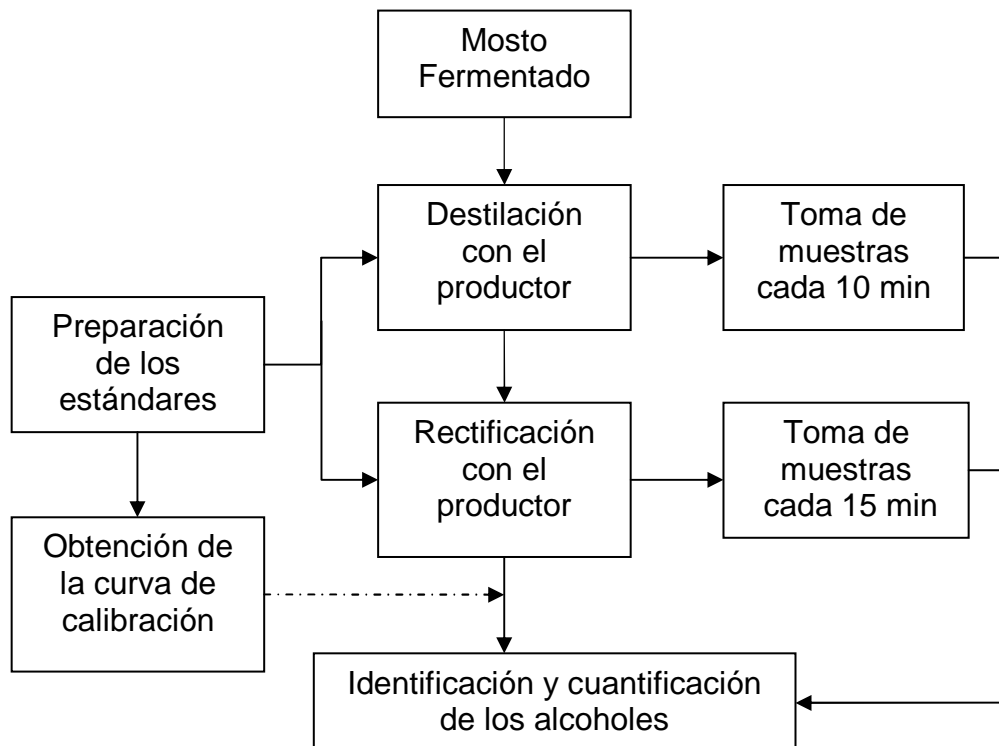


Figura 4. Plan de trabajo general

5.1 Materia prima

Los destilados de mezcal elaborados a partir de *Agave potatorum* Zucc, obtenidos en base a los tiempos de corte del Sr. Rogelio García (productor) de la Comunidad de Santa María Albarradas, Oaxaca, México, durante los meses de Agosto y Septiembre del 2007.

5.2 Equipo

Cromatógrafo de gases marca Perkin Elmer series Autosystem XL, usando Helio como gas acarreador y un detector de ionización de flama (FID).

5.3 Metodología

Todos los reactivos usados fueron marca Sigma Aldrich tipo grado GC con 99% de pureza.

5.3.1 Obtención de la muestra

Para la obtención de las muestras de la destilación y rectificación de mezcal proveniente de *Agave potatorum* Zucc, se visitó a un productor de la comunidad de Santa María Albarradas, Oaxaca. Las muestras se guardaron en frascos ámbar a 4 °C hasta su posterior análisis que no excedió 30 días. Durante la destilación se colectaron 30 mL de destilado cada 10 min y en la rectificación cada 15 min.

5.3.2 Determinación de alcoholes y metanol en mezcal por Cromatografía de Gases

Los alcoholes mencionados y metanol fueron cuantificados de acuerdo al método que propone la Normatividad Mexicana NOM-006-SCFI-1994.

5.3.2.1 Estándar interno. En un matraz aforado de 100 mL se adicionaron 495 µL de 2-pentanol aforándolo con etanol al 40 %, para obtener una solución de 2-Pentanol al 0.495 %. Todas las operaciones se realizaron a una temperatura de 20 °C.

5.3.2.2 Preparación de las soluciones patrón. Para la preparación de los componentes indicados en la (Tabla 1), se adicionaron a seis matraces la concentración correspondiente a cada uno de ellos y se aforaron con alcohol etílico al 40%.

5.3.2.3 Curva de calibración. A diez matraces aforados de 100 mL se adicionaron los mililitros correspondientes de cada uno de las soluciones patrón (Tabla 2), posteriormente se agregaron 5 mL de estándar interno, a cada matraz y se aforaron con alcohol etílico al 40%. Se tomó 1 μ L de cada dilución y se inyectó en el cromatógrafo de gases por triplicado.

5.3.2.4 Preparación de la muestra. Para el análisis de las muestras, en un matraz aforado de 100 mL se agregaron 5 mL de estándar interno (2-Pentanol al 0.025%) realizando el aforo con la muestra de mezcal. Se tomó 1 μ L de la muestra preparada y se inyectó en el cromatógrafo de gases por triplicado. La preparación e inyección de la muestra se hizo a una temperatura de 20°C. Los resultados se reportan en mg/L.

Tabla 1. Concentración de las soluciones patrón de los alcoholes analizados.

Número de matraz	Componente	Concentración (g/100 mL)
1	metanol	1.2
2	2-butanol	0.2
3	1-propanol	0.6
4	2-metil-1-propanol	0.6
5	1-butanol	0.2
6	3-metil-1-butanol	0.6

Tabla 2. Diluciones de la solución patrón concentrada para la curva de calibración

Matraz	mL	Componente (mg/L)					
		metanol	2-butanol	1-propanol	2-metil-1-propanol	1-butanol	3-metil-1-butanol
1	1	12	2	6	6	2	6
2	2	24	4	12	12	4	12
3	3	36	6	18	18	6	18
4	4	48	8	24	24	8	24
5	5	60	10	30	30	10	30
6	6	72	12	36	36	12	36
7	7	84	14	42	42	14	42
8	8	96	16	48	48	16	48
9	9	108	18	54	54	18	54
10	10	120	20	60	60	20	60

5.3.2.5 Condiciones de operación del cromatógrafo de gases

Para el análisis de compuestos mayoritarios, se inyectó 1 μL de muestra en un cromatógrafo de gases marca Perkin Elmer series Autosystem XL, equipado con una columna INNOWAX (30 m x 0.25 mm de diámetro interno x 0.25 μm), siendo el gas acarreador Helio (ultra alta pureza 99.999% min.) con un flujo de 1 mL/min y un Split 50:1. Las purezas de los gases Hidrógeno y Aire fueron de ultra alta pureza (99.999% min.). Las condiciones de operación fueron las siguientes: 40 °C (sostenida 3 min) con un incremento de temperatura de 3 °C/min hasta 120 °C/min, el cual se incrementó 6 °C/min hasta 200 °C/min (sostenida 20 min). Se utilizó un detector de Ionización de Flama (FID) y las temperaturas del inyector y del detector fueron de 180 °C y 230 °C, respectivamente.

5.3.2.6 Cuantificación de los alcoholes de estudio

En base a las ecuaciones para cada uno de los analitos se realizó una curva de calibración obteniéndose las ecuaciones del tipo $y = m x + b$, donde:

y = relación de áreas = área del Compuesto de interés/área del estándar

m = pendiente de la recta

x = concentración del compuesto/concentración del estándar

b = ordenada al origen

Quedando de la siguiente forma:

$$y = \frac{\text{Área del Compuesto}}{\text{Área del Estándar}} = m \left(\frac{\text{Conc. del Compuesto}}{\text{Conc. del Estándar}} \right) + b$$

De esta ecuación la variable deseada es la Concentración del compuesto para así determinar la concentración de cada uno de los compuestos de interés, por lo tanto:

$$\text{Conc. del Compuesto} = \frac{\left(\frac{\text{Área del Compuesto}}{\text{Área del Estándar}} - b \right) (\text{Conc. del Estándar})}{m}$$

Posteriormente se inyecta la muestra y se relacionan las áreas obtenidas con la ecuación anterior.

5.3.2.7 Cinéticas de los alcoholes de estudio

De los resultados obtenidos de las muestras de la destilación y la rectificación del mezcal se elaboraron gráficas donde se registraron los tiempos de corte contra la concentración de los componentes volátiles detectados de ambas etapas.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Proceso de destilación artesanal del mezcal obtenido de *Agave potatorum* Zucc por el productor en Santa María Albarradas

El proceso de destilación y rectificación (Figura 5) del mezcal consta de cinco etapas, las cuales se describen a continuación.

- i) separación de los compuestos volátiles del caldo de fermentación,
- ii) condensación,
- iii) obtención de las fracciones de la destilación,
- iv) rectificación y
- v) acondicionamiento de los grados alcohólicos.

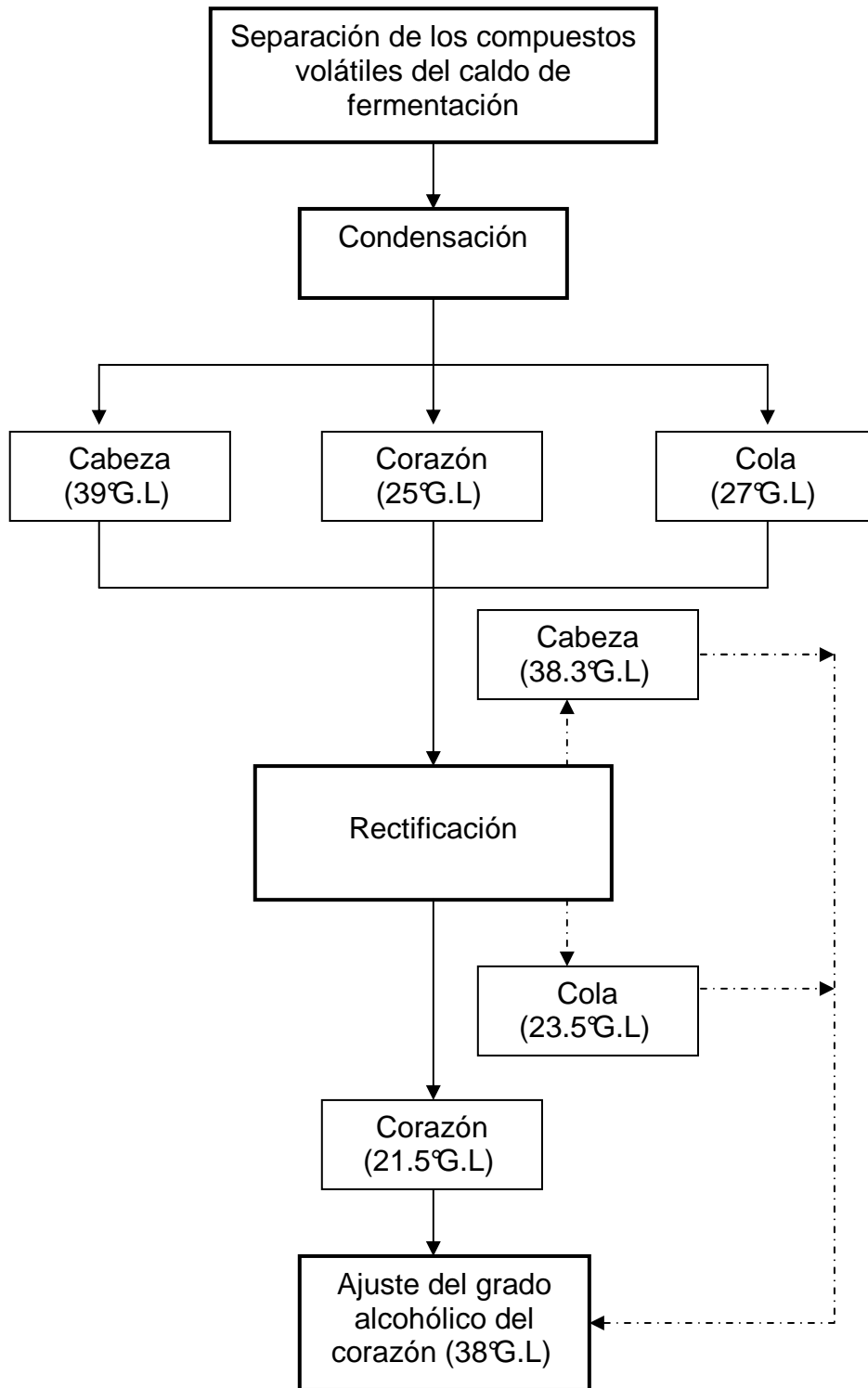


Figura 5. Método de la destilación y rectificación del mosto fermentado de *Agave potatorum* Zucc realizado por el productor.

i) Separación de los compuestos volátiles del caldo de fermentación. Para la evaporación de los compuestos volátiles obtenidos en la fermentación, se emplea un alambique de cobre (Figura 6), de aprox. 220 litros de capacidad y no hay agitación. El alambique se calienta con leña, y esto ocasiona como desventaja la falta de control sobre la temperatura. Además, el sistema se sella con lodo.



Figura 6. Equipo de destilación artesanal utilizado por el productor

ii) Condensación. Una vez evaporados los compuestos volátiles, se hacen pasar a través de un serpentín inmerso en agua, en donde el líquido de condensación no se recircula por lo que la condensación no se realiza de forma adecuada.

iii) Obtención de las fracciones de la destilación.

Para separar cada una de las fracciones obtenidas en la destilación, el productor realizó una prueba del sabor, de tal manera que cuando percibía un sabor dulce establecía el tiempo de corte de la cabeza, separando esta fracción, para comenzar a coleccionar el corazón. Nuevamente, al cabo de cierto tiempo, degustaba el destilado, y consideraba que la colecta del corazón había finalizado cuando percibía un sabor amargo. Estableciendo la fracción correspondiente de la cabeza de los 0 a 40 min (39°G.L), corazón de los 40 a 120 min (25°G.L) y la cola de los 120 a 150 min (27°G.L). Almacena éstas partes en tres tambos de fierro los cuales no son lavados entre lote y lote. Posteriormente toma un volumen de cada uno de los tambos para someterlos a su rectificación.

iv) Rectificación. Los volúmenes obtenidos en la etapa de la destilación fueron sometidos a una rectificación, separando cada una de las fracciones obtenidas en base al mismo criterio de tiempo de corte mencionado en iii). Los tiempos de corte de la rectificación fueron los siguientes: Cabeza de la Rectificación (Ca-R) de los 0 a los 30 min (38.3 °G.L), Corazón de la Rectificación (Co-R) de los 30 a los 90 min (21.5°G.L) y la Cola de la Rectificación (C-R) de los 90 a los 120 min (23.5°G.L). De éstas partes se selecciono el corazón y se ajustó el grado alcohólico con las fracciones restantes de la rectificación (Ca-R y C-R) para así obtener un mezcal cuyo grado alcohólico es de 38°G. L.

v) Acondicionamiento de los grados alcohólicos. Los grados alcohólicos finales fueron establecidos mediante una prueba empírica denominada “prueba de la burbuja” (Figura 7). Para llevar a cabo esta prueba se toma un pedazo de carrizo, se le realizó un orificio con la finalidad de simular un popote de aproximadamente 15 cm. de largo. Posteriormente se colocó un volumen de aproximadamente 200 mL de mezcal en una bandeja y sumergió el carrizo, soplando a través de éste. Cuando se forma burbuja es indicativo que el mezcal tiene 38°G.L requeridos para la comercialización. Además, de la prueba de la burbuja el productor toma en cuenta otro parámetro que es el sabor para determinar el grado alcohólico. Este parámetro consiste en que el productor degusta el destilado final y si percibe un sabor dulce establece que se ha llegado el grado alcohólico deseado (38°G.L).



Figura 8. Ajuste del grado alcohólico por parte del productor

6.2 Identificación y cuantificación de los alcoholes de la destilación y rectificación del mezcal

La identificación y cuantificación de los compuestos volátiles de la destilación y rectificación se llevó a cabo mediante el uso de estándares cromatográficos (metanol, 2-butanol, 1-propanol, 2-metil-1-propanol, 1-butanol y 3-metil-1-butanol) y de un estándar interno (2-Pentanol).

6.2.1 Identificación de los alcoholes de la destilación y rectificación del mezcal

La identificación de los compuestos volátiles, se realizó en base a los tiempos de retención de cada uno de los estándares cromatográficos utilizados.

En la tabla 3 se muestran los tiempos de retención correspondientes a los estándares empleados para la identificación de los alcoholes analizados en el mezcal elaborado artesanalmente.

Tabla 3. Tiempos de retención promedio (minutos) encontrados de las soluciones patrón y de las muestras

Compuesto	t_{RE}	t_{RM}
metanol	4.18	4.14
2-butanol	7.18	7.19
1-propanol	7.64	7.67
2-metil-1-propanol	10.90	10.00
2-pentanol (estándar interno)	11.92	11.15
butanol	12.74	12.10
3-metil-1-butanol	14.53	14.60

Nota: t_{RE} : tiempo de retención del estándar; t_{RM} : tiempo de retención de la muestra

En las Figuras 8 y 9 se pueden observar los cromatogramas representativos visualmente de los estándares y muestras respectivamente.

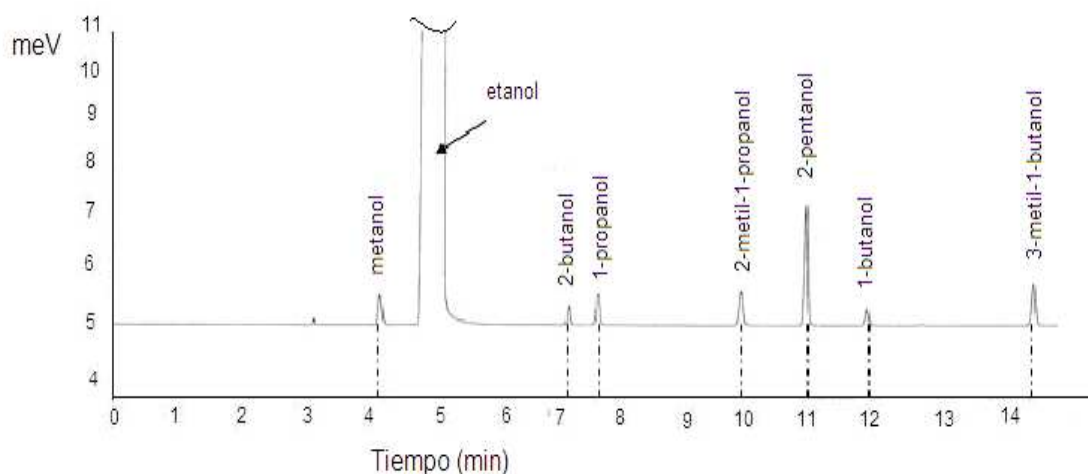


Figura 8. Cromatograma representativo de los estándares

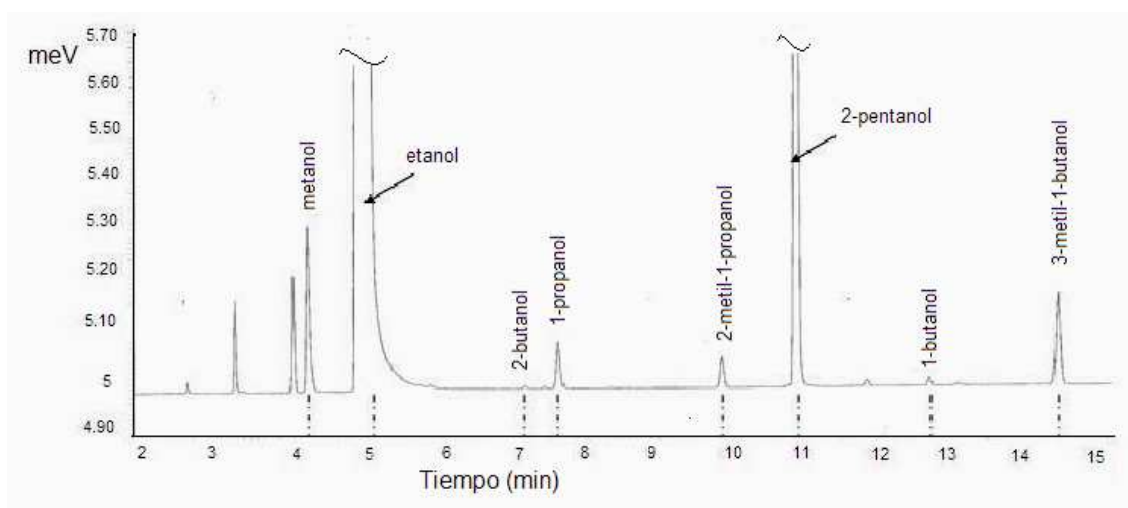


Figura 9. Cromatograma representativo obtenido de la etapa de rectificación a los 90 minutos.

Vera-Guzmán (2004), en un estudio realizado para conocer la composición de los compuestos del mezcal en *Agave angustifolia* Haw, reporta el mismo orden de salida de los compuestos como los mostrados en la Tabla 3. Este comportamiento coincide con lo reportado por López y Dufour (2001), en un análisis realizado en el tequila blanco, reposado y añejo para conocer la composición volátil del tequila obtenido a partir de *Agave weber* var. Azul.

6.2.2 Cuantificación de los alcoholes de la destilación y rectificación del mezcal

El estándar interno (2-pentanol), permitió realizar la cuantificación de los alcoholes mencionados. Debido a que éste compuesto no se encuentra en la muestra, su señal fue reproducible y proporcional a la de los demás compuestos. Además, es de naturaleza similar a los alcoholes analizados. A continuación se presentan las concentraciones de los compuestos durante la destilación y rectificación usando las ecuaciones obtenidas de la curva de calibración (Anexo 1) y con las áreas y concentraciones obtenidas (Anexo 2).

Tabla 4. Concentración de alcoholes durante la destilación

TC (min)	Alcoholes (mg/L)					
	metanol	2-butanol	1-propanol	2-metil-1-propanol	1-butanol	3-metil-1-butanol
0	551.58	67.19	429.22	566.51	158.07	1533.74
10	492.65	59.33	378.43	457.46	153.13	1206.15
30	344.09	46.26	316.24	610.36	144.77	584.32
40	460.18	43.77	288.06	240.87	143.34	558.91
50	376.47	41.15	254.75	202.68	140.54	236.75
60	305.19	87.07	252.42	164.17	137.40	260.12
70	176.76	57.66	189.78	137.07	135.23	257.81
80	198.09	76.11	185.69	133.01	135.14	247.19
90	119.97	91.68	158.90	124.24	133.94	216.91
100	112.34	82.26	161.17	105.96	135.57	188.15
110	92.67	34.58	161.82	105.96	150.02	176.05
120	43.52	34.58	160.74	105.96	144.38	173.99
130	36.75	34.58	161.18	105.96	141.04	172.21
140	5.43	34.58	148.37	105.96	139.75	172.41
150	5.38	34.58	147.16	105.96	139.86	172.51

Nota: TC: tiempo de colecta.

Tabla 5. Concentración de alcoholes durante la rectificación

TC (min)	Alcoholes (mg/L)					
	metanol	2-butanol	1-propanol	2-metil-1-propanol	1-butanol	3-metil-1-butanol
0	3913.81	1036.00	1144.43	1250.75	228.41	3923.01
15	2733.03	34.58	906.76	862.13	132.16	2381.83
30	1586.25	34.58	139.50	455.17	132.16	1170.26
45	708.08	34.58	139.50	247.76	132.16	518.75
60	673.04	34.58	139.50	226.34	132.16	404.94
75	599.26	34.58	139.50	203.63	132.16	326.86
90	649.43	34.58	139.50	193.47	132.16	277.12
120	501.01	34.58	139.50	105.96	132.16	196.81

Nota: TC: tiempo de colecta.

En la tabla 6 se muestran las concentraciones inicial y final y la eficiencia de las etapas de destilación y rectificación.

Tabla 6. Concentración inicial y final de los alcoholes de la destilación y rectificación

Compuesto	Destilación (mg/L)			Rectificación (mg/L)		
	Inicio	Final	Eficiencia (%)	Inicio	Final	Eficiencia (%)
metanol	551.58	5.38	99.02	3913.81	501.01	87.20
2-butanol	67.19	34.58	48.54	1036.00	34.58	96.66
1-propanol	429.22	147.16	65.72	1144.43	139.50	87.81
2-metil-1-propanol	566.51	105.96	81.30	1250.75	105.96	91.53
1-butanol	158.07	139.86	11.52	228.41	132.16	42.14
3-metil-1-butanol	1533.74	172.51	88.75	3923.01	196.81	94.98

Una vez identificados y cuantificados el metanol y los demás alcoholes, se graficó el tiempo contra la concentración para la etapa de la destilación y de la rectificación (Figuras 10 y 11). En tales gráficas se muestran los tiempos de corte establecidos por el productor y el tiempo al cual se observa un decremento la concentración de los alcoholes cuantificados (tiempo de corte sugerido).

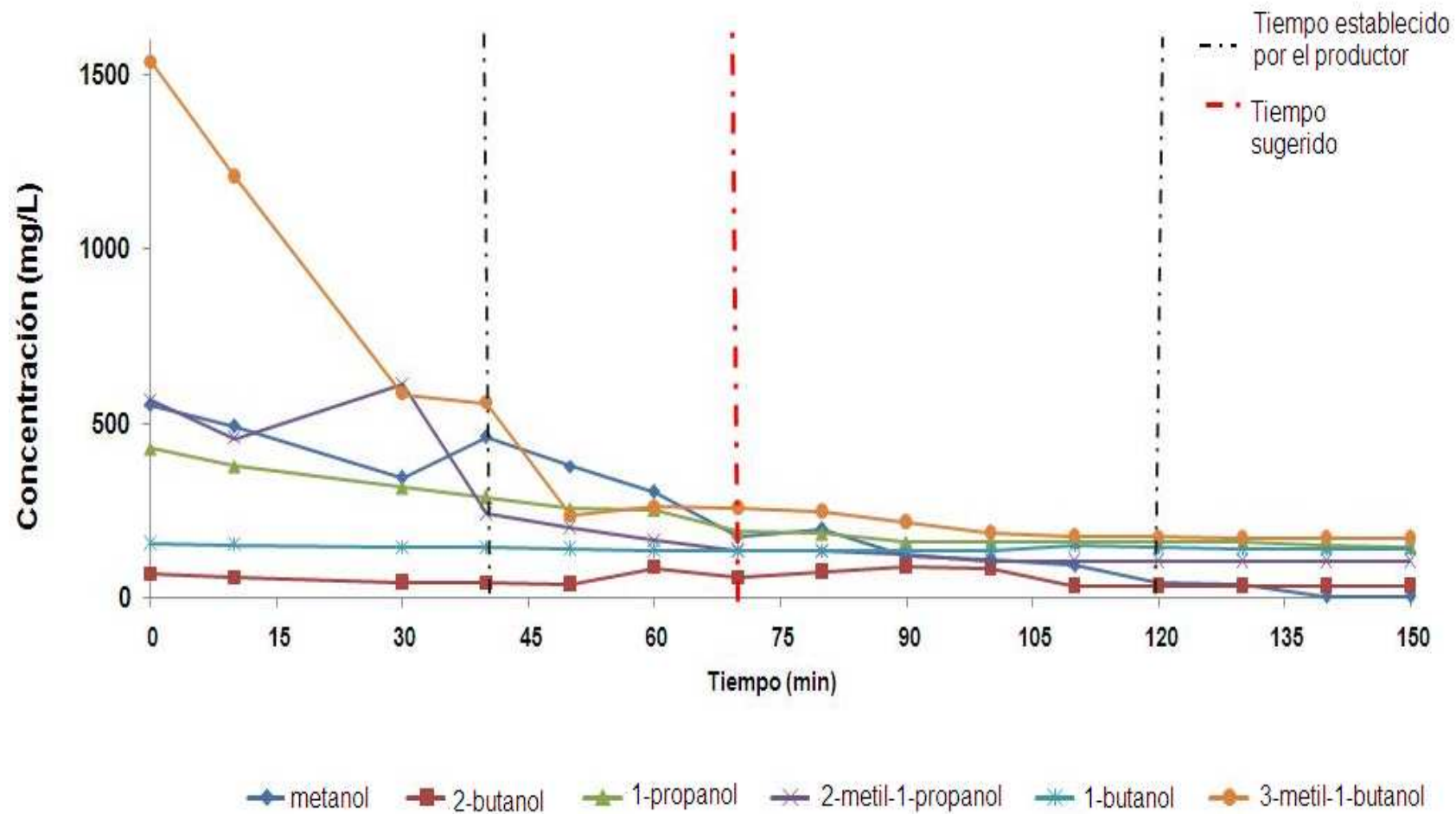


Figura 10. Cinética de la concentración de algunos alcoholes durante la destilación artesanal de *Agave potatorum* Zucc

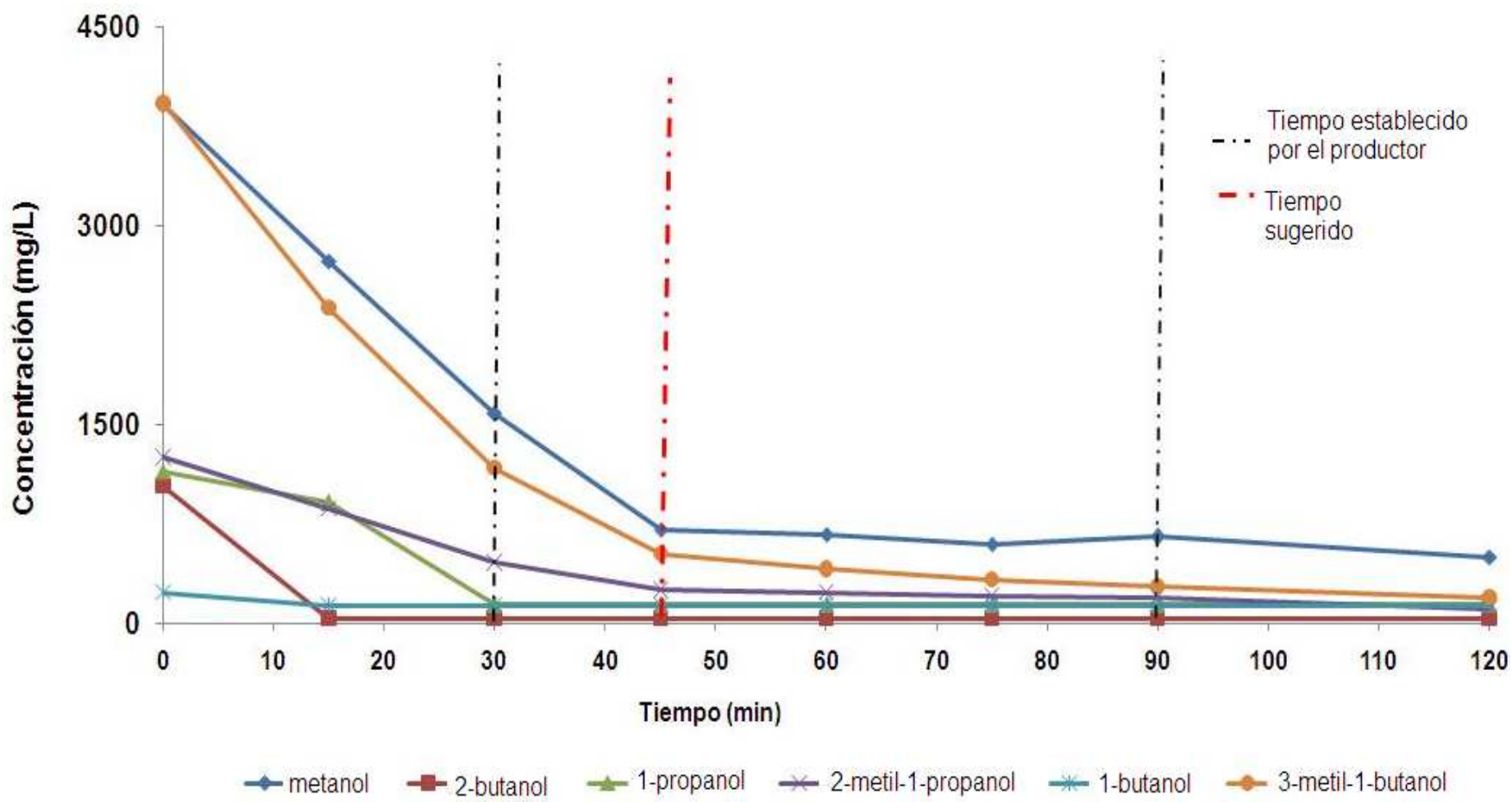


Figura 11. Cinética de la concentración de algunos alcoholes durante la rectificación artesanal de *Agave potatorum* Zucc

6.3 Análisis del comportamiento de los alcoholes en la destilación y rectificación del mezcal

El metanol se produce a partir de la demetilación de pectinas presentes en el Agave. Diversos estudios indican que las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* tienen enzimas con actividad de metil esterasa como la fosfatasa carboximetilesterasa (Wei *et al.*, 2001), cuya actividad posiblemente se ve favorecida durante la fermentación, hidrolizando las pectinas presentes en el mosto de Agave. Además, la intoxicación por ingesta de éste compuesto es peligrosa debido a su oxidación a metanal (formaldehído) y ácido fórmico los cuales ocasionan lentamente la pérdida de la vista hasta la muerte (Guías para el manejo de Urgencias Toxicológicas).

Como se observa en las Figuras 10 y 11, el metanol se encontró a lo largo de la destilación y rectificación, esto coincide con estudios realizados en tequila, donde reportan la presencia del metanol a lo largo de la destilación y rectificación (Prado-Ramírez *et al.*, 2005). Si bien en el presente estudio se esperaba que por su bajo punto de ebullición (P.e 64.5 °C), el metanol se comportará como un producto de las cabezas y colas, su presencia durante esta etapa puede ser debido a que el metanol es un compuesto orgánico muy polar y altamente soluble en agua. Además, cabe recordar, que no se tiene un control de la temperatura del alambique de destilación (Vera-Guzmán, 2004).

La concentración inicial y final del metanol en la destilación (Figura 10), fue de 551.6 y 5.4 mg/L respectivamente, por lo que la cantidad de metanol destilada fue del 99%, mientras que en la rectificación las concentraciones fueron de 3913.8 y de 501 mg/L con una eficiencia de separación de éste compuesto del 87%.

En la Figura 11, se observa que durante la rectificación en todos los casos se observó un aumento en la concentración inicial de los analitos. Lo cual puede deberse a que los productores someten las fracciones obtenidas de la destilación (cabeza, corazón y cola) a la rectificación, aunado a un inadecuado almacenamiento, ya que los recipientes no son lavados entre lote y lote.

La presencia del 1-propanol (P.e 97.8 °C), es un indicador de una posible contaminación bacteriana debido a condiciones inadecuadas de almacenamiento de la materia prima antes de su procesamiento (Apostolopoulou *et al.*, 2005). En la etapa de la destilación (Figura 10), la concentración inicial del metanol fue de 429 mg/L y en la rectificación de 3914 mg/L (Figura 11), por lo que la eficiencia de separación de éste alcohol en ambas etapas fue del 66 y 88 % respectivamente. Mostrando una disminución apreciable de su concentración a los 70 minutos transcurridos de la destilación mientras que en la etapa de la rectificación esta disminución se presenta a los 30 minutos.

El 1-butanol (P.e 117°C) y 2-butanol (P.e 99.5°C) son otros de los compuestos de la fermentación alcohólica y característicos de la autenticidad de las bebidas destiladas. Estos compuestos pueden provenir a partir del ácido acetoacético generado por una contaminación de la fermentación con bacterias butíricas (*Clostridium butyricum*) (Ingledew, 1988). Ambos, a lo largo de la destilación (Figura 10), permanecieron casi constantes, mientras que en la rectificación (Figura 11), presentaron una concentración constante después de los 15 minutos. La eficiencia de separación de éstos compuestos fue del 42 y 97% respectivamente. El comportamiento del 2-butanol es producto del calentamiento poco controlado del destilador artesanal, lo cual también ha sido reportado en la destilación de *Agave cocuy* (Leal *et al.*, 2007).

Dentro de los alcoholes isoamílicos, se encuentran el 2-metil-1-propanol (P.e 107.3 °C) y el 3-metil-1-butanol (P.e 131 °C), que pueden ser sintetizados por la descarboxilación y reducción del ácido cetoisovalérico, ácido cetoisocaproico y ácido fenilpirúvico intermediarios en la biosíntesis de valina, leucina y fenil alanina, respectivamente. Los cuales pudieron generarse durante el cocimiento de las piñas de acuerdo a lo reportado en exudados de *Agave tequilana* Weber (Hough *et al.*, 1991; Mancilla y López, 2002).

Los compuestos más abundantes al inicio de la rectificación y que presentan una disminución drástica a lo largo de esa etapa de la rectificación (Figura 11), son el metanol y el 3-metil-1butanol con una eficiencia de separación del 87 y 95% respectivamente.

Como se puede observar en las Figuras 10 y 11, el metanol, 2-metil-1-propanol y 3-metil-1-butanol, presentaron variaciones en concentración, lo cual puede atribuirse a la influencia del cobre del alambique de destilación y por el escaso control del calor suministrado al alambique (Prado-Ramírez *et al.*, 2005).

Los resultados anteriores, están en concordancia con los reportados por González-Hernández (2006), quienes señalaron que al no tener un control sobre la temperatura, se produce una variación en el sabor y el contenido de compuestos volátiles del mezcal.

Respecto a los tiempos de corte establecidos por el productor (Figuras 10 y 11), para la destilación y rectificación, los tiempos sugeridos están dados en base a la disminución de la concentración presentada por los alcoholes a lo largo de éstas etapas.

En la etapa de la destilación el productor establece que los cortes para empezar la colecta de las fracciones: cabeza, corazón y cola, corresponden a los 40 y 120 minutos, y en base a los resultados obtenidos, el tiempo en el cual se debe coleccionar la fracción del cabeza es de los 0 a los 70 minutos y la fracción del corazón corresponde al resto de la destilación, de los 80 a 150 minutos. Mientras que en la etapa de rectificación, el productor establece que los tiempos de corte corresponden a los 30 y 90 minutos para obtener las tres fracciones antes mencionadas; sin embargo, en este estudio, el tiempo sugerido de corte es a los 45 minutos para dividir las fracciones de cabeza y corazón.

Además, no se sugiere la colecta de la cola, puesto que ésta fracción no es sustentable debido a que a partir de los 70 minutos en la etapa de la destilación y de los 45 minutos en la rectificación la concentración de los alcoholes permanece casi constante.

Como ya se mencionó, los tiempos sugeridos están dados en base la disminución que presentaron los alcoholes cuantificados y dado que no se cuantificó el etanol no se puede establecer un tiempo de corte para estas etapas.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo, se recomienda que no se colecte la fracción llamada cola. Debido a que las concentraciones de la mayoría de los alcoholes al final de la rectificación son prácticamente iguales a las concentraciones iniciales en la etapa de la destilación.

7. CONCLUSIONES

- La implementación de los siguientes parámetros de operación: 40 °C sostenida 3 min con un incremento de temperatura de 3 °C/min hasta 120 °C/min y 6 °C/min hasta 200 °C/min sostenida 20 min), el uso de una columna INNOWAX (30 m x 0.25 mm de diámetro interno x 0.25 µm, siendo el gas acarreador Helio con un flujo de 1 mL/min y un Split 50:1 y una temperatura del inyector 180 °C y del detector de 230 °C, permitieron una buena separación e identificación de los alcoholes analizados en destilados de mezcal obtenidos a partir de *Agave potatorum* Zucc.
- El uso de 2-pentanol como estándar interno fue adecuado para llevar a cabo la cuantificación de los alcoholes ensayados.
- El tiempo en el que se debe empezar a coleccionar las fracciones de los destilados cambia a los establecidos por el productor, debido a que el fracciona a los 40 y 120 minutos en la destilación y en la rectificación a los 30 y 90 minutos, mientras que los tiempos sugeridos son a los 70 minutos en la destilación y a los 45 minutos en la rectificación.
- La mezcla de las fracciones obtenidas en la destilación para someterlas a la rectificación afecta la concentración inicial de los compuestos volátiles en la etapa de la rectificación.

- En la etapa de la destilación, se recomienda hacer el corte de la cabeza a los 75 minutos transcurridos de ésta etapa y la fracción restante es la que se debe considerar como la fracción del corazón.
- Debido al comportamiento de los alcoholes analizados (metanol, 2-butanol, 1-propanol, 2-metil-1-propanol, 1-butanol y 3-metil-1-butanol), durante la etapa de la rectificación, no se sustenta ésta etapa ya que no se realizó la cuantificación del etanol.

8. PERSPECTIVAS

- Durante la colecta se sugiere tomar la temperatura del alambique de destilación, para así poder conocer las condiciones bajo las cuales se lleva a cabo la destilación de los alcoholes analizados.
- Colectar un mayor volumen de muestra, lo cual permitiría medir el grado alcohólico de cada una de las muestras tomadas durante la colecta y comparar la concentración de los compuestos superiores con lo que señala la normatividad mexicana para el mezcal.
- Implementar buenas prácticas de manufactura en las etapas de destilación y rectificación del proceso de elaboración del mezcal.
- Realizar un estudio de la cinética del etanol para corroborar el empobrecimiento de éste compuesto en el alambique, ya que la cuantificación de éste es un parámetro de calidad del mezcal.
- Identificar los componentes minoritarios distintivos para cada mezcal mediante el uso de la técnica de microextracción en fase sólida, lo cual permitirá realizar pruebas de autenticidad y diferenciación de las bebidas alcohólicas obtenidas a partir de Agave.

9. LITERATURA CITADA

Apostolopoulou, A.A.; Flouros, A.I.; Demertzis, P.G. & Akrida-Demertzi, K., **2005**, Differences in concentration of principal volatile constituents in traditional greek distillates. *Food Control*. 16, 157-164.

Aragón, M.O., **1998**, Determinación de la composición y propiedades de los mezcales de palenque de los distritos de Tlacolula y Yautepéc, Oaxaca. Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico de Oaxaca.

Berry, D.R. y Watson, D.C., **1987**, Production of organoleptic compounds. yeast biotechnology. *Allen & Unwen*, 345-364.

Cacho y López, **1995**, Alcoholic beverages. *Food and nutritional analysis*. University of Zaragoza, Spain, 285.

Castillo Jorge, **2003**, Laboratorio de análisis instrumental. Área de química organometálica. Universidad de Texas.

Claridades Agropecuarias, **2000**, Un horizonte ASERCA del mercado agropecuario. Secretaría de agricultura, ganadería y desarrollo rural.

Fischer, C. y Scout, T., **1997**, Food flavors. *Biology and chemistry*. The royal society of chemistry, USA, 15-55.

González-Hernández, L.; Barba de la Rosa, A.; Escalante-Minakata P.; León-Rodríguez, A., **2006**, Mezcal, una mezcla natural de alcoholes y feromonas. *Tecnología Alfa editores técnicos*, 10.

Guías para el manejo de Urgencias Toxicológicas, grupo de atención de emergencias y desastres. Capítulo 5: Alcohol metílico. Coordinación del Centro de Información y Asesoría Toxicológica CIATOX. Universidad Nacional de Colombia.

Hough, J.S.; Briggs, D.E.; Stevens, R.; Young, T.W., **1991**, Metabolism of wort by yeast. Malting and brewing science. Hopped wort and beer, Chapman and Hall, Vol. II, London, U.K, 566-614.

Ingledeu, **1988**, Biochemistry of yeast. Alltech eight anual alcohol school, 245-248.

Leal, G.; Miquilena, G.R.; Guillén, M.H., **2007**, Evaluación del proceso de destilación del cocuy de pecaya a partir de la composición de los volátiles mayoritarios. Centro de investigaciones en ciencias básicas y departamento de química de la Universidad Nacional Experimental "Francisco de Miranda", Coro, Venezuela.

López, M.G., **1999**, Tequila Aroma. Flavor chemistry of ethnic foods. Shahidi and Ho Kluwer. Academic olenum publishers, New York.

López, M.G. y Dufour, J.P., **2001**, Tequilas: Charm analysis of blanco, reposado and añejo tequilas in cromatography-olfactometry. American Chemical Society, Washington, 60-72.

Mancilla-Margalli, N. y López M. G., **2002**, Generation of Maillard compounds from inulin during the thermal processing of *Agave tequilana* Weber Var. azul. Journal Agriculture Food Chemistry, 50, 806-811.

Minakata, E.P.; Hernández, G.L.; Barba de la Rosa, A.; León Rodríguez, A., **2006**, Characterization of volatile compounds of mezcal, an ethnic alcoholic beverage obtained from *Agave salmiana*. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 54, 1337-1341.

Norma Oficial Mexicana 070-SCFI., **1994**, Bebidas alcohólicas, Mezcal-especificaciones. Secretaria de Comercio y Fomento Industrial.

Norma Oficial Mexicana 006-SCFI., **1994**, Bebidas alcohólicas, Tequila-Especificaciones. Secretaría de Comercio y Fomento Industrial.

Nykanen, L. y Suomailainen, H., **1983**, Aroma of beer, wine and distilled alcoholic beverages. Berlin, Springer, 424.

Osorio, D.; Pérez-Correa, R.; Biegler, L.; Agosin E., **2005**, Wine distillates: Practical Operating Recipe Formulation for Stills. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 53, 6326-6331.

Prado-Ramírez, R.; Victor, Gonzáles-Álvarez, V.; Pelayo-Ortiz, C.; Casillas, N.; Estarrón, M.; Gómez-Hernández, E., **2005**, Volatyl compounds during thermal process. *International Journal of Food Science & Technology*, Volume 40, Number 7, pp. 701-708(8).

Peña-Álvarez, A.; Díaz, L.; Medina, A.; Labastida, C.; Capella, S.; Vera, L. E., **1999**, Characterization of three Agave species by gas chromatography and solid-phase-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal Chromatography Agriculture*, 1027, 131-136.

Scarpellino, R. y Soukup, R.J., **1993**, Key flavors from heat reactions of food ingredients. *Flavor Science*, 309-333.

Suárez, L.J., **2002**, Impacto de las levaduras y bacterias en los aromas vínicos fermentativos. Análisis sensorial, Universidad Rovira de España, 523.

Vallejo, C. y González, C., **1999**, Identificación de los compuestos volátiles del tequila. *Bebidas mexicanas*, 8(4), 1-17.

Vera-Guzmán, A.M., **2004**, Principales compuestos volátiles del mezcal de *Agave angustifolia* Haw y *Agave potatorum* Zucc del estado de Oaxaca. Tesis de Maestría en Ingeniería Bioquímica.

Wei, H.; Ashby, D.G.; Moreno, C.S.; Ogris, E.; Yeong, F.M.; Carbett, A.H.; Pallas, D.C., **2001**, Carboxymethylation of the PP2A catalytic subunit in *Saccharomyces cerevisiae* is required for efficient interaction with the B-type subunits Cdc55p and Rts1p. *Journal of Biological Chemistry*, 1570–1577.

ANEXO 1

Preparación de la curva de Calibración

Para construir la curva de calibración se prepararon diez soluciones de los compuestos de la (Tabla 1) y se realizaron diluciones (Tabla 2), posteriormente se inyectaron cada una de las disoluciones (diez) al cromatógrafo de gases, el cual permitió identificar a cada uno de los compuestos que integran a las disoluciones y obtener las gráficas así como la ecuación de cada una de ellas.

Las gráficas están compuestas de la concentración (ppm) de cada uno de las soluciones patrón (eje x) y de la relación de áreas (eje y).

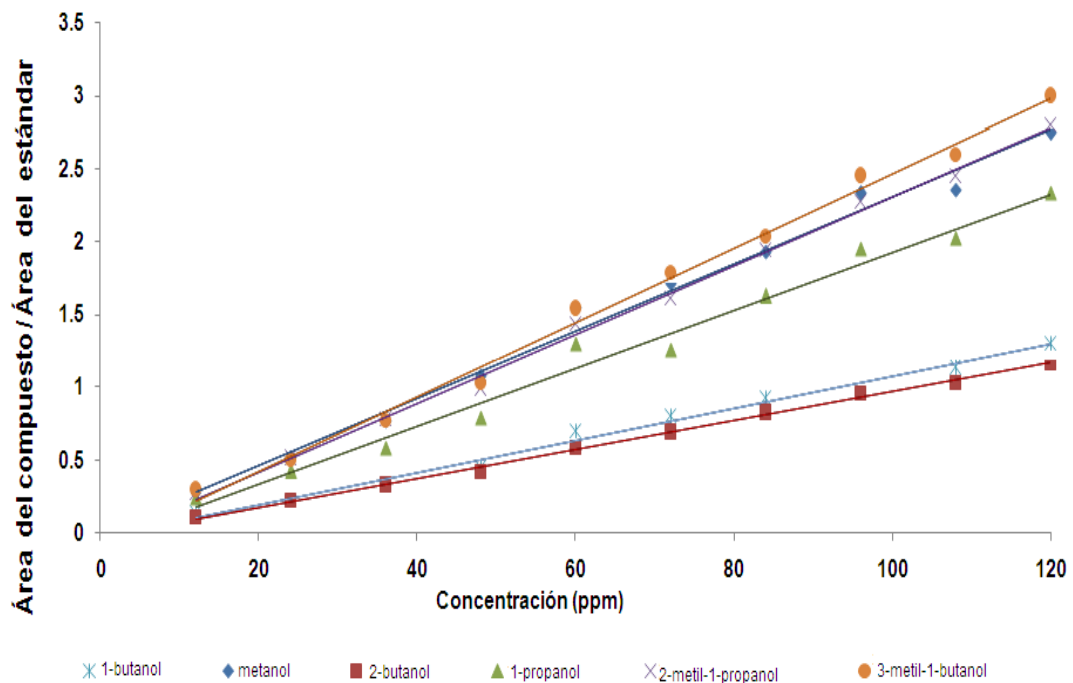


Figura 12. Curva de calibración de las soluciones patrón

A continuación se presentan las ecuaciones de la curva de calibración para cada uno de las soluciones patrón:

Tabla 7. Ecuaciones de las soluciones patrón

Estándar	Ecuaciones obtenidas por regresión lineal	r^2
metanol	$y = 0.0023 x + 0.0101$	0.9894
2-butanol	$y = 0.0099 x - 0.0204$	0.9974
propanol	$y = 0.0198 x - 0.0558$	0.9844
2-metil-1-propanol	$y = 0.0236 x - 0.0498$	0.9966
butanol	$y = 0.0110 x - 0.0218$	0.9913
3-metil-1-butanol	$y = 0.0256 x - 0.0861$	0.9938

ANEXO 2

A continuación se presentan los cálculos realizados para conocer la concentración final del metanol durante la destilación.

Tabla 8. Concentración (C2) del metanol durante la destilación

Tiempo	Ac	As	Ac/As=y	C1	C1*FD=C2
0	4674.040000	34126.423333	0.136962	441.260843	551.576054
10	4298.006667	34827.190000	0.123410	394.120056	492.650070
30	3149.430000	35290.985000	0.089242	275.275725	344.094656
40	4151.553333	35807.166667	0.115942	368.145972	460.182465
45	4556.526667	35017.360000	0.130122	417.467602	521.834503
50	3745.530000	38738.016667	0.096689	301.178224	376.472780
60	2962.243333	36893.029000	0.080293	244.148750	305.185938
70	1923.806667	37904.210000	0.050754	141.406722	176.758402
80	1972.220000	35432.450000	0.055661	158.474457	198.093071
90	1369.975000	36344.620000	0.037694	95.979216	119.974020
100	1306.140000	36343.340000	0.035939	89.874467	112.343084
110	1125.373333	35823.000000	0.031415	74.138527	92.673159
120	743.756667	36983.230000	0.020111	34.819640	43.524550
130	667.320000	35971.230000	0.018551	29.396495	36.745619
140	424.643333	37417.540000	0.011349	4.343574	5.429467
150	412.086667	36344.340000	0.011338	4.307478	5.384348

Donde:

Ac	Área del compuesto
As	Área del estándar
Ac/As	Área del compuesto/Área del estándar
C1	Concentración del compuesto en mg/L
FD	Factor de dilución
C2	(Concentración del compuesto C1*Factor de dilución) en mg/L

La concentración del estándar (2-Pentanol) para todos los compuestos fue de 8 mg/L y los valores obtenidos de la curva de calibración para metanol (Tabla 7) son $b=0.0101$ y $m=0.0023$.

Mediante la siguiente ecuación,

$$\text{Conc. del Metanol} = \frac{(y - b)(\text{Conc. del Estándar})}{m}$$

Sustituyendo los valores para el tiempo de 150 minutos de la destilación se obtiene un valor C1 de 4.31 mg/L y al multiplicar por el factor de dilución se obtiene el valor de C2 de 5.38 mg/L.

Los cálculos para el resto de los compuestos mayoritarios se efectuaron utilizando el mismo procedimiento.