



Universidad Tecnológica de la Mixteca

Labor et Sapientia, Libertas

**Identificación de metabolitos en mosto y mezcal de *Agave potatorum* Zucc.,
mediante UHPLC-QTOF**

Tesis para obtener el título de:

Ingeniero en Alimentos

Presenta:

Leonardo Daniel Soto Rodríguez

Directora de tesis:

Dra. Rocio Gómez Cansino

Co-directora:

Dra. Edith Graciela González Mondragón

Huajuapán de León, Oaxaca, enero de 2020

Las actividades de este proyecto se realizaron en el laboratorio de Biotecnología, ubicado en el Edificio de Productos Naturales y Alimentos, de la Universidad Tecnológica de la Mixteca (UTM), Huajuapán de León, Oaxaca.

El trabajo de investigación se financió parcialmente por los proyectos CONACYT: INFR2015-01 (254019), INFR301176 “Apoyo para el mantenimiento de un UPLC-QTOF, empleado en el desarrollo de investigación de productos naturales y alimentos del Estado de Oaxaca” y el proyecto “Formulación de bebida a base de destilados de mango y mezcal”.

ACTIVIDADES ACADÉMICAS

Obtención de aceites de orégano (*Lippia graveolens*) por arrastre de vapor, febrero de 2019.

Asistencia al II Congreso Nacional de Agave-Mezcal con sede en Oaxaca de Juárez, Oaxaca del 12 y 13 de septiembre del 2019, organizado por el Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR), Unidad Oaxaca.

Asistencia a la ponencia magistral “Presentación del mapa de agaves mezcaleros de Oaxaca” presentada por el Biólogo Jorge Larson Guerra, con sede en Oaxaca de Juárez, Oaxaca el 13 de septiembre de 2019 en el Foro Internacional del Mezcal “Vive Mezcal”.

Asistencia a la ponencia magistral “Novedades taxonómicas de agave en el estado de Oaxaca”, presentada por el Dr. Abisaí Josué García Mendoza, con sede en Oaxaca de Juárez, Oaxaca el 13 de septiembre de 2019 en el Foro Internacional del Mezcal “Vive Mezcal”.

AGRADECIMIENTOS

A mi directora, la Dra. Rocio Gómez Cansino por la enseñanza, paciencia y consejos durante la realización de este proyecto y, sobre todo, por el aprendizaje y confianza brindados al permitirme aprender más sobre un tema de mi total interés. De igual manera a mi co-directora la Dra. Edith Graciela González Mondragón por su colaboración en la revisión y consejos para la culminación satisfactoria de este trabajo. A ambas por la confianza otorgada para trabajar con un equipo sofisticado; por la capacitación, aprendizaje de nuevos conocimientos y habilidades que sustentarán mi desenvolvimiento en un futuro.

A los integrantes del comité revisor de esta tesis: Dra. Mirna Patricia Santiago Gómez, Dr. Saúl Martínez Ramírez y al Dr. Adolfo López Torres (UNPA-Campus Tuxtepec), por sus comentarios, observaciones y revisiones que contribuyeron al desarrollo del proyecto. En especial agradezco al Dr. Adolfo porque sus palabras motivaron enormemente mi interés en prepararme cada día más para tener la capacidad de resolver problemas, utilizando técnicas analíticas e instrumentales.

Al maestro mezcalero Eloy Ramírez de Jesús por la donación de las muestras de mosto y mezcal de *A. potatorum* Zucc. También a los Doctores, Felipe de Jesús Palma Cruz (ITO), Abisaí Josué García Mendoza (IB-UNAM) y a la M.C. Lucía Yoscelina Centeno Betanzos (IB-UNAM) por su apoyo para la identificación de la especie de agave utilizado.

Al cuerpo académico UTMIX-CA-29 por sus observaciones, comentarios, dudas y sugerencias realizadas durante la preparación del protocolo de la presente tesis. En especial a la M.C. Alma Yadira Salazar Govea por su tiempo, conocimiento y la capacitación brindada para la obtención de datos crudos. Asimismo, al Dr. Raúl Salas Coronado, por sus observaciones y sugerencias durante la revisión del protocolo de tesis en la asignatura de “Seminario de Tesis”.

Asimismo, al M.C. Edgar T. Vázquez Ramos y al Ingeniero Jorge A. Váldez Amezcua, personal del soporte técnico de la empresa Waters[®] S.A. de C.V., por la asistencia técnica durante el desarrollo del proyecto.

Por último, agradezco a mis compañeros de clase por su motivación y comentarios a la propuesta inicial del presente proyecto. De la misma manera, a la Universidad Tecnológica de la Mixteca,

mi *alma mater*, por todo el conocimiento y el acceso a tecnologías de última generación durante mi trayecto en la licenciatura.

DEDICATORIAS

A mi mamá Carmen Soto y mi papá Wenceslao Fernández por su apoyo incondicional y por enseñarme que el conocimiento es la llave de muchas puertas; considerando que la perseverancia y constancia son el camino al éxito.

En especial dedico esta tesis a mi madre, por todos los sacrificios y horas de trabajo que tuvo que realizar para que ahora yo esté escribiendo este párrafo para ella. Mami, te doy gracias por todo tu cariño, abrazos, amor incondicional y por todo aquello que inculcaste en mí. Porque todas las virtudes que las demás personas perciban de mí son gracias a todas tus enseñanzas. Estoy en deuda contigo y que esta tesis, sólo sea un espacio más para plasmar mi gratitud hacia ti. ¡TE AMO MAMI!, TODAS LAS METAS QUE CUMPLA DURANTE MI VIDA, TENDRÁN UNA DEDICATORIA PARA TI.

También dedico este trabajo a mi segunda madre, a aquella persona que se encargaba de mí cuando mamá tenía que ir a trabajar. A mi abuelita, por todos los nutrientes que incluía en sus palabras de alivio y por supuesto en sus riquísimas comidas que me hicieron un hombre capaz y fuerte. Tus bendiciones siempre van a cuidar de mí y tendrán un impacto positivo en mi trayectoria.

Asimismo, a la memoria de mi tío Mario quien me enseñó a valorar a la familia, a identificar las cosas que verdaderamente importan, aquellas cosas que parecen simples, pero llenan el corazón de paz y amor. También a la memoria de mi tío Enrique, quien me enseñó que el trabajo, responsabilidad, experiencia e inteligencia dan frutos. Y así como decía él, - A Dios rogando y con el mazo dando, porque las cosas no caen del cielo-.

Por supuesto a Viviana por su compañía desde hace 7 años, por todos los momentos vividos. Las palabras de aliento, motivación, abrazos, besos y por todo el amor brindado. Por eso una dedicatoria especial para “La Vivi” por todo su apoyo. ¡TE AMO BONITA!, gracias por todo.

A la hermana que nunca quise, ¡Jajaja!, pero sin ella la vida sería complicada. Valeria, esto también es para ti y espero que te sirva de motivación. Todo se logra cuando te lo propones y contarás con mi apoyo siempre. Cheque y Gerson, también espero que este logro lo compartan conmigo y les dedico mi trabajo, gracias, hermanos.

A mi tía Julia, Emmanuel, Jennifer y a Lupita por su compañía constante, por todas sus bromas, motivación y el apoyo brindado en los últimos 5 años. Desearía poder compartir este logro con el ángel de sus corazones, y sé que donde esté, él está orgulloso por el logro. Los quiero muchísimo. A mis sobrinas y sobrino, porque cuando llegue el momento de iniciar una carrera, tengan presente que contarán con mi apoyo y espero servir de ejemplo para su desarrollo personal y profesional.

Al resto de mi familia, a mis compañeros de licenciatura, a mis mejores amigos (Daniel, Adrián, Aarón, Karla, Itzel, Evelin y Darwin) y a todas aquellas personas que sin saberlo me dieron un empujón para finalizar este escalón en mi vida profesional. Les agradezco infinitamente.

RESUMEN

Agave potatorum es una especie poco estudiada de la que se han identificado compuestos volátiles presentes en el mezcal mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, una técnica que tiene como limitante únicamente la identificación de componentes volátiles y térmicamente estables por lo que, el presente trabajo tuvo como objetivo identificar metabolitos en mosto y mezcal de *A. potatorum*, mediante cromatografía de líquidos de ultra alta resolución acoplada a espectrometría de masas con cuadrupolo y tiempo de vuelo (UHPLC-QTOF). Para la identificación de los compuestos en el extracto de mosto y mezcal, primero se estableció un método analítico de separación por UHPLC. Para lograr la separación adecuada de los analitos, se utilizó un gradiente en fase inversa con metanol y acetonitrilo como modificadores orgánicos. Para la detección de mayor cantidad de analitos, se utilizó la ionización por electronebulización en modo positivo (ESI+). Los datos LC-MS/MS se analizaron con el software Progenesis QI en modo de metabolómica no dirigida en la que se compararon las masas exactas y los patrones de fragmentación molecular con los datos espectrales de bases de datos como METLIN[®] y PubChem[®], además se utilizó el programa CFM-ID[®] para la simulación de la fragmentación molecular. Se identificaron 208 iones moleculares, 101 en extracto de mosto y 107 para mezcal, de las que se obtuvieron 363 asignaciones correspondientes a metabolitos como alcaloides, carbohidratos, flavonoides, ácidos orgánicos y glicerosfosfolípidos. Para el aducto M+H-H₂O (265.0862) se asignaron 27 compuestos, clasificados como flavonas, pterocarpanos, cumarinas, flavonoles, benzopiranos, chalconas, dihidrochalconas y derivados de fenantropirano. Se identificó tentativamente agrostophyllin (282.0862 *m/z*) en el mezcal de *A. potatorum*, un fenantropirano derivado de la ruta del ácido shiquímico/acetato-malonato, del grupo de los estilbenoides. La presencia de agrostophyllin ha sido identificada en la familia de las orquídeas con alto potencial para tratar enfermedades como Alzheimer y cáncer, este es el primer trabajo en donde se describe para una especie del género agave. Se concluye que el uso de UHPLC-QTOF y metabolómica no dirigida pueden ser complementarios a la cromatografía de gases para la identificación de metabolitos presentes en mezcales de esta y otras especies; lo que establece las bases para la identificación de posibles marcadores de trazabilidad y/o de origen.

Palabras clave: *A. potatorum*, UHPLC-QTOF, mosto, mezcal y agrostophyllin.

ABSTRACT

Agave potatorum Zucc. is a poorly studied specie of which volatile compounds present in the mezcal have been identified by gas chromatography coupled to mass spectrometry, a technique that has as a limitation only the identification of volatile and thermally stable components so, the present research had as aim to identify metabolites in must and mezcal of *A. potatorum*, by ultra-high resolution liquid chromatography coupled to quadrupole mass spectrometry and flight of time (UHPLC-QTOF). For the identification of the compounds in the must extract and mezcal an analytical method was established. To achieve adequate separation of the analytes, a reverse phase gradient with methanol and acetonitrile was used as organic modifiers. For detection of a greater amount of analytes, positive mode electrospray ionization (ESI+) was used. The LC-MS/MS data were analyzed with Progenesis QI™ software in untargeted metabolomic mode in which the exact masses and molecular fragmentation patterns were compared with the spectral data of databases such as METLIN™ and PubChem™, in addition it was used the CFM-ID™ program for the simulation of molecular fragmentation. 208 molecular ions were identified, 101 in must extract and 107 for mezcal, of which 363 assignments corresponding to metabolites such as alkaloids, carbohydrates, flavonoids, organic acids and glycerophospholipids were obtained. For the M+H-H₂O adduct (265.0862 *m/z*), 27 compounds were assigned, classified as flavones, pterocarpanes, coumarins, flavonols, benzopyrans, chalcones, dihydrochalcones and phenanthropyran derivatives. Agrostophyllin (282.0862 *m/z*) was tentatively identified in the mezcal of *A. potatorum*, a phenanthropyran derived from the shikimic acid/acetate-malonate pathway, of the stilbenoid group. The presence of agrostophyllin has been identified in the family of orchids with high potential to treat diseases such as Alzheimer's and cancer, this is the first report that indicated the presence of this compound in the genus *Agave*. It is concluded that the use of UHPLC-QTOF and untargeted metabolomics can be complementary to gas chromatography for the identification of metabolites present in mezcals of this and other species. This research establishes the basis for the identification of possible traceability and/or origin markers.

Keywords: *A. potatorum*, UHPLC-QTOF, must, mezcal, agrostohyllin.

ÍNDICE

RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE TABLAS	xii
ABREVIATURAS	xiii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Agave.....	3
2.1.1. <i>Agave potatorum</i>	3
2.2. ¿Qué es el mezcal?	5
2.3. Denominación de Origen del Mezcal (DOM)	8
2.4. UHPLC-QTOF	10
2.4.1. Cromatografía líquidos de ultra alta resolución	10
2.4.2. Espectrometría de masas	13
2.4.3. Fuente de ionización: ionización por electronebulización (ESI).....	14
2.4.4. Analizadores de masas	15
2.4.4.1. Cuadrupolo	15
2.4.4.2. Tiempo de vuelo (TOF).....	16
3. ESTADO DE LA SITUACIÓN	17
3.1 Caracterización química de materia vegetal y mezcal de diferentes especies de agave..	17
3.2. Compuestos volátiles del mezcal.....	18
3.3. Análisis de extractos de agave por HPLC	18
4. JUSTIFICACIÓN	19
5. ORIGINALIDAD	20
6. OBJETIVOS	21
6.1. Objetivo general	21
6.2. Objetivos específicos.....	21
7. METODOLOGÍA.....	22
7.1. Obtención de mosto y mezcal de <i>A. potatorum</i>	22
7.2. Identificación botánica	22

7.3. Acondicionamiento de las muestras de mosto y de mezcal para su análisis por UHPLC-QTOF.....	22
7.4. Condiciones del UPLC-QTOF	23
7.5. Identificación de metabolitos en mosto y mezcal de <i>A. potatorum</i>	24
7.6. Condiciones del UPLC-QTOF (MS/MS).....	25
8. RESULTADOS Y DISCUSIONES	26
8.1. Identificación botánica	26
8.2. Obtención del extracto de mosto	26
8.3. Desarrollo de las condiciones de separación empleando UPLC-QTOF.....	26
8.4. Procesamiento de datos crudos.....	34
8.5. Identificación de metabolitos en mosto y mezcal de <i>A. potatorum</i> por MS/MS.....	38
9. CONCLUSIONES.....	45
10. PERSPECTIVAS	46
11. REFERENCIAS	47
ANEXO	54
Anexo I.....	54
Anexo II.....	56
APÉNDICE	57
Apéndice I.....	57
Apéndice II.....	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Agave potatorum</i>	4
Figura 2. <i>Agave potatorum</i> : a) roseta y b) cabezas	5
Figura 3. Municipios que conforman la denominación de origen del mezcal	9
Figura 4. Espectro de polaridad de los compuestos con base en los grupos funcionales.....	12
Figura 5. Componentes de un espectrómetro de masas.....	14
Figura 6. Esquema de un sistema de ionización ESI.....	15
Figura 7. Esquema de un analizador de masas cuadrupolo	16
Figura 8. Cromatograma del extracto de mosto obtenido en la prueba 1	27
Figura 9. Cromatograma del mezcal obtenido en la prueba 1	27
Figura 10. Cromatograma de extracto del mosto obtenido en la prueba 2.....	28
Figura 11. Cromatograma del extracto de mosto obtenido en la prueba 3.....	29
Figura 12. Cromatograma de extracto del mosto obtenido en la prueba 4.....	30
Figura 13. Cromatograma de mezcal obtenido en la prueba 4	30
Figura 14. Cromatograma de extracto del mosto obtenido en la prueba 5.....	31
Figura 15. Cromatograma del mezcal obtenido en la prueba 5	31
Figura 16. Cromatogramas de a) extracto de mosto y b) mezcal de <i>A. potatorum</i>	33
Figura 17. Alineación de los cromatogramas de extracto de mosto y de mezcal.....	34
Figura 18. Mapa de iones (t_R vs m/z).....	35
Figura 19. Perfil de abundancia estandarizada.	36
Figura 20. Análisis de Componentes Principales (PCA)	37
Figura 21. Modelo de Hotelling's T^2	37
Figura 22. Diagrama de cargas	38
Figura 23. Patrón de fragmentación molecular del ion 282.0892 m/z , con una masa experimental de 282.0839 m/z obtenido con UPLC-QTOF-MS/MS-ESI (+).....	41
Figura 24. Gráfico S	42
Figura 25. Gradiente utilizado en la prueba 1,2,5 y 6.	56
Figura 26. Gradiente utilizado en la prueba 3.	56
Figura 27. Gradiente utilizado en la prueba 4.	56

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Especificaciones fisicoquímicas del mezcal.....	7
Tabla 2. Clasificación del mezcal según sus características sensoriales.	7
Tabla 3. Comparación de características entre HPLC y UHPLC.....	11
Tabla 4. Tipos de columna para cromatografía de líquidos y sus aplicaciones.....	11
Tabla 5. Pruebas realizadas para el establecimiento del método analítico.	23
Tabla 6. Lista de iones que se fragmentaron para su posterior identificación por comparación con las bases de datos.	39
Tabla 7. Posibles marcadores (m/z) obtenidos a partir del gráfico S.....	42

ABREVIATURAS

IMPI	Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial
DOM	Denominación de Origen del Mezcal
DOF	Diario Oficial de la Federación
CRM	Consejo Regulador del Mezcal
UHPLC-QTOF	Cromatografía de líquidos de ultra alta resolución acoplada a un espectrómetro de masas equipado con cuadrupolo y tiempo de vuelo
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
CSH	Híbrido de superficie cargada
BEH	Etileno de puente híbrido
HSS	Sílice de alta resistencia
UHPLC/MS	Cromatografía de líquidos de ultra resolución acoplado a espectrometría de masas
MALDI	Ionización y desorción en matriz, asistida por láser
ESI	Ionización por electronebulización
TOF	Tiempo de vuelo
MS/MS	Espectrometría de masas/Espectrometría de masas
ppm	Partes por millón
SPME-GC-MS	Micro-extracción en fase sólida-cromatografía de gases-espectrometría de masas
SPE	Extracción en fase sólida
GC	Cromatografía de gases
GC-MS	Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas
HPLC-MS-TOF	Cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a espectrometría de masas equipado con tiempo de vuelo.
PCA	Análisis de componentes principales
rpm	Revoluciones por minuto
API	Ionización a presión atmosférica
M	Metro
L	Litro
<i>m/z</i>	Masa/carga
<i>t_R</i>	Tiempo de retención
MERT	Masa exacta-tiempo de retención
G	Gramo
µg	Microgramo
µL	Microlitro
UV-vis	Ultravioleta-Visible
NMR	Resonancia Magnética Nuclear
NaI	Ioduro de sodio

1. INTRODUCCIÓN

El estado de Oaxaca aporta más del 92% de la producción nacional de mezcal (Consejo Regulador del Mezcal, 2019); en el 2018 se produjeron 4, 682, 494 L de dicha bebida a partir de 13 especies, tanto cultivadas como silvestres, *Agave angustifolia* Haw fue la especie que más se utilizó debido a su fácil propagación y cultivo. El mezcal es una bebida de espíritu neutro que cuenta con denominación de origen, declarada en el Diario Oficial de la Federación (DOF) en 1994 para los estados de Durango, Guerrero, Guanajuato, Michoacán, Oaxaca, Puebla, San Luis Potosí, Tamaulipas y Zacatecas. La finalidad de la Denominación de Origen del Mezcal (DOM) es garantizar a los consumidores la autenticidad de la bebida y salvaguardar los derechos de los productores contra la competencia desleal (Carrillo-Trueba, 2007). Asimismo, dicha bebida es respaldada por la NOM-070-SCFI en donde se establecen los parámetros y métodos utilizados para garantizar la calidad del producto.

La cromatografía de gases (GC) es la técnica analítica establecida en la NOM-070-SCFI y el Consejo Regulador del Mezcal (CRM) para evaluar cualitativa y cuantitativamente compuestos volátiles como: metanol, furfural y alcoholes superiores presentes en esta bebida (NOM-070-SCFI-2016). No obstante, mediante esta técnica también se han identificado otros componentes volátiles como: eucaliptol, trimetil-2-furanmetanol, linalool, fenantreno, etc., responsables de las características sensoriales como olores y aromas (Chavez-Parga, Pérez Hernández y González Hernández, 2016).

Una limitante del uso de la GC para la caracterización química del mezcal es que mediante esta técnica únicamente se detectan los metabolitos térmicamente estables presentes en la fracción volátil, dejando un vacío en el estudio e identificación de los metabolitos que se encuentran en la fracción no volátil. Debido a la falta de estudios sobre la caracterización química de especies de agaves silvestres empleados en la elaboración de mezcal, así como el hecho de que la mezcla compleja de compuestos volátiles y no volátiles propician los atributos sensoriales de esta bebida, el objetivo del presente trabajo fue identificar

metabolitos en mosto y mezcal de *A. potatorum*, mediante UHPLC-QTOF. Los resultados de este trabajo exploratorio permitieron identificar compuestos no volátiles presentes en las etapas de fermentación y destilación del mezcal, utilizando una técnica analítica complementaria a la GC.

2. MARCO TEÓRICO

En esta sección se describe al *A. potatorum*, como objeto de estudio del presente trabajo, se define el concepto de mezcal, la denominación de origen de este producto, así como, las propiedades de calidad de esta bebida.

2.1. Agave

El género agave se clasificó por primera vez dentro de la familia Agavaceae, sin embargo, en el 2003 se incorporó dentro de la familia Asparagaceae (Félix-Valdez, 2014), debido a marcadores moleculares que la vinculan con esta.

En México se han identificado 159 especies de agave, de las cuales 125 son potenciales para la elaboración de mezcal (Palma, Pérez y Meza, 2016), y a la fecha se ha documentado el uso de 13 especies (Anexo 1), para dicho fin (Conabio, 2006); su localización en México ocurre desde el nivel del mar hasta los 3,400 m (García-Mendoza, 2002). Crecen en selvas bajas y encinares de trópico seco (Illsley Granich et al., 2005) y se consideran plantas perennes usualmente de vida larga, con raíces duras, poco profundas, acaules o con tallo corto y grueso; sus hojas (pencas), son simples, fibrosas y rígidas, cuya forma puede variar de linear a lanceolada u ovada y los bordes pueden presentar margen aserrado (dientes laterales). El conjunto de las pencas y la piña recibe el nombre de roseta en algunas especies, debido a la filotaxia de las hojas como en el caso de *A. potatorum*. Una vez retiradas las pencas durante la jima, se corta el corazón o piña, también conocido como cabeza de agave.

2.1.1. *Agave potatorum*

Agave potatorum es un agave silvestre de zonas secas de la Sierra Madre del Sur del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, ubicada en el estado de Oaxaca, por lo que se considera una especie endémica (Delgado-Lemus, Casas y Téllez, 2014). Cabe mencionar, que este tipo de agave tiene una importante presencia en la región Mixteca, debido a que su ecosistema aloja entre

su flora a cactáceas, matorrales y agaves. Las principales características de *A. potatorum* son el tamaño de la roseta de 1 m de ancho y 0.7 m de altura, presenta hojas ovadas con colores que van desde el verde brillante hasta un tono blancuzco (Figura 1).

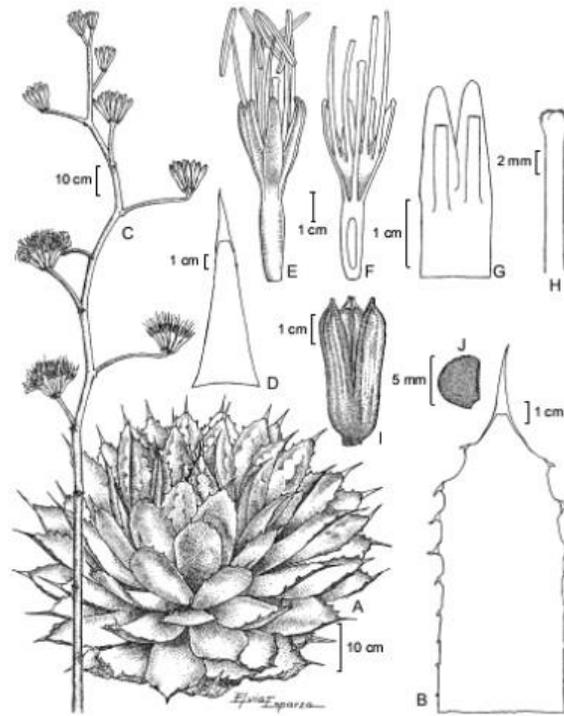


Figura 1. *Agave potatorum*, a) Roseta; b) Hoja; c) Inflorescencia; d) Bráctea del pedúnculo; e) Flor; f) Flor disecada; g) Detalle de la inserción del filamento; h) Estilo y estigma; i) Cápsula; j) Semilla. Tomado de García-Mendoza, 2010.

A. potatorum crece y se desarrolla durante 8 años para llegar a la madurez, generando una inflorescencia de hasta 4 m de altura con flores amarillas (Conabio, 2006). Dicha inflorescencia es comúnmente llamada “quiate” y es retirada de la roseta (capado) con la finalidad de que los carbohidratos presentes en la cabeza del agave (Figura 2), no sean utilizados para el desarrollo de la misma y se concentren de tal forma que puedan ser utilizados por los microorganismos durante el proceso de fermentación en la elaboración de mezcal.



Figura 2. *Agave potatorum*: a) roseta y b) cabezas.

En Oaxaca, el aprovechamiento de los agaves silvestres para la producción de mezcal se ha incrementado por lo que ha sido necesario conocer los requerimientos nutrimentales y ambientales para su posible cultivo intensivo (Morales, Martínez Gutiérrez, Cortés-Martínez, Aquino Bolaños, Escamirosa Tinoco y Hernández Tolentino, 2017). Sin embargo, la variabilidad en la composición del suelo, han imposibilitado la generación de condiciones que permitan la domesticación de *A. potatorum*.

2.2. ¿Qué es el mezcal?

Desde la época prehispánica, las cabezas de agaves eran cocidas y machacadas con la finalidad de extraer sus jugos, los cuales se fermentaban para ser ingeridos durante rituales y celebraciones. Antes de la conquista, la población indígena no estaba acostumbrada a ingerir bebidas con un alto contenido alcohólico; con la conquista española se introdujeron los alambiques, incluyéndose de este modo la destilación de los mostos en el proceso para la obtención del mezcal (López-Cruz, Martínez-Gutiérrez y Caballero-García, 2016). El término “mezcal” proviene del náhuatl *mexcalli* que significa agave horneado (Chavez-Parga et al., 2016).

El proceso de elaboración del mezcal con una concentración de etanol entre 35 y 45 % (v/v) (Gómez-Zamora, De Jesús-Fuentes, Peñafiel-López y Tovar-Hernández, 2016), consta principalmente de seis etapas:

1. Cosecha. Comprende el corte o jima de las hojas para obtener la cabeza del agave y la recolección para su traslado al palenque.

2. Cocción. Se lleva a cabo para hidrolizar los fructanos a carbohidratos más simples como glucosa y fructuosa. Esta operación, de manera tradicional se realiza en un horno construido a partir de una oquedad en la tierra, se utiliza leña como fuente de calor y se emplean piedras de río para mantener una temperatura aproximada de 1000 °C. Sin embargo, de manera industrial se utilizan autoclaves para realizar este proceso.

3. Molienda. También llamado triturado, tiene como finalidad hacer que los monosacáridos como la fructosa estén más disponibles, aumentando la superficie de contacto para los microorganismos que llevan a cabo la fermentación. Esta etapa se realiza de manera tradicional, utilizando un molino egipcio o por arrastre de bestia provisto por una rueda de piedra unida a un eje y que es tirada por un caballo. Por otra parte, las fábricas emplean cuchillas y molinos industriales para este proceso.

4. Fermentación. En esta etapa los azúcares contenidos en las cabezas son metabolizados a etanol, a través de una fermentación alcohólica; tiene una duración aproximada de seis a ocho días. De manera tradicional se emplean los microorganismos propios del entorno, mientras que en la industrial se utilizan cepas específicas.

5. Destilación y rectificación. En esta etapa el etanol es separado del mosto mediante el uso de alambiques de cobre para llevar al etanol a su punto de ebullición (78.5 °C), para rectificar el mezcal comúnmente se realiza una segunda destilación.

6. Envasado. Proceso en el que se transfiere la bebida destilada a envases de cristal para su venta, en algunos casos después de la destilación, el mezcal puede ser almacenado en barricas de roble para reposar o añejar la bebida (Ortiz Bravo, 2006) y el envasado ocurre después del tiempo de reposo.

La necesidad de regular y certificar el mezcal generó la siguiente definición oficial: bebida destilada 100 % de agave, obtenida por la destilación de jugos fermentados con microorganismos nativos de la materia prima o inoculados, extraídos de cabezas maduras de agaves cocidos, cosechados en el territorio que comprende la denominación de origen (NOM-070-SCFI-2016). Las características distintivas del mezcal son el sabor y su aroma, estos atributos varían dependiendo de la especie de agave utilizado y del tipo de proceso de elaboración. Además, existen otros factores que deben considerarse tales como: las

características del tipo de suelo donde se cultiva el agave, la topografía de la región, el clima, el agua, los microorganismos y el control de calidad empírico de los maestros mezcaleros; que en conjunto determinan las propiedades sensoriales de cada mezcal como los olores y aromas a ahumado, agave verde y agave cocido (Gómez-Zamora et al., 2016).

Con base en el tipo de materiales y técnicas utilizadas durante las etapas de cocción del agave, su molienda, fermentación y destilación, se obtienen tres categorías: mezcal, mezcal artesanal y mezcal ancestral, como se menciona en la NOM-070-SCFI. Las principales diferencias entre las categorías radican en variaciones en las etapas de cocción y destilación.

Por otra parte, para que el mezcal sea comercializado debe cumplir con especificaciones de calidad (Tabla 1).

Tabla 1. Especificaciones fisicoquímicas del mezcal.

Especificaciones	Mínimo	Máximo
Volumen de alcohol a 20 °C (% v/v)	35	55
Extracto seco (g/L de mezcal)	0	10
Alcoholes superiores (mg/100 mL de alcohol anhidro)	100	500
Metanol (mg/100 mL de alcohol anhidro)	30	300
Furfural (mg/100 mL de alcohol anhidro)	0	5
Aldehídos (mg/100 mL de alcohol anhidro)	0	40
Plomo (Pb) (mg/L)	0	0.5
Arsénico (As) (mg/L)	0	0.5

Tomado de la NOM-070-SCFI

El mezcal también puede clasificarse dependiendo sus propiedades sensoriales las cuales varían con los procesos a los que es sometido después de la etapa de destilación (Tabla 2).

Tabla 2. Clasificación del mezcal según sus características sensoriales.

Clasificación	Características del mezcal
Blanco o joven	Incoloro y traslucido. No es sujeto a ningún tipo de proceso posterior.
Madurado en vidrio	Estabilizado en recipiente de vidrio más de 12 meses, bajo tierra o en un espacio con variaciones mínimas de luz, temperatura y humedad.

Reposado	Permanece entre 2 y 12 meses en recipientes de madera que garanticen su inocuidad, en un espacio con variaciones de luz, temperatura y humedad.
Añejo	Permanece más de 12 meses en recipientes de madera que garanticen su inocuidad de capacidades menores a 1000 L, en un espacio con variaciones mínimas de luz, temperatura y humedad.
Abocado con	Se deben incorporar directamente ingredientes para adicionar sabores, tales como gusano de maguey, entre otros.
Destilado	Se debe destilar con ingredientes para incorporar sabores tales como pechuga de pavo o pollo, conejo, moles, ciruelas, entre otros.

Tomado de la NOM-070-SCFI.

En el estado de Oaxaca para la elaboración de mezcal se utilizan 8 especies y 17 formas protegidas o silvestres, siendo la de mayor uso *A. angustifolia* Haw o maguey espadín, como se conoce comúnmente. Sin embargo, otras especies son utilizadas en menor proporción como: *A. rhodacantha* Trel, *A. potatorum* Zucc., *A. seemanniana* Jacobi, *A. marmorata* Roetzl, *A. karwinskii* Zucc., *A. americana* var. *americana* Linneo y *A. americana* var. *oaxacensis* Gentry (García-Mendoza, 2012).

2.3. Denominación de Origen del Mezcal (DOM)

La denominación de origen se define como el nombre de *una región geográfica específica utilizada en la designación de un producto*, cuyas cualidades, reputación y características se deben esencialmente a la zona geográfica, factores naturales y humanos de la región (IMPI, 2018).

En México, el 28 de noviembre de 1994 se publicó en el Diario Oficial de la Federación (DOF) que sólo se puede producir mezcal a partir de agave cultivado en los estados de Durango, Guerrero, Zacatecas, San Luis Potosí, Oaxaca; así como 1 municipio de Guanajuato, 11 de Tamaulipas y 29 de Michoacán. La DOM sufrió modificaciones, incluyéndose a los estados de Puebla y Estado de México, como productores de mezcal en el 2015 y 2018, respectivamente.

Para el estado de Oaxaca, la DOM es específicamente para siete distritos; Sola de Vega, Miahuatlán, Yautepec, Ocotlán, Ejutla y Zimatlán, además de Santiago Matatlán, municipio

del distrito de Tlacolula (Figura 3); lo que implica que los agaves se deben obtener exclusivamente de estos lugares los cuales conforman la “Región del Mezcal” (Palma et al., 2016). Los distritos mencionados están conformados por 131 municipios que de manera estricta no reciben protección de la DOM porque no están declarados en la misma.

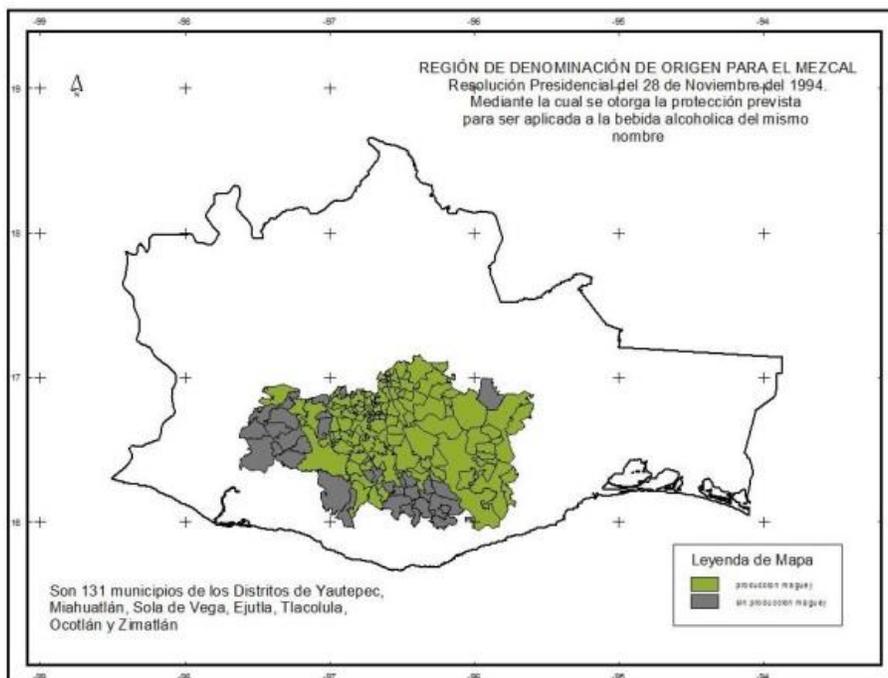


Figura 3. Municipios que conforman la denominación de origen del mezcal. Tomado de: Palma et al., 2016.

Por otra parte, el 9 de diciembre del 2003 se publicó en el DOF el aviso por medio del cual se dio a conocer la acreditación y aprobación de la CRM como organismo de certificación de producto mezcal (Palma et al., 2016) cuyo objetivo es verificar el cumplimiento de la calidad en la cadena productiva para la elaboración de esta bebida y el aseguramiento de la protección por la DOM, así como, la verificación de los parámetros fisicoquímicos establecidos en la NOM-070-SCFI.

La cadena de valor del sistema-producto agave-mezcal está constituida por 5 eslabones necesarios para su elaboración, producción y comercialización (Palma et al., 2016):

1. Viverista. Son los responsables de la propagación de agave, mediante hijuelos, apomixia y cultivo de tejidos bajo condiciones controladas.

2. Productor de agave. Son aquellos que se dedican al cultivo de maguey, dependiendo de la extensión cultivada se dividen en productores de subsistencia, productores de baja, media y alta escala productiva.

3. Productor de mezcal. Aquellos que se dedican al procesamiento de la materia prima para la obtención del mezcal. Según el CRM, la mayoría elabora esta bebida de manera artesanal mediante el uso de alambiques de cobre u ollas de barro y solo hay tres plantas industriales en el estado de Oaxaca.

4. Envasador. Constituido por los que se dedican exclusivamente a envasar mezcal, pueden ser comercializadores o productores, siempre y cuando cumplan con las especificaciones de registro de marca y certificación.

5. Comercializador. Incluye a los distribuidores nacionales e internacionales que se dedican a las ventas de mezcal, minoristas o medio-mayoristas que hacen llegar el producto hasta el consumidor final.

2.4. UHPLC-QTOF

2.4.1. Cromatografía líquidos de ultra alta resolución

La cromatografía de líquidos de ultra alta resolución (UHPLC), es una técnica empleada para la separación de mezclas complejas para la identificación de metabolitos; comúnmente, esta técnica se acopla a la espectrometría de masas para la identificación de los componentes de una mezcla mediante la coincidencia de los patrones de fragmentación molecular (Khan y Ali, 2015).

UHPLC presenta ventajas importantes como: resolución alta, tiempo de análisis y bajo consumo de disolventes (Swartz, 2005). El fundamento teórico de la separación en el UHPLC y HPLC (cromatografía de líquidos de alta resolución) es el mismo y se basa en la ecuación de Van Deemter (ecuación 1), en la cual se relacionan parámetros como la velocidad de flujo y la altura del plato teórico; que a su vez están relacionados con la eficiencia de la columna.

$$H = A + \frac{B}{v} + Cv \quad (\text{ecuación 1})$$

Donde;

H: altura del plato teórico que representa el poder de resolución de la columna [m]

A: parámetro de difusión turbulenta [m]

B: coeficiente de difusión [$\text{m}^2 \text{s}^{-1}$]

C: coeficiente de transferencia de masa del analito entre la fase móvil y la estacionaria [s]

v: velocidad lineal de flujo [m s^{-1}]

Por otro lado, las columnas utilizadas en UHPLC están constituidas por materiales híbridos con un tamaño de partícula menor a $2 \mu\text{m}$, este último factor marca la diferencia respecto a las columnas empleadas en HPLC; algunas otras diferencias se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Comparación de características entre HPLC y UHPLC.

Característica	HPLC	UHPLC
Tamaño de partícula	3-5 μm	<2 μm
Contrapresión máxima	35-40 MPa	103.5 MPa
Dimensiones de columna	150 x 3.2 mm	150 x 2.1 mm
Temperatura de la columna	30 °C	65°C
Volumen de inyección	5 μL	2 μL

Tomada de Taleuzzaman, Ali, Gilani, Imam, y Hafeez, 2015.

La disminución del tamaño de partícula produce un aumento en la presión de trabajo por arriba de 42 MPa, siendo el límite superior de un HPLC. Los materiales de empaque de las columnas en UHPLC las hacen específicas para proporcionar soluciones tecnológicas en diferentes campos de la ciencia como la medicina, química, biología que abordan separación de mezclas, y control de calidad (Chawla y Ranjan, 2016). Algunas tecnologías de partícula utilizadas son; CSH (Híbrido de superficie cargada), BEH (Etileno de puente híbrido) y HSS (Sílice de resistencia alta), como se observa en la Tabla 4. Actualmente se utilizan aproximadamente 22 fases estacionarias dentro de las que se encuentran: C₁₈, C₈, Hexyl-Phenyl, C₄, Cyano, PFP, entre otras (Waters Corporation, 2015).

Tabla 4. Tipos de columna para cromatografía de líquidos y sus aplicaciones.

Tipos de columna	Aplicaciones
CSH	Análisis de compuestos básicos en su forma ionizada, en condiciones de pH bajo y en fase reversa.
BEH	Ensayos rápidos de citocromo p450.

HSS	Identificación de interacciones fármaco-fármaco. Determinar el nivel de inhibición de un fármaco. Permite la separación de metabolitos polares como polifenoles, isoflavonas y provee un balance en la retención de moléculas polares-hidrofóbicas.
PST	Aislamiento de péptidos.

Durante el análisis cromatográfico existen tres modos de separación: polaridad, carga eléctrica y tamaño molecular; además, la eficiencia y selectividad determinan la capacidad de la resolución (separación) de los componentes de una mezcla.

- Eficiencia. Se refiere al poder de separación mecánico y es comparado con el número de platos teóricos. Es influenciada por el tamaño de partícula de la fase estacionaria y por el material del empacado de la columna.
- Selectividad. Se logra cuando se tiene una combinación adecuada entre la fase móvil y la fase estacionaria que permita la separación de los componentes de una mezcla.

En consecuencia, la separación se relaciona directamente con la polaridad de la fase móvil y su afinidad por los compuestos que se pretenden separar, y los grupos funcionales determinan la polaridad de la molécula. Por ejemplo, el agua es una molécula polar que tiene la capacidad para separar compuestos polares, así como el benceno puede separar compuestos no polares (Figura 4).

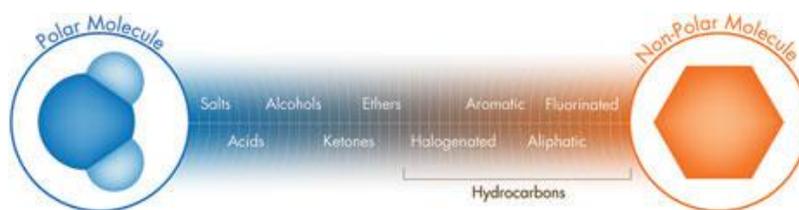


Figura 4. Espectro de polaridad de los compuestos con base en los grupos funcionales. Tomado de Waters Corporation, 2014.

La elección adecuada entre la fase móvil y la estacionaria, clasifica la separación en fase normal y fase inversa, la primera utiliza como fase móvil un disolvente no polar y como fase

estacionaria materiales de empaquetado polares, mientras que la segunda se basa en el uso de una fase móvil polar y una fase estacionaria no polar.

Por otra parte, los sistemas UHPLC/HPLC pueden acoplarse a un espectrómetro de masas mediante el cual todos los componentes de la mezcla analizada son detectados respecto a su relación masa/carga (m/z), adicionalmente los espectros de fragmentación molecular pueden facilitar la identificación de los componentes mediante su comparación con los datos espectrales de bases de datos.

2.4.2. Espectrometría de masas

La espectrometría de masas (MS) es una herramienta utilizada para determinar isótopos e identificar estructuras orgánicas; a partir de moléculas ionizadas en estado gaseoso para ser filtrados de acuerdo con su m/z (Harris, 2010), y su posterior detección (Martín Gómez y Ballesteros González, 2010). Un espectrómetro de masas se compone de los siguientes elementos: sistema de entrada, fuente de ionización, analizador y/o filtro de masas, detector, procesador de la señal y dispositivo de lectura, tal como se muestra en la Figura 5.

En sistemas acoplados la muestra proviene de un cromatógrafo de líquidos o gases, ingresa al espectrómetro donde se ioniza mediante una fuente de ionización, para separar y detectar los iones de acuerdo con m/z en un analizador de masas, posteriormente se mide m/z de acuerdo con su abundancia, y por último se procesan las señales transmitidas desde el detector a una computadora. En algunas técnicas como la espectrometría de masas/masas (MS/MS), se utilizan dos detectores con el fin de que en el primero se formen iones y se seleccionen aquellos que deberán pasar instantáneamente al segundo detector. Sin embargo, dependiendo del diseño del equipo y las aplicaciones para el que se creó, existe la posibilidad de que el analizador de masas y el detector estén acoplados.

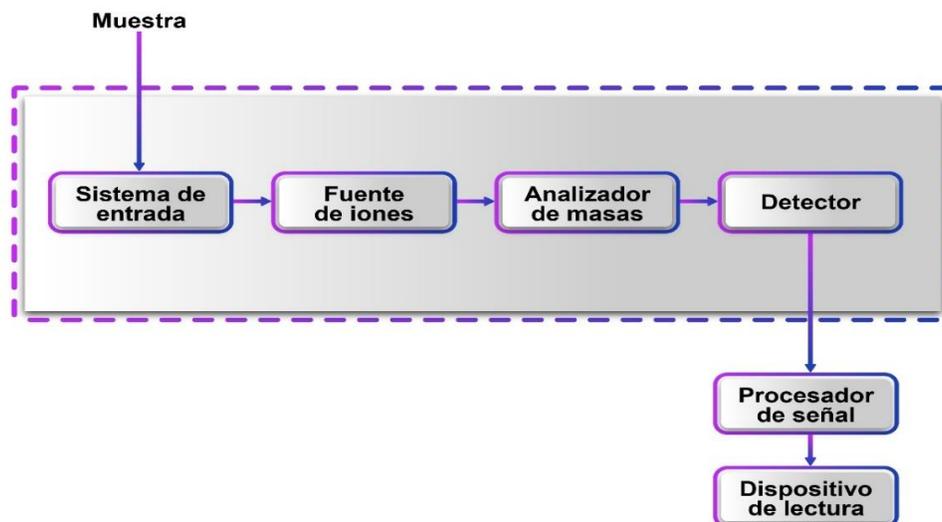


Figura 5. Componentes de un espectrómetro de masas. Modificado de Martín Gómez y Ballesteros González, 2010.

En 1960, la MS se estableció como una técnica que permitió la caracterización de compuestos orgánicos mediante una fuente de ionización química, y en este mismo año surgieron otros métodos como la desorción de campo, ionización secundaria, desorción de plasma y desorción láser. Sin embargo, hasta 1980 se desarrollaron técnicas capaces de ionizar moléculas biológicas mediante métodos como la ionización/desorción asistida por matriz (MALDI) y la ionización por electronebulización (ESI) (Ayala Bretón y De Regil Hernández, 2004).

2.4.3. Fuente de ionización: ionización por electronebulización (ESI)

ESI es producido por un campo magnético, el líquido pasa a través de un capilar en donde se induce un diferencial de potencial de 3 a 6 kV, dependiendo de la tensión superficial del disolvente utilizado; se forman pequeñas gotas altamente cargadas que se deforman para producir lo que se conoce como el cono de Taylor (Hoffman y Stroobant, 2007). Las gotas altamente cargadas se atraen luego electrostáticamente a la entrada del espectrómetro de masas, donde se aplica gas seco, calor o ambos, antes de que ingresen al analizador que se encuentra a presiones muy bajas (Barker, 1999) (Figura 6). La electronebulización puede

provocar una ionización positiva o negativa de acuerdo con el voltaje del capilar aplicado (Martín Gómez y Ballesteros González, 2010).

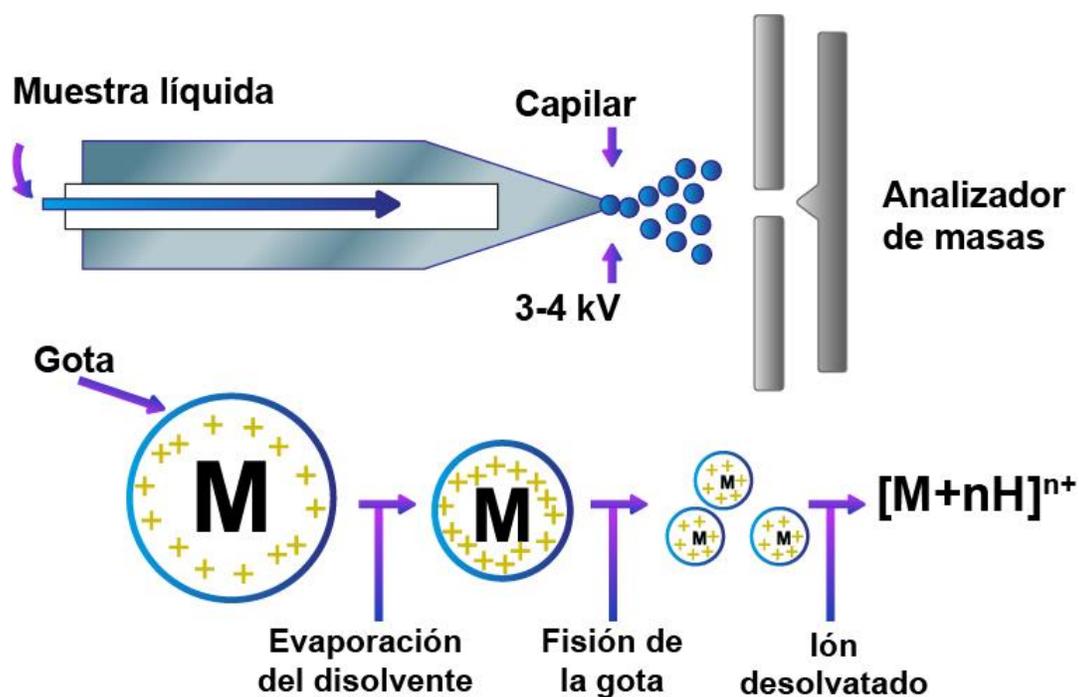


Figura 6. Esquema de un sistema de ionización ESI. Modificado de Martín Gómez y Ballesteros González, 2010.

2.4.4. Analizadores de masas

Los analizadores de masas llevan a cabo la separación de los iones producidos por la fuente de ionización, de acuerdo con su relación m/z para que puedan llegar al detector. El filtro cuadrupolar y el analizador de masas tiempo de vuelo (TOF) pueden operar en modo MS como una herramienta de escaneo, y en modo MS/MS para la identificación. Por otro lado, debido a su gran precisión de masa (por debajo de 2 ppm) se puede lograr una identificación altamente confiable, para su uso en el perfilado metabolómico (Calderón Santiago, 2014).

2.4.4.1. Cuadrupolo

Un cuadrupolo consiste en cuatro barras paralelas equidistantes de sección hiperbólica en la cara interna, generalmente de unos 15-20 cm de largo y 0.5 cm de radio, separadas entre sí, aprox. 2 cm, a las cuales se aplica un potencial combinado de corriente continua y de

radiofrecuencia creando en su interior un campo electromagnético denominado cuadrupolar (Abián, Carrascal y Gay, 2008). Las tensiones de corriente continua y alterna se incrementan de manera simultánea, sólo los iones con m/z definidos durante la programación consiguen tener una trayectoria estable y pasan al detector (Figura 7).

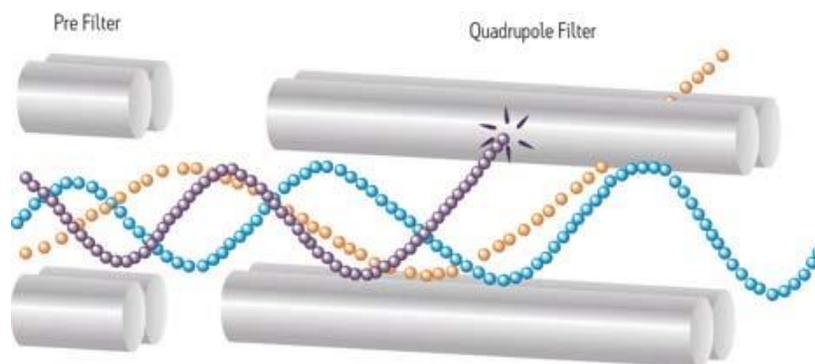


Figura 7. Esquema de un analizador de masas cuadrupolo. Se muestra la trayectoria de los iones hasta el detector. El color azul representa los iones filtrados en un rango determinado de m/z . Tomado de Waters Corporation, 2014.

2.4.4.2. Tiempo de vuelo (TOF)

El analizador TOF relaciona la masa de los iones con la velocidad, donde aquellos que son acelerados por un campo eléctrico adquieren distintas velocidades según el valor de su relación m/z y por tanto tardan distinto tiempo en recorrer una determinada distancia (Abián et al., 2008).

El fundamento de operación involucra el tiempo en el que un ion viaja desde la fuente de ionización hasta el detector ubicado a una distancia aproximada de 1-2 m. Los iones, que pasan a través del analizador TOF reciben energía (3000 eV) y debido a que estos presentan valores diferentes de m/z , se separan de acuerdo con la velocidad a la que llegan al detector (Plascencia Villa, 2003).

3. ESTADO DE LA SITUACIÓN

Actualmente, existen estudios de la composición química en mezcales de *A. angustifolia* Haw, *A. durangensis* Gentry y *A. salmiana* Otto, sin embargo, *A. potatorum* hasta el momento es una especie poco estudiada, de la que se han identificado solo compuestos volátiles presentes en el mezcal.

3.1 Caracterización química de materia vegetal y mezcal de diferentes especies de agave

Empleando GC se identificaron; acetales, ácidos orgánicos, alcoholes, cetonas, aldehídos, ésteres, fenoles y terpenos en el mezcal de *A. salmiana* (De León-Rodríguez, González-Hernández, Barba de la Rosa, Escalante-Minakata y López, 2006); los compuestos más abundantes fueron etanol, alcoholes superiores y ácidos orgánicos. Por otra parte, De León-Rodríguez, Escalante-Minakata, Jiménez-García, Ordoñez-Acevedo, Flores Flores y Barba de la Rosa (2008) identificaron 105 compuestos volátiles utilizando GC-MS para la obtención de perfiles químicos mediante metabolómica dirigida con la finalidad de obtener marcadores para clasificar bebidas espirituosas como mezcal, tequila, sotol, pulque, sisal y raicilla. En el 2010 se reportó que el 2-furanmetanol y el acetato de fenetilo se pueden usar como marcadores para diferenciar el mezcal de *A. potatorum* de otros (Vera-Guzmán, Guzmán-Gerónimo y López, 2010).

Por otro lado, terpenos como limoneno, α -terpineol, linalool (ácido mirístico y ácido láurico) se identificaron en *A. salmiana*, *A. tequilana* y *A. angustifolia*, mediante micro-extracción en fase sólida-cromatografía de gases-espectrometría de masas (SPME-GC-MS) y se obtuvieron perfiles de ácidos grasos y lípidos simples por extracción modificada de Bligh-Dyer y GC, con la finalidad de aportar información referente a fitoesteroles que puedan emplearse con fines farmacológicos (Martínez-Aguilar y Peña-Alvarez, 2009; Peña-Alvarez, Díaz, Medina, Labastida, Capella y Vera, 2004). También se cuantificaron aldehídos como el furfural y el

acetaldehído mediante el uso de estándares (Medina Valtierra, Juárez Ciprés y Peña-Alvarez, 2011).

3.2. Compuestos volátiles del mezcal

Se cuantificaron constituyentes volátiles y aniones en bebidas espirituosas de agave como tequila, mezcal, sotol y bacanora (Lachenmeier, Sohnius, Attig y López, 2006). Para *A. angustifolia* y *A. potatorum* se realizó un análisis por GC de 6 muestras de mezcal de cada especie, obtenidas a partir de una extracción líquido-líquido con diclorometano, identificándose 84 compuestos clasificados en alcoholes, ésteres, cetonas, aldehídos y ácidos grasos; además, se identificó el 3-etilfenol como marcador para mezcales de *A. angustifolia* (Vera-Guzmán, Guzmán-Gerónimo, López y Chávez-Servia, 2018). En otros trabajos se identificaron y cuantificaron compuestos volátiles en *A. potatorum* mediante el uso de estándares como metanol, etanol, ácido acético, 2-metilpropan-1-ol y 3 metilbutan-1-ol (Vera-Guzmán, Santiago García y López, 2009). En el Apéndice I se muestran todos los compuestos volátiles identificados a la fecha por GC.

3.3. Análisis de extractos de agave por HPLC

Ocho flavonoles derivados de quercetina y kaempferol se identificaron a partir de las flores de *Agave durangensis* mediante HPLC (Barriada-Bernal et al., 2014). Por otra parte, Olvera-García, Martín del Campo, Gutiérrez-Urbe y Cardador-Martínez (2015) identificaron ácidos grasos, alcanos, compuestos fenólicos, saponinas esteroideas y sapogeninas en pencas de *A. atrovirens* Karw. ex Salm-Dyck mediante GC y HPLC-QTOF, también identificaron a la glicona de gitogenina como el compuesto de mayor abundancia en los extractos no hidrolizados.

4. JUSTIFICACIÓN

A la fecha existen pocos trabajos referentes a la caracterización química del mezcal de *A. potatorum*, en todos se estudió la fracción volátil mediante GC-MS, el método analítico establecido en la NOM-070-SCFI para la determinación de la calidad del mezcal, sin embargo, esta técnica tiene como limitante la identificación de los componentes de la fracción no volátil. Por lo que, el estudio de los metabolitos presentes en mosto y mezcal de *A. potatorum* mediante UHPLC-QTOF permitió identificar los componentes no volátiles en la bebida y de este modo sentar las bases para el estudio de mezcales de otras especies. Mediante metabolómica no dirigida fue posible identificar los metabolitos por su m/z , t_R y la comparación del patrón de fragmentación molecular con datos espectrales de las bases de datos.

5. ORIGINALIDAD

La originalidad del presente proyecto es el uso de UHPLC-QTOF para identificar los metabolitos presentes en mosto y mezcal de *A. potatorum*, una especie silvestre y poco estudiada en cuanto a su composición química.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

Identificar metabolitos en mosto y mezcál de *A. potatorum*, empleando UHPLC-QTOF.

6.2. Objetivos específicos

1. Establecer el método analítico para la separación y detección de los metabolitos presentes en extracto de mosto y mezcál de *A. potatorum*.
2. Identificar los metabolitos presentes en el extracto de mosto y mezcál de *A. potatorum* empleando metabolómica no dirigida.

7. METODOLOGÍA

En la presente sección se describe la metodología, materiales y equipos que se utilizaron para la identificación botánica, obtención de la muestra de mosto y mezcal de *A. potatorum*, el acondicionamiento de estas, el establecimiento de las condiciones de operación, identificación de metabolitos y la asignación establecida por la comparación de los datos espectrales.

7.1. Obtención de mosto y mezcal de *A. potatorum*

El mosto y mezcal de *A. potatorum* los proporcionó el maestro mezcalero Eloy Ramírez de Jesús, propietario del palenque “La Asunción” con registro de marca Gavami mezcal. Para su obtención se procesaron 10 cabezas de agave con una madurez fisiológica de entre 6 y 7 años, colectadas en la comunidad de San Juan Lajarcia, Yautepec, Oaxaca. El mosto se conservó alicuotado en tubos falcon a -20 °C; mientras que el mezcal se almacenó a temperatura ambiente (25 °C) en una botella de vidrio cerrada herméticamente.

7.2. Identificación botánica

La identificación botánica de la especie se solicitó a los Doctores Felipe de Jesús Palma Cruz (Instituto Tecnológico de Oaxaca) y Abisaí Josué García Mendoza (Instituto de Biología, UNAM) quienes revisaron los archivos fotográficos de los especímenes colectados.

7.3. Acondicionamiento de las muestras de mosto y de mezcal para su análisis por UHPLC-QTOF

Para la obtención del extracto de mosto se empleó una centrífuga con control de temperatura (Marca Eppendorf, mod. 5810R), una alícuota de 10 mL de mosto se centrifugó a 12,857 g (10,000 rpm) durante 15 min., a 4 °C. El sobrenadante se recuperó por decantación y se diluyó con metanol en una proporción 1:1 (v/v), posteriormente se llevó a sequedad en un rotavapor (Marca IKA, mod. RV10) a 45 °C y 90 rpm. El mosto seco se solubilizó con

metanol grado LC-MS para realizar una extracción en fase sólida (SPE) (Supelclean LC-18-3 mL). El filtrado se llevó a sequedad total y posteriormente se solubilizó en metanol grado LC-MS hasta obtener una concentración de 150 µg/mL.

Por otro lado, no se obtuvo un extracto del mezcal por lo que se inyectó directamente al equipo; previamente a la inyección, el extracto de mosto y el mezcal se filtraron empleando una membrana de PTFE con un tamaño de poro de 0.22 µm (Marca LUZEREN), y se colocaron en viales de 1.5 mL con septa, previamente etiquetados. Por último, también se realizó una mezcla de extracto de mosto y mezcal (pool).

En todos los casos, se adicionó ácido fórmico como estabilizador de iones hasta obtener una concentración de 0.01 %, las muestras se degasificaron y homogeneizaron en un baño ultrasónico (Marca BRANSON, mod.8800).

7.4. Condiciones del UPLC-QTOF

Se analizó el extracto de mosto y mezcal empleando UPLC-QTOF (Waters, Milford, MA, USA). Los datos se adquirieron con el programa MassLynx V4.1 (Waters, Milford, MA, USA).

El método analítico se estableció empleando 6 pruebas diferentes con las siguientes variables de cambio: flujo de inyección, gradiente de elución, modo de adquisición y modo de ionización (Tabla 5). La fase móvil binaria consistió en A: agua:ácido fórmico (99.9:0.1, v/v) y fase móvil B (ACN:MeOH, 3:1, v/v), se utilizaron disolventes con un grado de pureza LC-MS, los gráficos de los gradientes utilizados se muestran en el Anexo II.

Tabla 5. Pruebas realizadas para el establecimiento del método analítico.

	Flujo (mL/min)	Gradiente lineal	Modo de ionización	Modo de adquisición
Prueba 1	0.2	0 min (97 %A) 30 min (60 %A) 31 min (3 %A) 32 min (97 %A)	Positivo	Centroide
Prueba 2	0.1	0 min (97 %A) 30 min (60 %A) 31 min (3 %A) 32 min (97 %A)	Positivo	Continuo

Prueba 3	0.2	0 min (97 % A) 30 min (40 % A) 31 min (3 % A) 32 min (97 % A)	Positivo	Continuo
Prueba 4	0.2	0 min (97 % A) 30 min (55 % A) 31 min (3 % A) 32 min (97 % A)	Positivo	Continuo
Prueba 5	0.2	0 min (97 % A) 30 min (60 % A) 31 min (3 % A) 32 min (97 % A)	Negativo	Continuo
Prueba 6	0.2	0 min (97 % A) 30 min (60 % A) 31 min (3 % A) 32 min (97 % A)	Positivo	Continuo

Los parámetros no modificados en las condiciones cromatográficas y QTOF que se utilizaron son:

Condiciones cromatográficas. Se utilizó una columna ACQUITY UPLC® HSS T3 (100 mm x 2.1 mm, 1.8 µm), la columna y el automuestreador se mantuvieron a una temperatura de 40 y 7 °C, respectivamente. El volumen de inyección fue de 2 µL. Todas las muestras se analizaron por triplicado con un gradiente de 0 a 30 min.

Condiciones QTOF: El análisis MS se realizó con un detector Waters Xevo® G2-XS QTOF MS (Waters, Milford, MA, USA), modo de resolución, temperaturas de la fuente de ionización y de desolvatación de 100 y 400 °C, respectivamente; voltaje del capilar 2000 V, voltaje del cono 30 V. Para la nebulización se utilizó nitrógeno con un flujo de 800 L/h y se mantuvo activado el gas de colisión (Ar de ultra alta pureza 99.999 %). Los datos de MS se recopilaron en un intervalo de 50 a 1200 *m/z*, con velocidad de adquisición de 0.5 s, para la calibración se utilizó yoduro de sodio (NaI) y para la corrección de los datos espectrales se utilizó como estándar de referencia leucina/encefalina ([M+H]⁺= 556.2771), ([M-H]⁻= 554.2615).

7.5. Identificación de metabolitos en mosto y mezcal de *A. potatorum*

La identificación de metabolitos presentes en el extracto de mosto y mezcal se realizó empleando el software Progenesis QI® (Nonlinear Dynamics, Milford, MA, USA). Los

cromatogramas se alinearon empleando como referencia la mezcla de extractos de mosto y mezcal (pool). Con base en el tipo y modo de ionización se seleccionaron los siguientes aductos: $M+3H$, $M+2H$, $M+H-2H_2O$, $M+H-H_2O$, $M+H$ y $2M+H$. Además, todas las m/z con una abundancia menor o igual a 10^2 se descartaron para su análisis.

El diseño de experimentos que se utilizó fue el de un factor entre grupos para la obtención de un ANOVA multivariado, debido a que este considera a ambos grupos (condiciones) como independientes y la hipótesis nula asume que las medias son iguales. Se definió al mosto como **condición 1** y al mezcal como **condición 2**. A través de un perfil de abundancia estandarizada normalizada se etiquetaron y clasificaron las m/z de acuerdo con su presencia en una o ambas condiciones, a la par se consideró el tiempo de retención (t_R) de cada una.

Al terminar la identificación de m/z se obtuvo un análisis de componentes principales (PCA) con el software EZinfo V3.0 (Umetrics, Milford, MA, USA); se generó una lista con todos los iones moleculares y cada una de las m/z fue ingresada a la base de datos METLIN[®] para la identificación de compuestos en un margen de error de masa exacta inferior a 5 ppm (1.4 mDa), a través de una búsqueda por lote.

7.6. Condiciones del UPLC-QTOF (MS/MS)

Para la identificación de compuestos se realizó una detección de los fragmentos moleculares, con condiciones cromatográficas iguales a las establecidas en el análisis del extracto de mosto y mezcal. Se emplearon tres energías de colisión diferentes (10, 20 y 40 V), cada ion se filtró de acuerdo con su t_R y su valor de relación m/z . Los espectros de fragmentación molecular obtenidos se compararon con los registrados en la base de datos METLIN[®].

8. RESULTADOS Y DISCUSIONES

La presente sección contiene los resultados y discusiones del tratamiento de las muestras, desarrollo del método para el análisis del extracto de mosto y mezcal de *A. potatorum*, procesamiento de los datos obtenidos mediante cromatogramas y espectros de masas, por último, la identificación de metabolitos presentes.

8.1. Identificación botánica

La especie se identificó como *A. potatorum* mediante comunicación verbal de los Doctores Felipe de Jesús Palma Cruz (ITO) y Abisaí Josué García Mendoza (IB-UNAM).

8.2. Obtención del extracto de mosto

A partir de 10 mL de mosto se obtuvieron 0.265 g de extracto seco, del cual se pesó 0.0045 ± 0.0002 g para su análisis mediante UHPLC-QTOF.

8.3. Desarrollo de las condiciones de separación empleando UPLC-QTOF

Derivado de la observación de la similitud cromatográfica del extracto de mosto y mezcal para las pruebas 2 y 3 en este documento solo se describe el análisis para los cromatogramas del extracto de mosto.

Prueba 1. Los picos observados en el cromatograma del extracto de mosto (Figura 8) mostraron una abundancia alrededor de 10^6 , la mayoría de ellos son simétricos y sólo algunos picos se encuentran coleados. Se observó buena separación entre picos, sin embargo, en el intervalo de 20 a 22 min, la separación se vio afectada posiblemente por el desplazamiento de la línea base. El cromatograma del mezcal mostró similitud cromatográfica con respecto al del extracto de mosto (Figura 9), a pesar de ser muestras que se obtuvieron en diferentes etapas del procesamiento del mezcal, sin embargo, se pudo observar en mezcal mayor abundancia de los picos. Debido a que para metabolómica se recomienda la adquisición en

formato continuo con la finalidad de obtener más información, se decidió utilizar en las pruebas posteriores dicho formato.

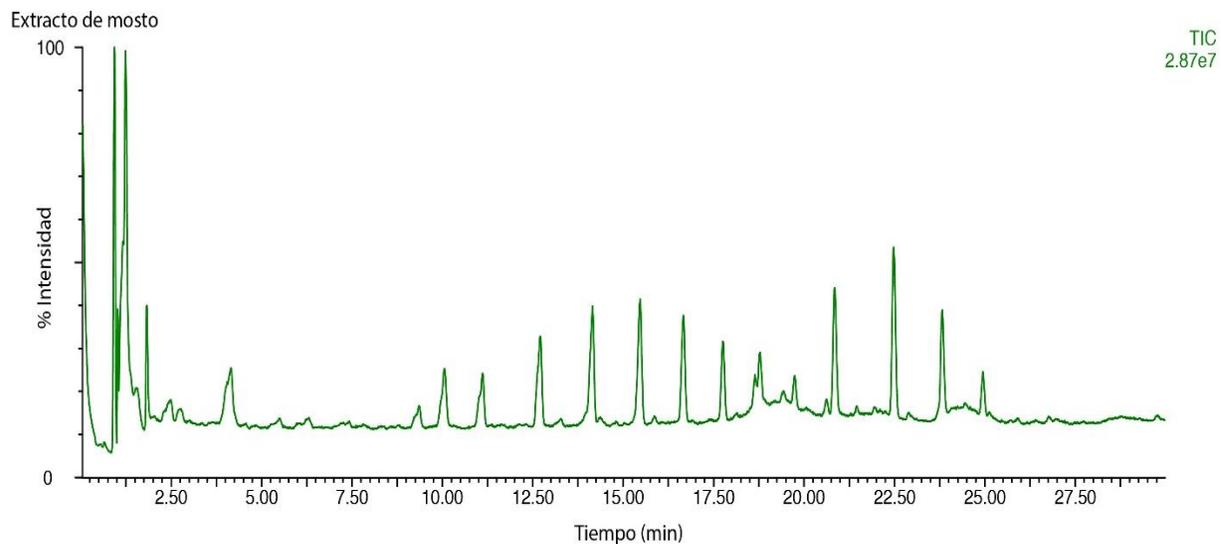


Figura 8. Cromatograma del extracto de mosto obtenido en la prueba 1.

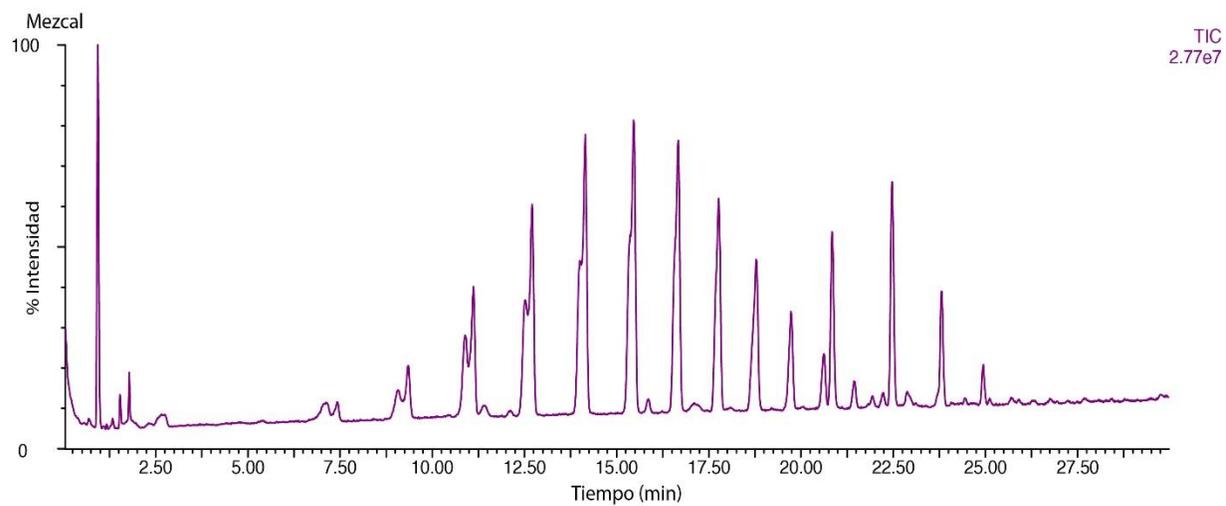


Figura 9. Cromatograma del mezcal obtenido en la prueba 1.

Prueba 2. En esta prueba se observó el desplazamiento de los tiempos de retención de las señales para el extracto de mosto, así como la saturación del conteo total de iones (10^7) ocasionada por la señal con $t_R = 2.4$ min, la separación y resolución de los picos se vio afectada por la presencia de señales asimétricas (Figura 10). Por otra parte, se observó una mejor separación de los picos en el intervalo de 21 a 23 min que corresponden a las señales con t_R de 17.5 a 20 min del cromatograma de la prueba 1. Sin embargo, la modificación en la velocidad de flujo no mejoró la señal de la línea base, lo que sugirió que este fenómeno es ocasionado por el gradiente de elución de la fase móvil.

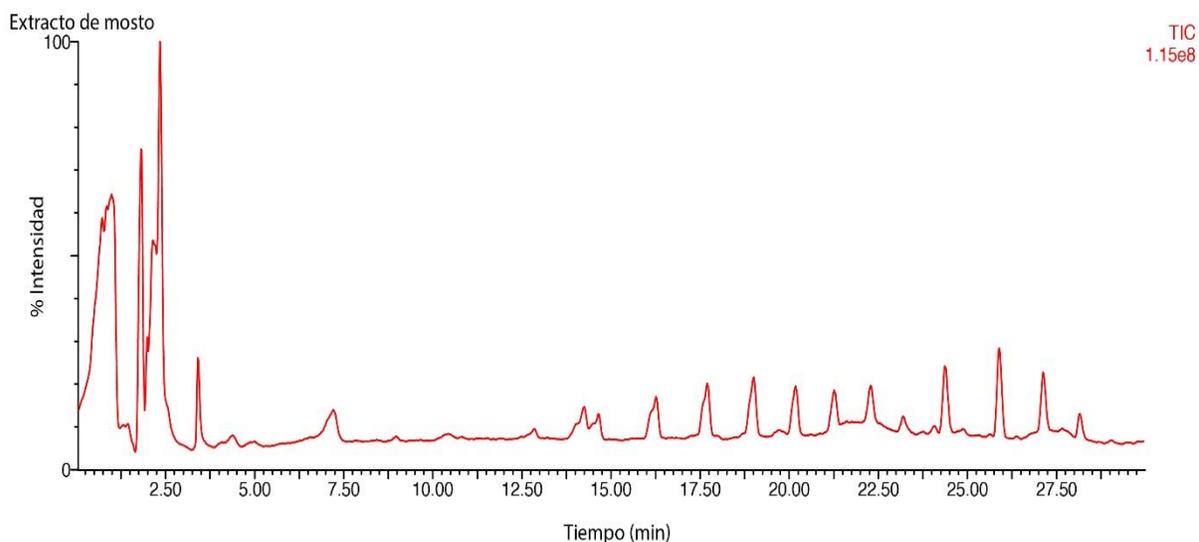


Figura 10. Cromatograma de extracto del mosto obtenido en la prueba 2.

Prueba 3. Al modificar el gradiente de la fase móvil se observó la disminución de los tiempos de retención de las señales del extracto de mosto, la cuenta total de iones se registró en un rango aceptable (10^6) (Figura 11). Sin embargo, la resolución y separación de los picos no mejoraron con respecto a la prueba 2, asimismo la distorsión de la línea base se observó en los intervalos de tiempo de 12.5 a 15 min, 16 a 17.5 min y 26 a 30 min; siendo este último el de mayor desplazamiento y que pueden ser atribuidos a la falta de degasificación de los disolventes utilizados en cromatografía (Crawford Scientific, 2007), sin embargo, todos los disolventes utilizados en este trabajo se degasificaron previamente, además de que el equipo

cuenta con un degasificador. Por lo que este desplazamiento puede atribuirse a la interacción entre la fase móvil y el tipo de componentes presentes en el extracto de mosto y mezcal, eluidos en esos tiempos de retención. Con base en lo anterior, se concluyó que la disminución del gradiente no mejoró la línea base, por lo que se decidió incrementar el porcentaje de fase móvil A a 55 %.

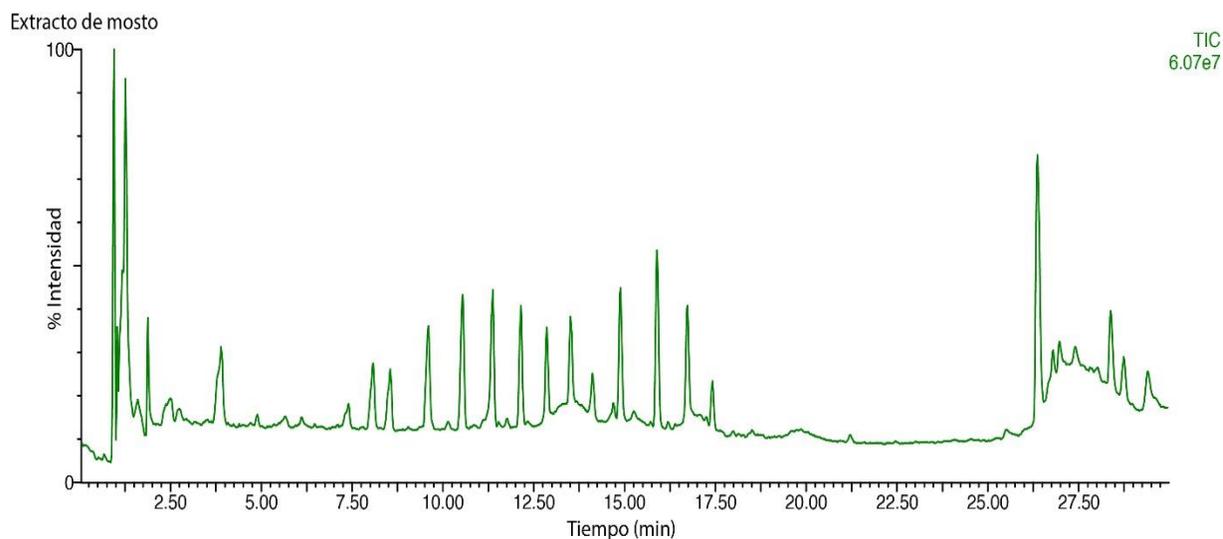


Figura 11. Cromatograma del extracto de mosto obtenido en la prueba 3.

Prueba 4. En esta prueba la abundancia de los iones fue de 10^6 , sin embargo, en los intervalos de 16 a 17.5 y 21 a 22.5 min, fue notoria la presencia de desplazamientos en la línea base, similar a lo observado en las pruebas anteriores para el extracto de mosto. En comparación con la prueba 3, el porcentaje de la fase móvil A mejoró la línea base del cromatograma, pero no la resolución de los picos (Figura 12). Por otra parte, respecto al mezcal el 100 % de la abundancia correspondió a la señal con $t_R = 0.95$ min, no se observó la resolución de los picos con $t_R = 6.8, 8.4, 10.01$ y 11.6 min (Figura 13), sin embargo, bajo estas condiciones el comportamiento de la línea base fue adecuado. Derivado del análisis cromatográfico para el extracto de mosto y mezcal se decidió cambiar el modo de ionización de positivo a negativo con la finalidad de obtener mejor resolución y separación de los picos.

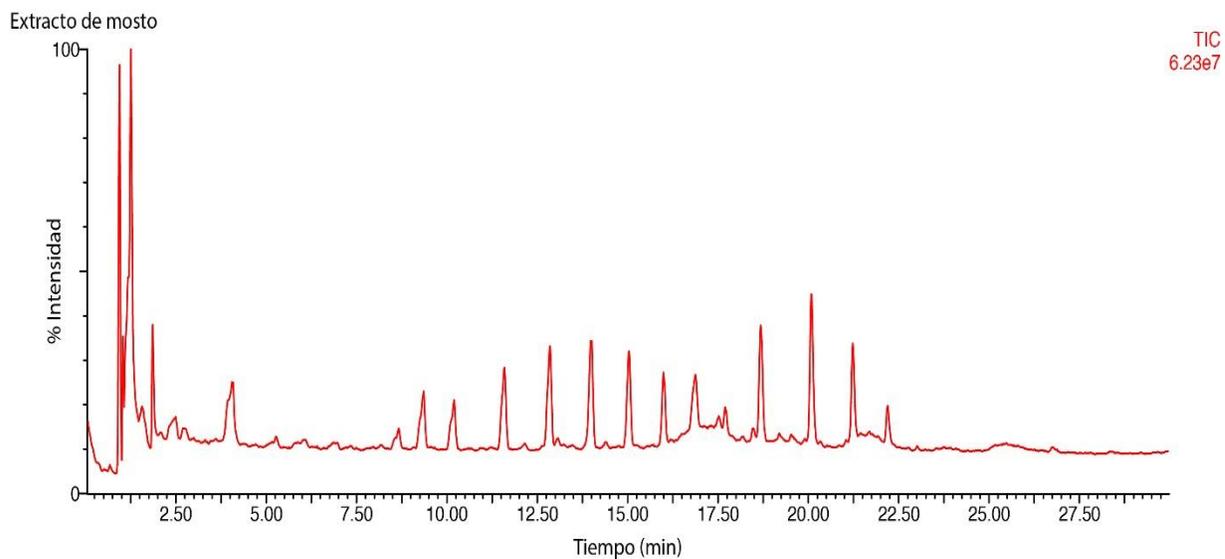


Figura 12. Cromatograma de extracto del mosto obtenido en la prueba 4.

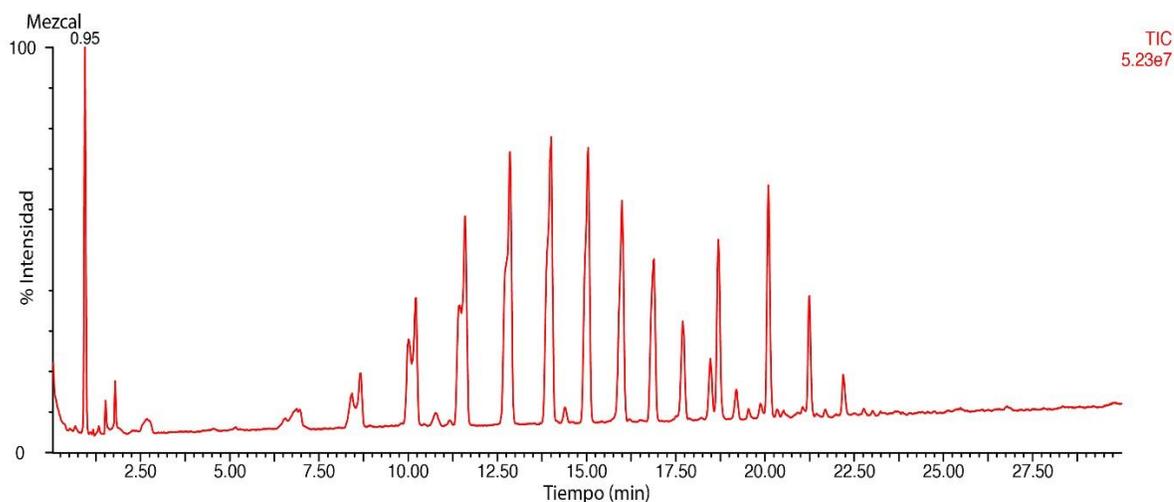


Figura 13. Cromatograma de mezcal obtenido en la prueba 4.

Prueba 5. En el cromatograma del extracto de mosto se observó una saturación (10^7) en la cuenta total de iones debido a la señal con $t_R = 1.26$ min, el número de picos con mayor abundancia fue menor al registrado en las pruebas anteriores (Figura 14). Por otra parte, el cromatograma del mezcal mostró separación, resolución y abundancia adecuadas para el

análisis (Figura 15), se observó que los picos con $t_R = 0.95$ y 15.91 min mostraron abundancias similares en el orden de 10^6 , sin embargo, con respecto a los 12 a 16 picos detectados en la ionización en modo positivo de la prueba 4, en este cromatograma solo se detectaron 6.

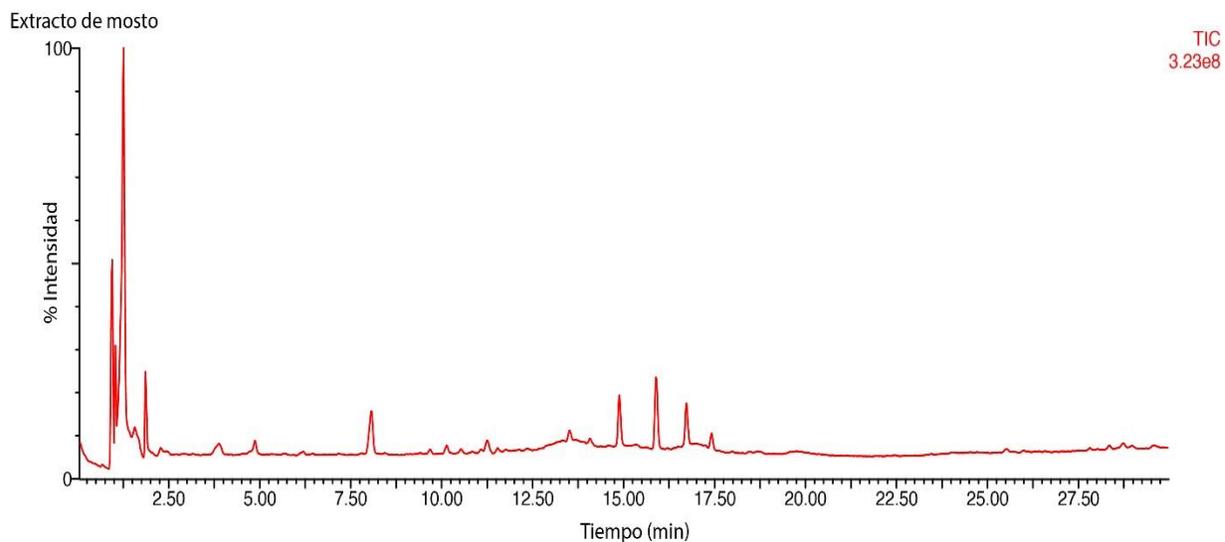


Figura 14. Cromatograma de extracto del mosto obtenido en la prueba 5.

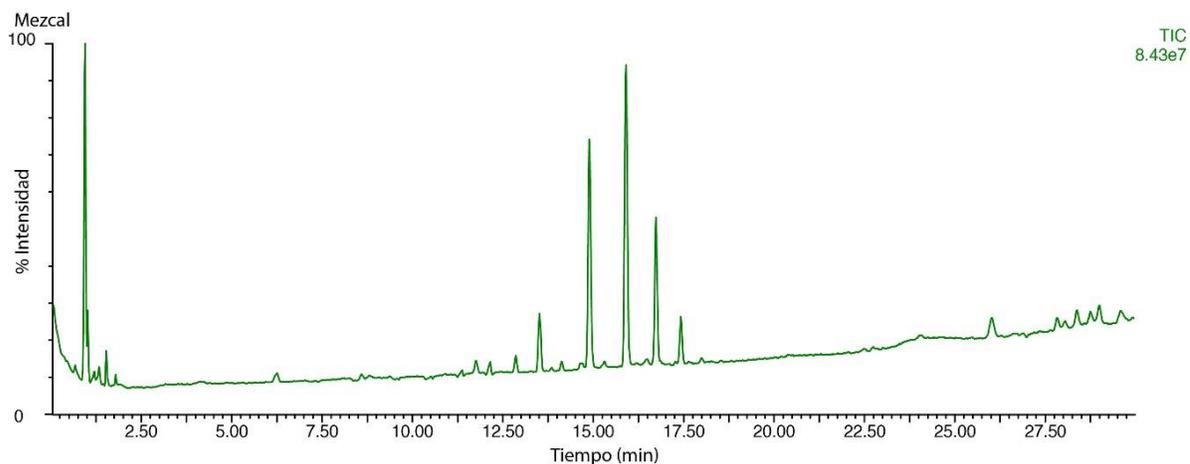


Figura 15. Cromatograma del mezcal obtenido en la prueba 5.

Con las condiciones establecidas para la prueba 5 no se observó un comportamiento adecuado de la línea base de los cromatogramas del extracto de mosto y mezcal de *A. potatorum*. Además, se observó una disminución de los iones detectados, lo que sugirió que posiblemente el extracto de mosto y mezcal contienen compuestos que por su naturaleza química pueden comportarse como ácidos de Lewis y propiciar en mayor medida la oxidación de los componentes generándose iones positivos por la pérdida de electrones.

Prueba 6. A partir del análisis comparativo de los patrones cromatográficos del extracto de mosto y mezcal se identificaron señales presentes únicamente en el extracto de mosto, con t_R de 1.29, 4.20, 10.17 y 28.38 min (Fig. 16a). Estas señales pueden atribuirse a compuestos producidos durante el proceso de fermentación, como lo observado durante el análisis de resultados que se discutirá más adelante.

Ambos cromatogramas mostraron una intensidad semejante en el orden de detección de 10^6 , donde el 100 % del conteo total de iones corresponden a los t_R de 1.29 y 22.47 min, para extracto de mosto y mezcal, respectivamente. La intensidad mayor de los picos en mezcal puede deberse a la concentración de metabolitos, debido a que el extracto de mosto se ajustó a una concentración específica (150 $\mu\text{g/mL}$), mientras que la del mezcal no fue determinada. Las condiciones para el análisis cromatográfico del extracto de mosto y mezcal de *A. potatorum*, se establecieron en la prueba 6, debido a que los cromatogramas presentaron buena resolución, línea base definida e intensidad adecuada en el conteo de iones en el rango de 10^6 (Figura 16). Los parámetros establecidos fueron: modo de ionización positivo con un formato de adquisición continuo y un gradiente de elución: 0 min (97 %A), 30 min (60 %A), 31 min (3 %A) y 32 min (97 %A).

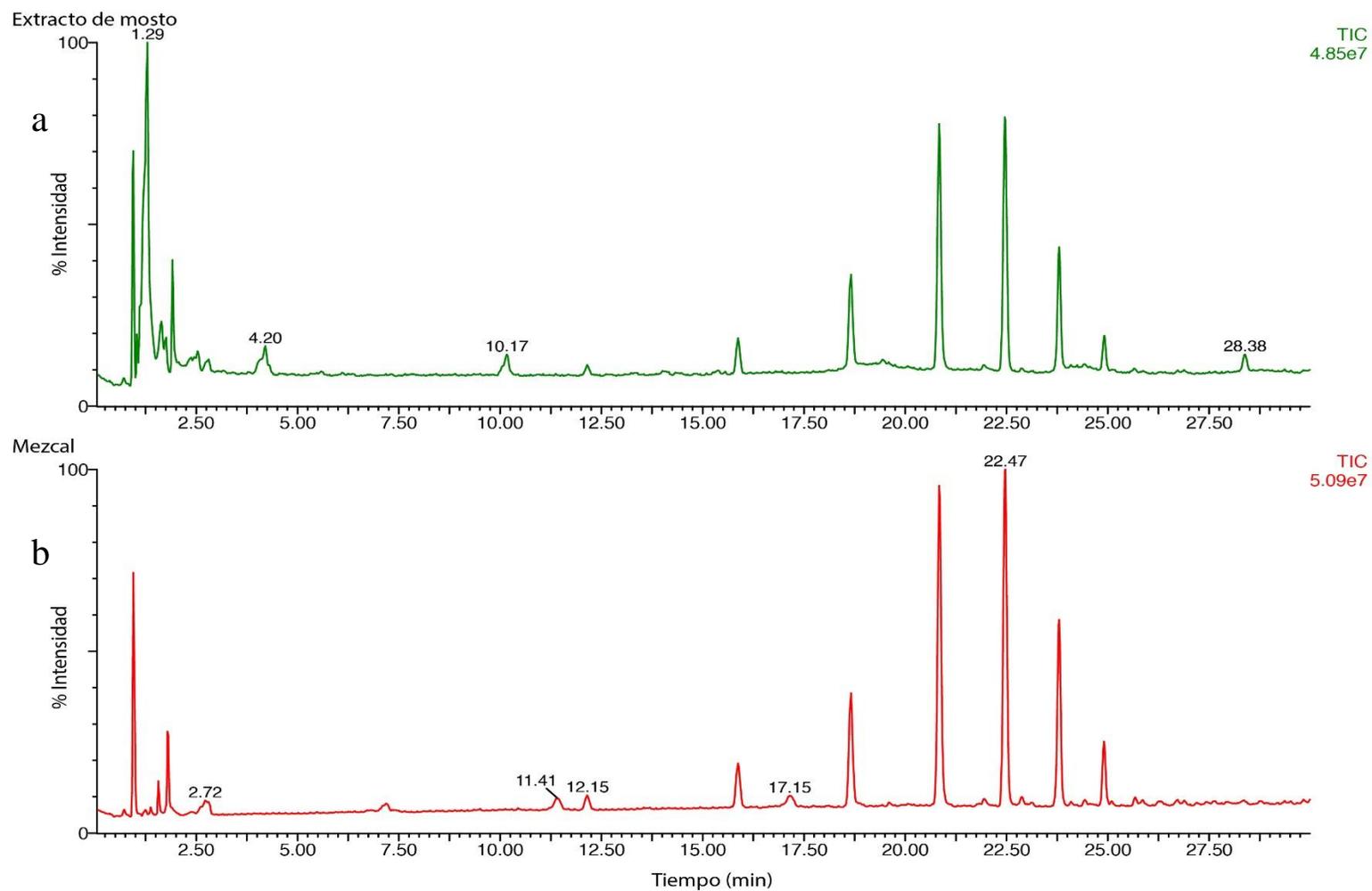


Figura 16. Cromatogramas de a) extracto de mosto y b) mezcal de *A. potatorum*. Obtenidos utilizando los parámetros de la prueba 6. Fase móvil A: agua:ácido fórmico (99.9:0.1, v/v), B: ACN:MeOH (3:1, v/v). Columna ACQUITY UPLC HSS T3 a 40 °C.

8.4. Procesamiento de datos crudos

En la Figura 17 se muestra la alineación de los cromatogramas del extracto de mosto (verde) y mezcal (rosa), a partir del cual se confirmó la similitud del perfil cromatográfico, la única diferencia que se observó fue la intensidad de los picos, como se mencionó anteriormente.

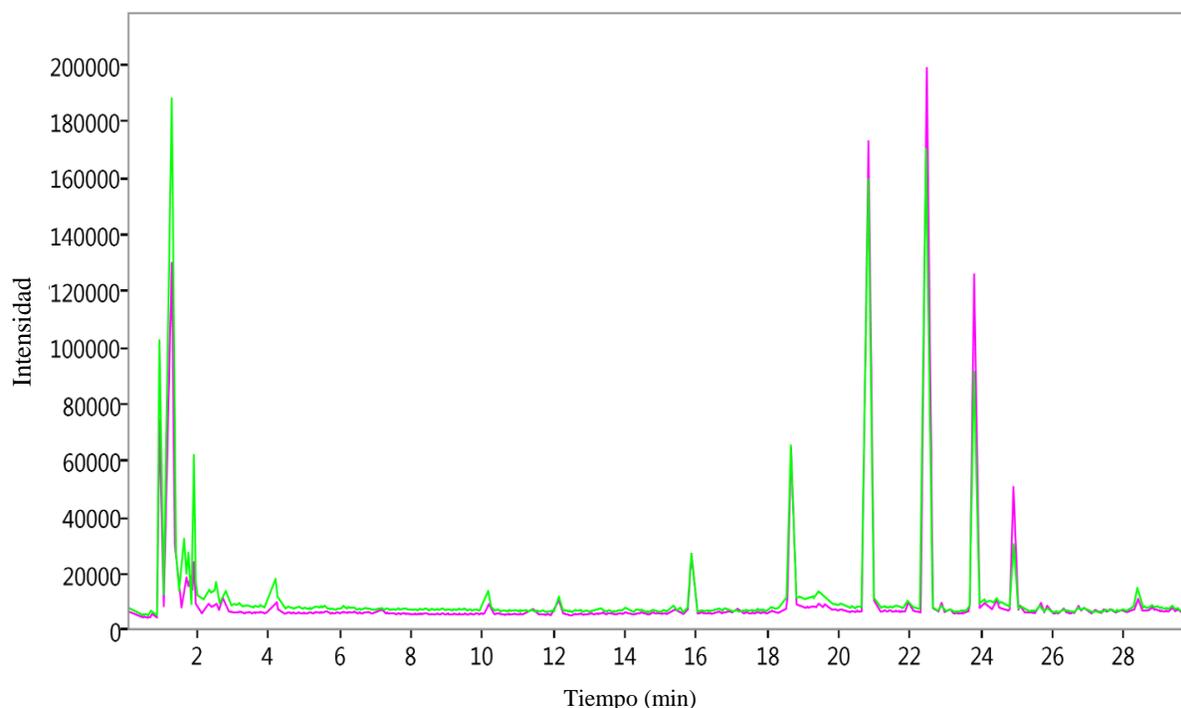


Figura 17. Alineación de los cromatogramas de extracto de mosto y de mezcal utilizando con respecto al del pool, en Progenesis QI ®.

A la par, se obtuvo el mapa de iones en un gráfico de t_R vs m/z (Figura 18) en donde cada punto representa un aducto con cargas diferentes (azul: +1, rojo: +2 y verde: +3) y las zonas más oscuras la ubicación de mayor abundancia de estos. Se identificaron un total de 231 aductos, de los cuales M+H representa el 60.5 %; M+2H, 38.43 %; M+3H, 0.71 %; M+H-H₂O, 0.17 %; M+H-2H₂O, 0.17 %; y 2M+H, 0.03 %.

De los 231 aductos identificados, se eliminaron 23 m/z por encontrarse en el orden de detección inferior a 10^2 , correspondiente al nivel de ruido; se obtuvieron 208 m/z de las cuales 101 señales

se agruparon en la condición 1 (extracto de mosto) y 107 en la condición 2 (mezcal) (Figura 19).

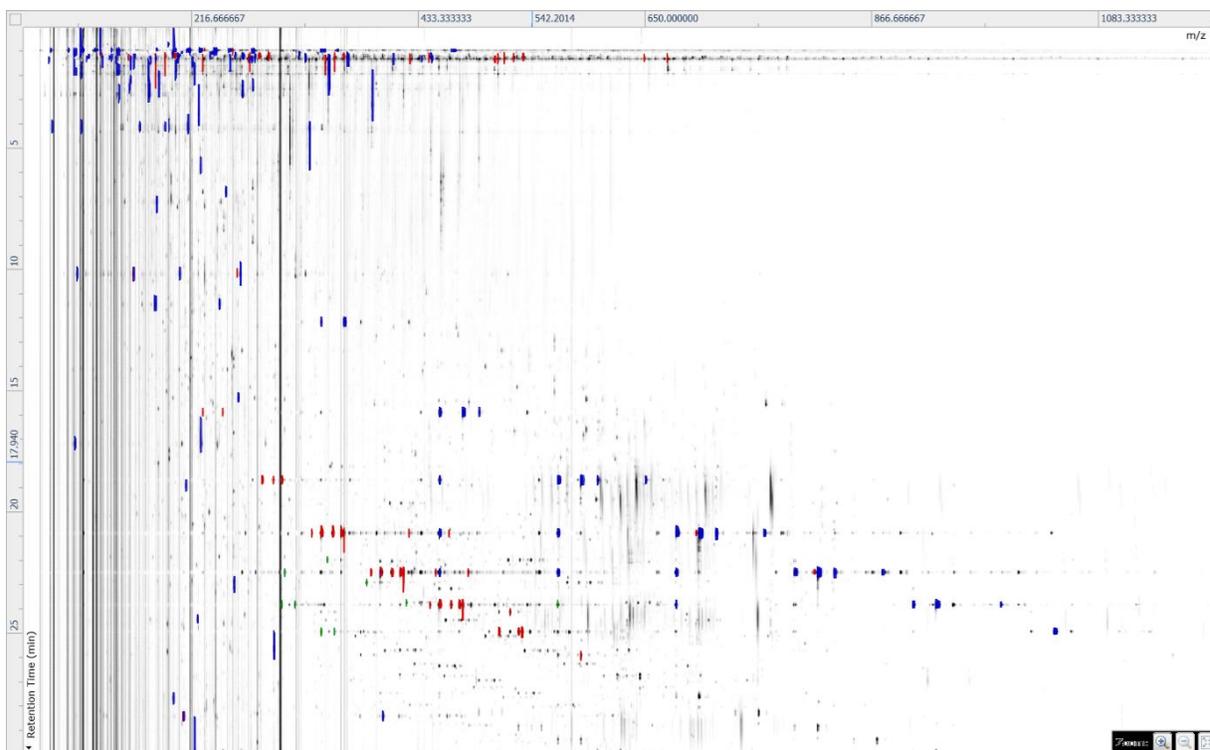


Figura 18. Mapa de iones (t_R vs m/z). Las manchas corresponden a los iones (231) con carga: 1+ (azul), 2+ (rojo) y 3+ (verde).

Durante el análisis no se identificaron m/z presentes en ambas condiciones, debido posiblemente por la transformación de los componentes del mosto por las altas temperaturas (80 °C) durante el proceso de destilación, en donde se pueden llevar a cabo reacciones tales como esterificaciones, acetilaciones, reacciones de Maillard y degradaciones de Strecker. (Rodríguez Madrera, Blanco Gomis y Mangas Alonso, 2003; Tsakiris, Kallithraka y Kourkoutas, 2014). Además, el cobre de los alambiques puede funcionar como catalizador de dichas reacciones (Reche, Leite Neto, Da Silva, Galinaro, De Osti y Franco, 2007).

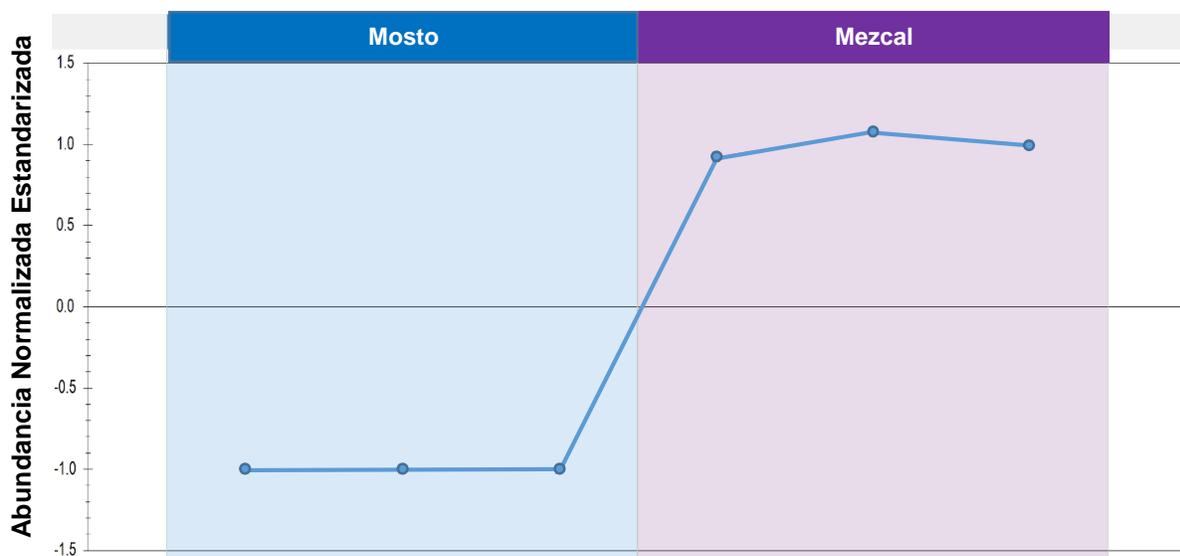


Figura 19. Perfil de abundancia estandarizada. Los puntos que se encuentran por arriba del eje cero indican la presencia del compuesto en el extracto del mosto y por debajo del eje cero su ausencia en mezcal.

Posteriormente se efectuó el análisis estadístico a partir de 6 observaciones (3 de extracto de mosto y 3 de mezcal) y 208 variables (m/z); a partir del cual se generó un análisis de componentes principales (PCA) utilizando una escala de Pareto para 2 componentes (condiciones 1 y 2). Cabe mencionar que un PCA usualmente es utilizado para agrupar las interrelaciones entre muestras (Cao et al., 2019), tal como se observó en la Figura 20; sin embargo, se identificó la separación de una de las réplicas de la condición 2. Esta separación indica en la mayoría de los casos algún problema con las muestras analizadas, como la existencia de valores incorrectos, problemas técnicos, y otros factores que pueden afectar el modelo.

Para descartar que la réplica aislada es un valor atípico, se aseguró que todos los datos estuvieran por debajo de las T críticas mediante el modelo estadístico Hotelling's T^2 (Wiklund, 2008), que se basa en la comparación de dos grupos. Un valor no confiable comúnmente rebasa el límite de la elipse ($T_{crít}=99\%$). Este modelo estadístico permite conocer las similitudes entre dos poblaciones, de acuerdo con su m/z para cada una, de manera simultánea (Pérez Valencia, 2009). El modelo Hotelling's T^2 (Figura 21), demostró que existe reproducibilidad de los experimentos (Wu, Chen, Li y Liu, 2018), debido a que todas las réplicas presentan una $T_{crít}$ menor al 95%.

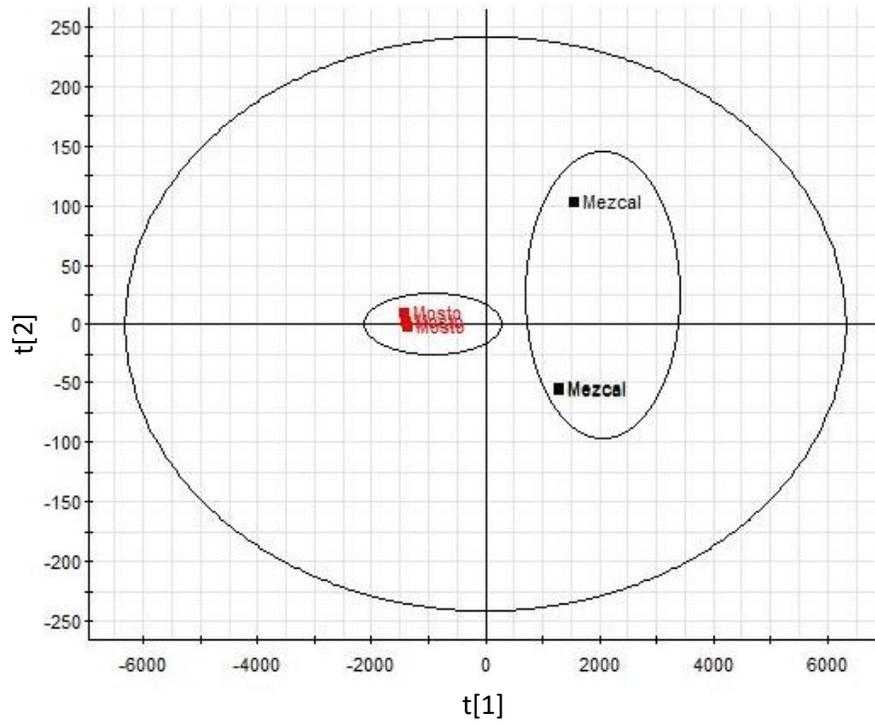


Figura 20. Análisis de Componentes Principales (PCA) para las 6 observaciones realizadas (3 extracto de mosto y 3 mezcal).

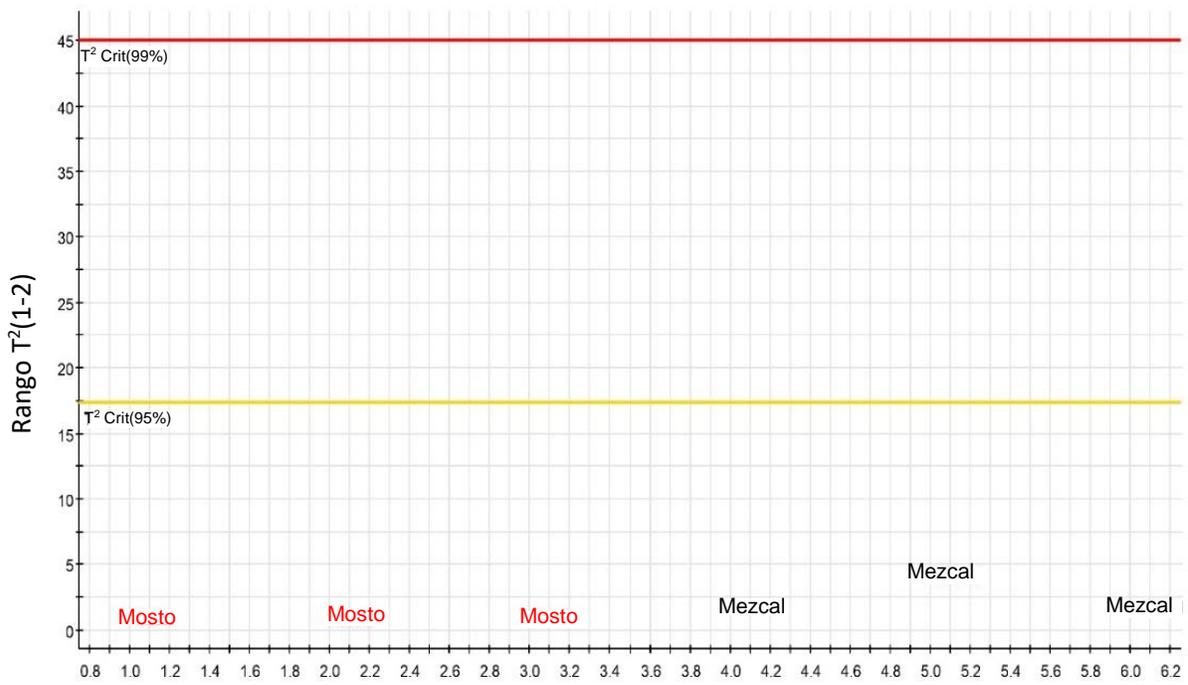


Figura 21. Modelo de Hotelling's T^2

El diagrama de cargas (Figura 22) muestra los pares METR (Masa Exacta-Tiempo de Retención) más alejados del origen, que indican las diferencias estadísticas entre las dos condiciones (Worley y Powers, 2013). Debido a que no existe diferencia significativa entre los valores de $R^2=99\%$ y $Q^2=99\%$ se corroboró la reproducibilidad de los resultados.

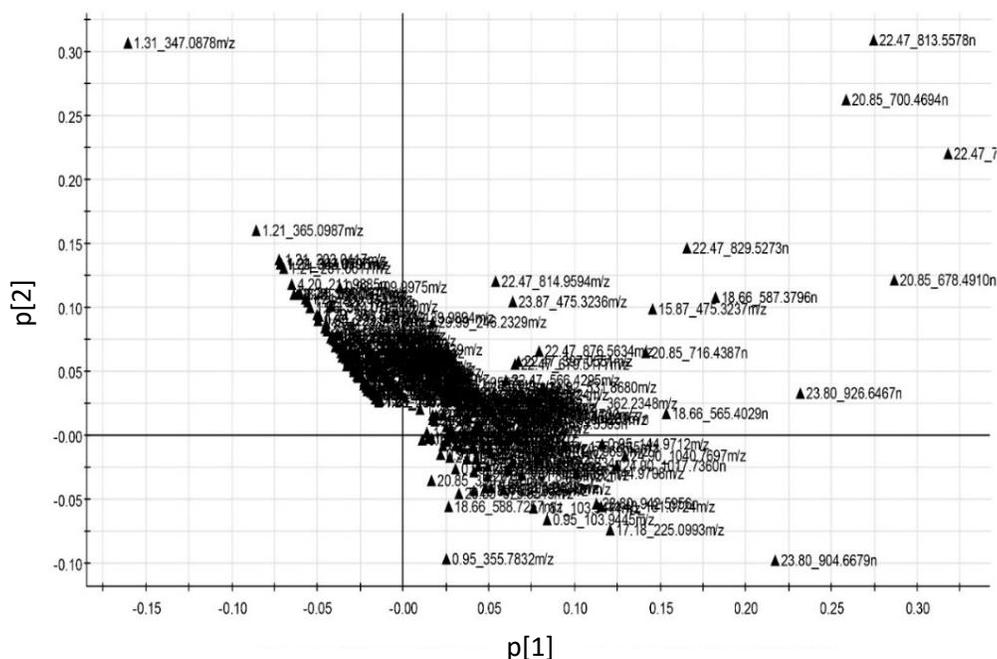


Figura 22. Diagrama de cargas.

8.5. Identificación de metabolitos en mosto y mezcal de *A. potatorum* por MS/MS

La búsqueda de componentes con la base de datos METLIN[®] arrojó 363 metabolitos con un rango de error de 5 ppm, entre los cuales se observaron algunos grupos importantes como alcaloides, carbohidratos, flavonoides, ácidos orgánicos y glicerofosfolípidos, Anexo II. De acuerdo con la presencia de patrones de fragmentación molecular en la base de datos con el modo de ionización utilizado en este trabajo, se seleccionaron 12 m/z pertenecientes a los grupos de flavonoides y alcaloides, compuestos de interés del grupo de trabajo por sus actividades biológicas. Se obtuvieron los perfiles de fragmentación molecular, 5 para extracto de mosto y 7 para mezcal (Tabla 6).

A partir de lo anterior se analizó únicamente 265.0862 m/z (M-H₂O+H) y su masa exacta 282.0892 m/z debido a que la base de datos METLIN[®] asignó 27 posibles compuestos (Apéndice

II) todos ellos isómeros, dentro de los cuales hubo metabolitos como flavonas, pterocarpanos, cumarinas, flavonoles, benzopiranos, chalconas, dihidrochalconas y derivados de fenantropirano.

Tabla 6. Lista de iones que se fragmentaron para su posterior identificación por comparación con las bases de datos.

No.	tr (min)	Masa (m/z)	Mosto	Mezcal	No.	tr (min)	Masa (m/z)	Mosto	Mezcal
1	1.29	325.1048	X		7	6.8	249.1473		X
2	1.29	271.0719	X		8	7.2	183.0520		X
3	1.29	509.1453	X		9	11.43	181.0724		X
4	1.29	649.2209	X		10	17.18	225.0993		X
5	1.31	158.0804	X		11	20.85	331.2471		X
6	2.81	265.0862		X	12	23.8	475.3236		X

Once de los 27 compuestos asignados tienen perfiles de fragmentación molecular en METLIN[®], con patrones de fragmentación similares, entre sí. Lo que representó una dificultad para realizar la asignación. Debido a esto, se buscó información espectral en la base de datos PubChem[®], pero los perfiles de algunos compuestos identificados corresponden a diferente modo de ionización, tipo de ionización, y energía de colisión a los empleados en este trabajo, por lo que no se consideraron.

Los perfiles de fragmentación molecular obtenidos con 20 y 40 V de energía de colisión presentaron demasiados fragmentos lo que complicó su interpretación, mientras que con 0 V no se observó la fragmentación del ion molecular. Por otro lado, el espectro adquirido con 10 V permitió la comparación con los datos espectrales en METLIN[®]. Se identificaron para el compuesto 6,4'-dimetoxiflavona, 3 fragmentos similares (283, 268 y 240 m/z) de los 11 observados en el espectro masas experimental. Por lo que se consideró para el resto de los compuestos, realizar la simulación de la fragmentación con 10 V de energía de colisión, con el programa Competitive Fragmentation Modeling for Metabolite Identification (<http://cfmid.wishartlab.com/>).

La comparación del espectro experimental con el obtenido de la simulación para el compuesto agrostophyllin mostró similitud con los fragmentos 283, 267, 265, 241, 237, 235 y 210 m/z y donde el pico base fue 282.0839 m/z , (Figura 23). Sin embargo, el error de masa calculado fue de 18.78 ppm, lo que indica una discrepancia entre el error de masa proporcionado por la base de datos METLIN[®] (1 ppm) y el error experimental para dicho compuesto. Lo anterior sugiere que la identificación dada hasta el momento es tentativa con 5.3 mDa de error. Por lo que se propone emplear en trabajos posteriores el uso de un estándar para corroborar la presencia de agrostophyllin en mezcal de *A. potatorum*. Agrostophyllin es un fenantropirano derivado de la ruta del ácido shiquímico/acetato-malonato, del grupo de los estilbenoides (https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?cpd:C10244). La presencia de agrostophyllin ha sido reportada en la familia de las orquídeas con alto potencial para tratar enfermedades como Alzheimer y cáncer, así como múltiples propiedades como antioxidantes, antialérgicos, actividad antiinflamatoria, antibacteriana, entre otras (Arora, Mahajan y Sembi, 2017). Por otra parte, agrostophyllin se identificó mediante UV-vis ($\lambda_{\text{máx}} = 226, 268$ y 300 nm), IR y NMR (Majumder y Sabzabadi, 1988). Este es el primer trabajo en donde se identifica tentativamente en el mezcal de *A. potatorum*, su presencia puede conferirle a la bebida una propiedad funcional análoga a la del resveratrol en el caso de los vinos.

Adicionalmente en la identificación de agrostophyllin se utilizó la herramienta del *Elemental Composition* del programa MassLynx, con un margen de error de 20 ppm y los elementos químicos C, H y O para la búsqueda; se observó que 282.0892 m/z correspondió a la masa molecular de la siguiente fórmula química $C_{17}H_{14}O_4$, cuyo modelo isotópico fue similar a lo observado experimentalmente: 100 % de abundancia para 282.0892 m/z , 20 % para 283.0926 m/z y 4 % para 284.0952 m/z . Por lo tanto, la fórmula empírica dada por la base de datos METLIN[®] coincidió con la arrojada por el *Elemental Composition* para la masa exacta 282.0892. Por otra parte, otro recurso estadístico utilizado para procesar los datos generados por el PCA fue una proyección ortogonal de estructuras latentes, a través de un análisis discriminante (OPLS-DA) (Guo, Cheng, Liu, Li, Wei y Ma, 2019), el cual es más robusto y genera información que permite diferenciar estadísticamente aquellas m/z que hacen diferentes a las condiciones 1 y 2, de este trabajo.

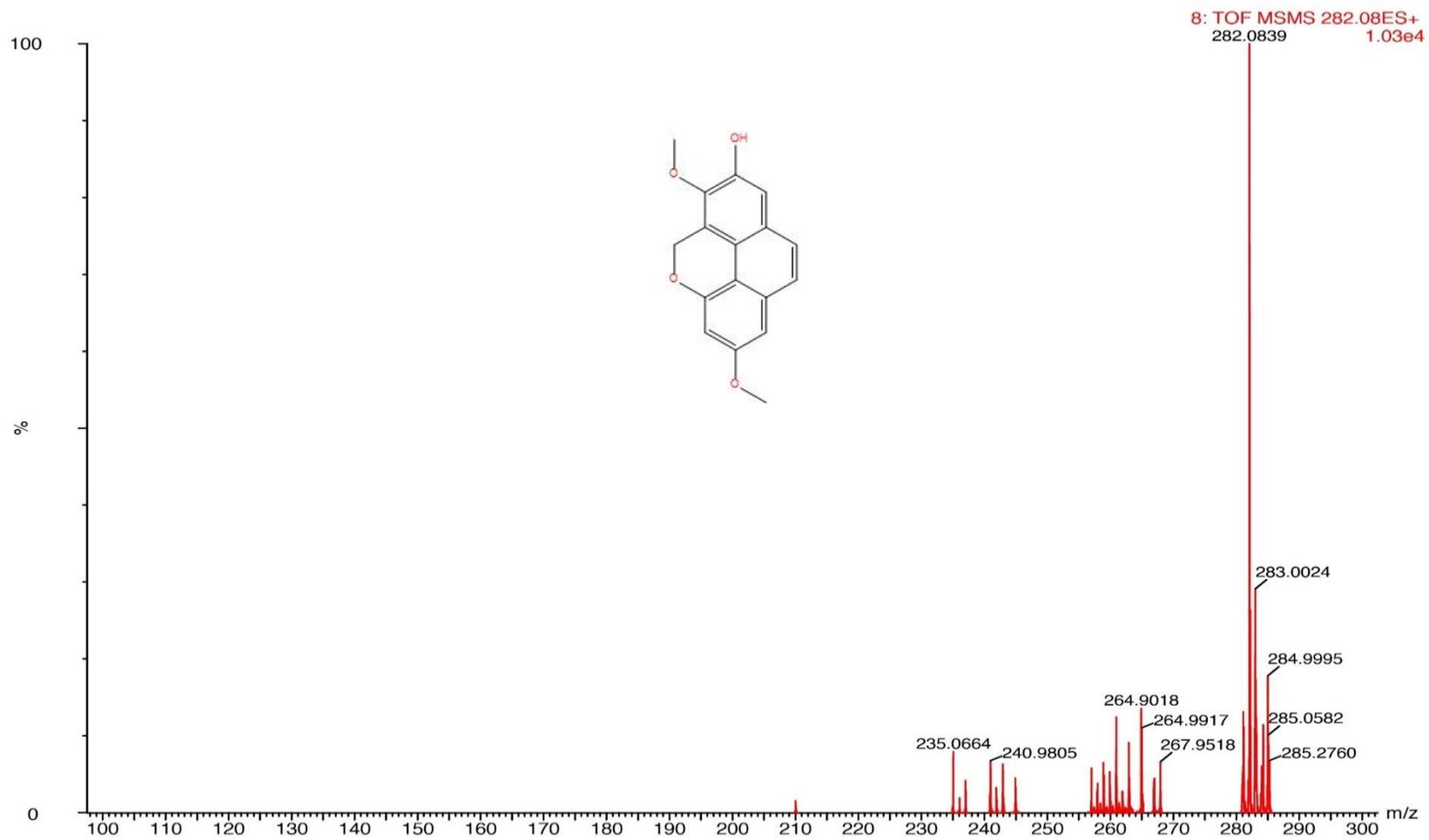


Figura 23. Patrón de fragmentación molecular del ion 282.0892 m/z , con una masa experimental de 282.0839 m/z obtenido con UPLC-QTOF-MS/MS-ESI (+). Energía de colisión de 10 V.

Por lo que, se obtuvo un gráfico S (Figura 24) utilizado comúnmente en metabolómica para la búsqueda de marcadores, en donde se observaron en la parte superior los componentes para el extracto de mosto y en la inferior los de mezcal. Dentro de los recuadros rojos se ubican las m/z que pueden utilizarse como marcadores. Es importante mencionar que no se observaron componentes con similitud estadística en ambas condiciones, debido a que no se consideraron aquellas m/z en el orden de ruido (10^2) que generalmente se ubican alrededor del eje Y. Por lo que a partir de este gráfico se generó una lista de componentes (Tabla 7).

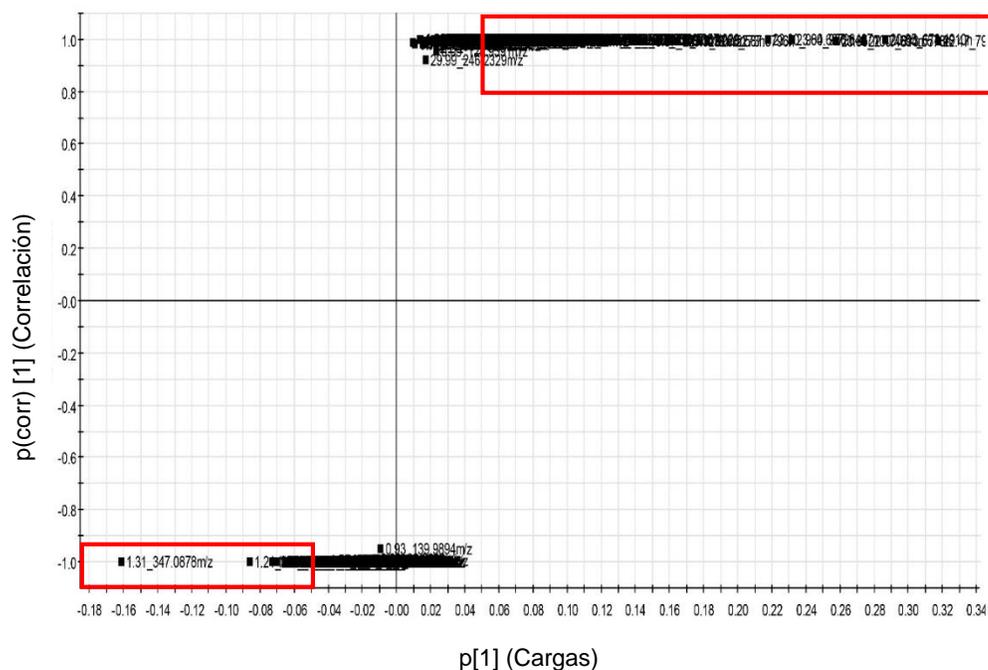


Figura 24. Gráfico S, obtenido por un OPLS-DA para la identificación de posibles marcadores de origen.

Tabla 7. Posibles marcadores (m/z) obtenidos a partir del gráfico S.

t_R (min)	Masa neutra	m/z	Extracto de Mosto	Mezcal
0.95		144.9712		X
0.95		103.9445		X
0.95		146.9690		X
1.21		203.0417	X	
1.21		365.0987	X	
1.21		281.0617	X	
1.21		200.0333	X	
1.21		290.0677	X	
1.22		362.0907	X	

1.22		533.1549	X	
1.29		506.1384	X	
1.31		347.0878	X	
1.31		344.0796	X	
1.66		344.0795	X	
1.81		144.9708		X
1.81		103.9444		X
1.81		146.9692		X
2.81		175.0165		X
3.22		389.0991	X	
4.20	211.9885	212.9964	X	
11.43		181.0724		X
12.17		362.2348		X
15.87		475.3237		X
15.87	452.3157	453.3405		X
17.18				X
18.66	587.3796	588.4118		X
18.66	565.4029	566.4289		X
18.66	603.3505	302.6826		X
20.85	678.4910	340.2528		X
20.85	700.4694	701.5003		X
20.85	716.4387	359.2266		X
20.85		566.4289		X
20.85		763.4730		X
22.47	791.5795	396.7970		X
22.47	813.5578	814.5903		X
22.47	829.5273	415.7710		X
22.47		397.0551		X
22.47		876.5634		X
22.47		679.5177		X
23.80	904.6679	453.3412		X
23.80	926.6467	927.6803		X
23.80	942.5956	472.3149		X
23.87		475.3236		X
24.90	1017.7360	509.8853		X
24.90		1040.7697		X
24.90	1055.6834	528.8591		X
24.92		531.8680		X

Los resultados de este trabajo generaron información importante, a la fecha este es el primer estudio en donde se exploró la composición química de extracto de mosto y mezcal de *A. potatorum*, mediante UHPLC-QTOF, identificándose compuestos como alcaloides, ácidos orgánicos, carbohidratos, glicerosfolipidos y polifenoles. Estos últimos son de los

compuestos más abundantes en la naturaleza, por lo que la obtención de un perfil polifenólico se considera una excelente herramienta para la caracterización química, tipificación y autenticación de especies (Ávila Sevilla, 2010; Almaraz-Abarca, Delgado-Alvarado, Hernández-Vargas, Ortega-Chávez, Orea-Lara, Cifuentes-Díaz de León, et al., 2009). Existen escasos reportes de perfiles polifenólicos para el género agave (Almaraz-Abarca, Delgado-Alvarado, Ávila-Reyes, Uribe-Soto y González-Valdez, 2013). Por lo que la identificación de estos compuestos en extracto de mosto y mezcal podrían ser utilizados como una alternativa para la detección de adulteraciones de la bebida.

Por otra parte, el método recomendado por la NOM-070-SCFI para el análisis de la calidad de esta bebida es GC-MS, esta técnica tiene como limitante la detección de compuestos no volátiles y estables térmicamente. El uso de UHPLC-QTOF tiene ventajas como la resolución y separación de mezclas complejas de componentes no volátiles debido al uso de presiones superiores a 60 MPa, que eficienta el análisis cromatográfico. Dicha técnica analítica puede complementar los análisis por GC-MS proporcionando resultados completos respecto a la caracterización química del mezcal.

Adicionalmente, es importante considerar que el uso de metabolómica no dirigida, empleada en este trabajo, facilita la identificación de metabolitos en mezclas complejas como el extracto de mosto y mezcal, al permitir la identificación de compuestos mediante el uso de información espectral en las bases de datos. Sin embargo, otra manera de caracterizar metabolitos es mediante metabolómica dirigida con el uso de estándares. Es por ello, que la obtención del estándar de agrostophyllin, permitirá confirmar la identificación y cuantificación de este metabolito.

9. CONCLUSIONES

El análisis de los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis generó las siguientes conclusiones:

1. La base de datos METLIN[®] identificó 363 metabolitos en el extracto de mosto y mezcal de *A. potatorum* dentro de los cuales se encuentran compuestos fenólicos, alcaloides y carbohidratos.
2. Se establecieron las condiciones de separación y detección del extracto de mosto y mezcal de *A. potatorum* empleando UHPLC-QTOF con electronebulización en modo positivo.
3. El uso de un UPLC-QTOF para el análisis de mosto y mezcal de *A. potatorum*, permitió la identificación de metabolitos como posibles marcadores de especie.
4. Se observó similitud cromatográfica para el extracto de mosto y mezcal provenientes de *A. potatorum*, sin embargo, durante el análisis de componentes no se detectaron m/z similares entre las dos condiciones evaluadas.
5. Los perfiles de fragmentación molecular que se obtuvieron con energía de colisión de 10 V permitieron la comparación con la información espectral de la base de datos METLIN[®], los obtenidos con 20 y 40 V mostraron fragmentación inespecífica.
6. A partir de la masa exacta y de una simulación del patrón de fragmentación molecular se identificó tentativamente el compuesto agrostophyllin, siendo la primera vez que se reporta en agave, específicamente en el mezcal de *A. potatorum*.

10. PERSPECTIVAS

1. Para confirmar la presencia de agrostophyllin en mezcal de *A. potatorum* se recomienda realizar la comparación del espectro de la fragmentación molecular de un estándar comercial y la muestra de mezcal, obtenidos por UHPLC-QTOF.
2. Continuar con el análisis de los espectros de fragmentación molecular para las 11 m/z no analizadas en este trabajo. Asimismo, es recomendable utilizar otras bases de datos y los perfiles de fragmentación encontrados en artículos para la comparación espectral de las m/z restantes, tomando en consideración el error de masa de 5 ppm para la identificación adecuada.
3. En el presente trabajo, se determinó la caracterización química empleando un UPLC-QTOF de dos etapas del proceso de elaboración del mezcal: fermentación y destilación; por lo que se recomienda en futuros trabajos implementar dicha técnica en todas las etapas con el objetivo de identificar metabolitos a lo largo del proceso, que permitan evaluar la trazabilidad del producto.
4. El análisis comparativo entre lotes y especies de agave utilizadas en la producción de mezcal mediante UHPLC-QTOF, permitirá la identificación de marcadores químicos de origen y/o de especie para la obtención de una huella cromatográfica.

11. REFERENCIAS

- Abián, J., Carrascal, M., y Gay, M. (2008). Introducción a la espectrometría de masas para la caracterización de péptidos y proteínas en proteómica. *Proteómica*, 2,16-35.
- Almaraz-Abarca, N., Delgado- Alvarado, E., Ávila-Reyes, J., Uribe-Soto, J., y González-Valdez, L. (2013). The phenols of the genus *Agave* (Agavaceae). *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 4(3), 9-16. DOI: 10.4236/jbnb.2013.43A002.
- Almaraz-Abarca, N., Delgado-Alvarado., E. A., Hernández-Vargas, V., Ortega-Chávez, M., Orea-Lara, G., Cifuentes-Díaz de León, A., Ávila-Reyes, J. A., y Muñoz-Martínez, R. (2009). Profiling of phenolic compounds of somatic and reproductive tissues of *Agave durangensis* Gentry (Agavaceae). *American Journal of Applied Sciences*, 6(6), 1076-1085. DOI: 10.3844/ajassp.2009.1076.1085
- Arora, M., Mahajan, A., Sembi, J. K. (2017). A review on phytochemical and pharmacological potential of family orchidaceae. *International. Research. Journal of. Pharmacy*, 8(10), 9-24. DOI: 10.7897/2230-8407.0810176
- Ávila Sevilla (2010). *Caracterización molecular y química de Agave victoriae-reginae* T. Moore (Agavaceae). (Tesis de maestría) Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral y Regional Durango. Durango, México.
- Ayala Bretón, C., y De Regil Hernández, R. (2004). Secuenciación de proteínas por espectrometría de masas. [Material de aula] Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca, Morelos.
- Barker, J. (1999). *Mass Spectrometry*. England, UK: J Wiley & Sons Ltd.
- Barriada-Bernal, L. G., Almaraz-Abarca, N., Delgado-Alvaro, E. A., Gallardo-Velázquez, T., Ávila-Reyes, J. A., Torres-Morán, M. I., González-Elizondo, M., y Herrera-Arrieta, Y. (2014). Flavonoid composition and antioxidant capacity of the edible flowers of *Agave durangensis* (Agavaceae). *CyTA-Journal of Food*, 12(2), 104-114. DOI: 10.1080/19476337.2013.801037

- Calderón Santiago, M. (2014). *Espectrometría de masas para la identificación y cuantificación de biomarcadores metabolómicos en análisis clínico*. (Tesis doctoral) Universidad de Córdoba. Córdoba, España.
- Cao, M., Han, Q., Zhang, J., Zhang, R., Wang, J., Gu, W., Kang, W., Lian, K., y Ai, L. (2019). An untargeted and pseudotargeted metabolomics combination approach to identify differential markers to distinguish live from dead pork meat by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. Artículo in press. DOI: 10.1016/j.chroma.2019.460553
- Carrillo-Trueba, L. A. (2007). Los destilados de agave en México y su denominación de origen. *Ciencias*. 87(3), 41-49. Recuperado de <https://www.revistaciencias.unam.mx/es/48-revistas/revista-ciencias-87/283-los-destilados-de-agave-en-mexico-y-su-denominacion-de-origen.html>
- Chavez-Parga, M. D. C., Pérez Hernández, E., y González Hernández, J. C. (2016). Revisión del agave y el mezcal. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 18(1), 1-21. DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v18n1.49552
- Chawla, G., y Ranjan, C. (2016). Principle, instrumentation, and applications of UPLC: A novel technique of liquid chromatography. *Open Chemistry Journal*, 3, 1-16. DOI: 10.2174/1874842201603010001
- Conabio (2006). *Mezcales y diversidad*. 2a ed. Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad. México.
- Consejo Regulador del Mezcal (2019). *Informe estadístico 2018*. Recuperado de crm.org.mx/PDF/INF_ACTIVIDADES/INFORME2018.pdf
- Crawford Scientific (2007). *Incidencias y mantenimiento en HPLC*. Recuperado de <https://es.slideshare.net/lilianasc/incidencias-y-mantenimientoenhplc>
- De León-Rodríguez, A., Escalante-Minakata, P., Jiménez-García, M., Ordoñez-Acevedo, L., Flores Flores, J., y Barba de la Rosa, A. (2008). Characterization of volatile compounds from ethnic Agave alcoholic beverages by gas chromatography-mass spectrometry. *Food Technology and Biotechnology*, 46(4), 448-455.

- De León-Rodríguez, A., González-Hernández, L., Barba de la Rosa, A.P., Escalante-Minakata, P., y López, M.G. (2006). Characterization of volatile compounds of mezcal, an ethnic alcoholic beverage obtained from *Agave salmiana*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(4),1337-1341. DOI: 10.1021/jf052154+
- Delgado-Lemus, A., Casas, A., y Téllez, O. (2014). Distribution, abundance and traditional management of *Agave potatorum* in the Tehuacan Valley, Mexico: bases for sustainable use of non-timber forest products. *Journal of Ethnobiology Ethnomedicine*, 10(63), 1-12. DOI:10.1186/1746-4269-10-63
- Félix-Valdez, L.I. (2014). *Patrones de diversidad y estructura genética de Agave potatorum Zucc. e implicaciones en su manejo in situ* (Tesis de maestría). Universidad de Guadalajara, Jalisco, México.
- García-Mendoza, A. (2002). Distribution of agave (Agavaceae) in Mexico. *Cactus and Succulent Journal*, 74(4), 177-187.
- García-Mendoza, A. (2010). Revisión taxonómica del complejo *A. potatorum* Zucc. (Agavaceae): nuevos taxa y neotipificación. *Acta Botánica Mexicana*, 91,71-93.
- García-Mendoza, A. (2012). México país de magueyes. *La Jornada del campo*. Recuperado de <https://www.jornada.com.mx/2012/02/18/cam-pais.html>
- Gómez-Zamora, O., De Jesús-Fuentes, K. I., Peñafiel-López, F., y Tovar-Hernández, P. (2016). Perfil químico y organoléptico de los compuestos volátiles del mezcal. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 1(1), 916-923. Recuperado de <http://www.fcb.uanl.mx/IDCyTA/files/volume1/1/10/158.pdf>
- Guo, X., Cheng, X., Liu, W., Li, M., Wei, F., Ma, S. (2019). Identification of velvet antler and its mixed varieties by UPLC-QTOF-MS combined with principal component analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 165 (1), 18-23. DOI: 10.1016/j.jpba.2018.10.009
- Harris, D. (2010). *Análisis Químico Cuantitativo*. Barcelona, España: Reverté.
- Hoffman, E., y Stroobant, V. (2007). *Mass Spectrometry*. England, UK: J Wiley & Sons Ltd.

- Illsley-Granich, C., Gómez-Alarcón, T., Rivera Méndez, G., Morales Moreno, M., García Bazán, J., Ojeda Sotelo, A., Calzada Rendón, M., y Mancilla Nava, S. (2005). *Conservación in situ y manejo campesino de magueyes mezcaleros*. Grupo de estudios ambientales AC. Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. V028, México.
- IMPI (2018). *Declaración General de Protección a la Denominación de Origen "Mezcal"*. Recuperado en www.gob.mx/impi/articulos/
- Khan, H., y Ali, J. (2015). UHPLC/Q-TOF-MS Technique: Introduction and applications. *Letters in Organic Chemistry*, 12(6), 371-378. DOI: 10.2174/1570178612666150331204147
- Lachenmeier, W. D., Sohnius, E., Attig, R., y López, M. G. (2006). Quantification of selected volatile constituents and anions in mexican agave spirits (tequila, mezcal, sotol, bacanora). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(11), 3911-3915. DOI: 10.1021/jf060094h
- López-Cruz, J. Y., Martínez-Gutiérrez, G. A., y Caballero-García, A. (2016). Diagnóstico de la situación del agave-mezcal y opciones de desarrollo local en comunidades indígenas de Oaxaca. En AMECIDER 2016 (Soc. Iván Sánchez Cervantes). 21° *Encuentro Nacional sobre Desarrollo Regional en México*. El desarrollo regional frente al cambio ambiental y la transición hacia la sustentabilidad. ISBN: 978-607-96649-2-3
- Majumder, P.L., y Sabzabadi E. (1988). Agrostophyllin, a naturally occurring phenanthropyran derivate from *Agrostophyllum khasiyanum*. *Phytochemistry*, 27(6), 1899-1901. DOI: 10.1016/0031-9422(88)80477-1
- Martín Gómez, M., y Ballesteros González, M. (2010). Espectrometría de masas y análisis de biomarcadores. *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 30 (1),113-168. DOI: ES/monoranf.v0i0.1066
- Martínez-Aguilar, J. F., y Peña-Álvarez, A. (2009). Characterization of five typical agave plants used to produce mezcal through their simple lipid composition analysis by gas

- chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(5), 1933-1939. DOI: 10.1021/JF802141d
- Medina Valtierra, G., Juárez Ciprés, R., y Peña Alvarez, A. (2011). Identification and quantification of aldehydes in mezcal by solid phase microextraction with on-fiber derivatization-gas chromatography. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 55(2), 84-88. ISSN: 1870-249X
- Morales, I., Martínez Gutiérrez, G. A., Cortés-Martínez, C. J., Aquino Bolaños, T., Escamirosa Tinoco, C., y Hernández Tolentino, M. (2017). Crecimiento de *A. potatorum* cultivado en ambientes contrastantes y fertilización. *Revista Mexicana de Agroecosistemas*, 4(2), 18-27. ISSN: 2017-9559
- Olvera-García, V., Martín del Campo, S. T., Gutiérrez-Urbe, J. A., y Cardador-Martínez. A., (2015). GC-MS and HPLC-MS-TOF characterization of *Agave atrovirens* extracts. A preliminary study. *Industrial Crops and Products*, 78, 39-47. DOI: 10.1016/j.indcrop.2015.09.068
- Ortiz-Bravo, E.G. (2006). *Influencia de glicina o sulfato de amonio en la fermentación de Agave potatorum* Zucc “Tobalá” (Tesis de licenciatura). Universidad Tecnológica de la Mixteca, Huajuapán de León, México.
- Palma, F., Pérez, P., y Meza, V. (2016). Diagnóstico de la cadena de valor del mezcal en las regiones de Oaxaca. Recuperado de <http://www.coplade.oaxaca.gob.mx/wp-content/uploads/2017/04/Perfiles/AnexosPerfiles/6.%20CV%20MEZCAL.pdf>
- Peña-Álvarez, A., Díaz, L., Medina, A., Labastida, C., Capella, S., y Vera, L. E. (2004). Characterization of three agave species by gas chromatography and solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1027(1-2), 131-136. DOI: 10.1016/j.chroma.2003.10.082
- Pérez Valencia, D. M. (2009). *Estudio de la robustez del estadístico T2 de Hotelling para el caso de una y dos poblaciones cuando los datos provienen de una distribución normal sesgada*. (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia. Medellín, Colombia.

- Plascencia Villa, G. (2003). Espectrometría de masas. [Material del aula] Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca, Morelos.
- Reche, R.V., Leite Neto, A.F., Da Silva, A. A., Galinaro, C.A., De Osti, R.Z., y Franco D.W. (2007). Influence of type of distillation apparatus on chemical profiles of brazilian cachacas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(16), 6603-6608. DOI: /10.1021/jf0704110
- Rodríguez Madrera, R., Blanco Gomis, D., y Mangas Alonso, J.J. (2003) Influence of distillation system, oak wood type, and aging time on volatile compounds of cider brandy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(19), 5709-5714. DOI: /10.1021/jf034280o
- NOM-070-SCFI-2016 Bebidas alcohólicas. Mezcal-especificaciones. *Norma Oficial Mexicana, Dirección General de Normas.*
- Swartz, M. E. (2005). UPLCTM: An introduction and review. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 28(7-8), 1253-1263. DOI: 10.1081/JLC-200053046
- Taleuzzaman, M., Ali, S., Gilani, S., Imam, I., y Hafeez, A. (2015). Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC): A review. *Austin Journal of Analytical and Pharmaceutical Chemistry*, 2(6), 1056-1061. ISSN: 2381-8913
- Tsakiris, A., Kallithraka, S., y Kourkoutas, Y. (2014). Grape brandy production, composition and sensory evaluation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(3), 404-414. DOI: 10.1002/jsfa.6377
- Vera-Guzmán A. M, Guzmán-Géronimo R. I. y López M. (2010). Major and minor compounds in a mexican spirit, young mezcal coming from two agave species. *Czech Journal Food Sciences*, 28(2), 127-132. DOI: 10.17221/56/2009-CJFS
- Vera-Guzmán, A. M, Santiago García, P. A., y López, M. G. (2009). Compuestos volátiles aromáticos generados durante la elaboración de mezcal de *Agave angustifolia* y *Agave potatorum*. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 32(4), 273-279. ISSN:0187-7380

- Vera-Guzmán, A. M., Guzmán-Géronimo, R. I., López, M. G., y Chávez-Servia, J. L. (2018). Volatile compound profiles in mezcal spirits as influenced by agave species and production processes. *Beverages*, 4(1), 1-10. DOI: 10.3390/beverages4010009
- Waters Corporation (2014). *Beginners Guide to Liquid Chromatography*. Recuperado de https://www.waters.com/waters/es_MX/HPLC---High-Performance-Liquid-Chromatography-Explained/nav.htm?locale=es_MX&cid=10048919
- Waters Corporation (2015). ACQUITY UPLC Columns: exceed expectation [Folleto].
- Wiklund, S. (2008). *Multivariate Data Analysis for Omics*. Umetrics.
- Worley, D., y Powers, R. (2013). Multivariate Analysis in Metabolomics. *Current Metabolomics*, 1(1), 92-107. DOI: 10.2174/2213235X11301010092
- Wu, H., Chen, Y., Li, Z., Liu, X. (2018). Untargeted metabolomics profiles delineate metabolic alterations in mouse plasma during lung carcinoma development using UPLC-QTOF/MS in MS^E mode. *Royal Society Open Science*, 5(9), 1-13.

ANEXO

Anexo I

Tabla A1. Agaves mezcaleros.

Especie de agave	Nombre común del mezcal	Características
<i>A. angustifolia</i>	Espadín Espadilla Amole	Roseta: 1.5 m de ancho y 1 m de alto. Hojas: rectas, angostas y rígidas, verde claro a grisáceo. Espinas: pequeñas. Inflorescencia: ramificada, hasta 5 m de alto. Floración: enero a mayo en el norte, julio a octubre en el sur. Reproducción: semilla, bulbillo e hijuelo.
<i>A. salmiana</i>	Cimarrón Chino Bronco	Roseta: 2 m de ancho y 1.5 m de alto. Hojas: lanceoladas y gruesas, verde oscuro. Espinas: grandes y anchas. Inflorescencia: ramificada, hasta 8 m de alto. Floración: mayo a septiembre. Reproducción: semilla e hijuelo.
<i>A. maximilliana</i>	Ticolote Lechugilla	Roseta: 1.5 m de ancho y 0.8 m de alto. Hojas: lanceoladas y anchas, verde claro. Espinas: grandes y pequeñas intercaladas. Inflorescencia: ramificada, hasta 8 m de alto. Floración: enero a mayo. Reproducción: semilla.
<i>A. rhodacantha</i>	Mexicano Quixe	Roseta: 4 m de ancho y 2 m de alto. Hojas: rectas y fibrosas, verde a verde claro. Espinas: pequeñas y oscuras. Inflorescencia: ramificada, hasta 9 m de alto. Floración: mayo a agosto. Reproducción: semilla e hijuelo.
<i>A. univittata</i>	Lechuguilla Estoquillo Mezortillo	Roseta: 0.8 m de ancho y 0.5 m de alto. Hojas: angostas, delgadas, verde claro. Espinas: pequeñas y grisáceas. Inflorescencia: espigada, hasta 4.5 m de alto. Floración: marzo a junio. Reproducción: semilla e hijuelo.
<i>A. durangensis</i>	Cenizo Mexicano	Roseta: 2 m de ancho y 1.5 m de alto. Hojas: anchas y cóncavas, verde grisáceo. Espinas: grandes y prominentes. Inflorescencia: ramificada, hasta 4.5 m de alto. Floración: julio a noviembre. Reproducción: semilla e hijuelo.
<i>A. inaequidens</i>	Hocimett Bruto	Roseta: 2.5 m de ancho y 1.5 m de alto. Hojas: onduladas, verde claro a amarillento.

	Lechugilla	Espinas: grandes y pequeñas, alternadas. Inflorescencia: ramificada, hasta 7 m alto. Floración: diciembre a marzo. Reproducción: semilla.
<i>A. cupreata</i>	Papalote Papalometl Yaabendisi	Roseta: 1 m de ancho y 0.8 m de alto. Hojas: ampliamente lanceoladas, verde brillante. Espinas: grandes y curvas de color cobre. Inflorescencia: ramificada hasta 6 m de alto. Floración: enero a marzo. Reproducción: semilla.
<i>A. marmorata</i>	Tepeztate Pitxometl Curandero	Roseta: 2 m de ancho y 1.5 m de alto. Hojas: onduladas y abiertas, con líneas horizontales sobre el verde oscuro. Espinas: grandes. Inflorescencia: ramificada, hasta 6 m de alto. Floración: abril a junio. Reproducción: semilla.
<i>A. potatorum</i>	Tobalá Papalometl De monte	Roseta: 1 m de ancho y 0.7 m de alto. Hojas: ovaladas, márgenes onduladas, verde a blancuzco. Espinas: curvas y oscuras. Inflorescencia: ramificada, hasta 4 m de alto. Floración: septiembre a diciembre. Reproducción: semilla.
<i>A. americana</i>	Serrano Teometl Americano	Roseta: 3 m de ancho y 2 m de alto. Hojas: lanceoladas, verde a blancuzco. Espinas: cortas, grisáceas. Inflorescencia: ramificada, hasta 9 m de alto. Floración: mayo a septiembre. Reproducción: semilla e hijuelo.
<i>A. karwinskii</i>	Cirial Tobasiche Cuishe Madrecuishe	Roseta: 1.5 m de ancho y 1.5 m de alto, sobre un tronco de hasta 2.5 m. Hojas: rectas y angostas, verde oscuro. Espinas: pequeñas. Inflorescencia: ramificada, hasta 3.5 m de alto por encima de la planta. Floración: junio a septiembre. Reproducción: semilla, hijuelo, bulbillo.
<i>A. americana var. oaxacensis</i>	Arroqueño Sierra negra Castilla	Roseta: 3 m de ancho y 2 m de alto. Hojas: rectas y blanquecinas. Espinas: diminutas o ausentes. Inflorescencia: ramificada, hasta 10 m de alto. Floración: junio a agosto. Reproducción: semilla e hijuelo.

Anexo II

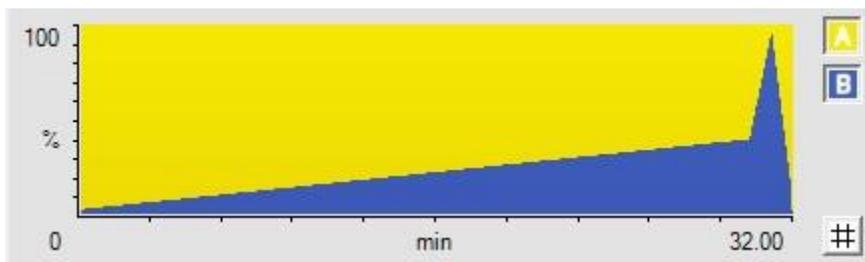


Figura 25. Gradiente utilizado en la prueba 1, 2, 5 y 6.

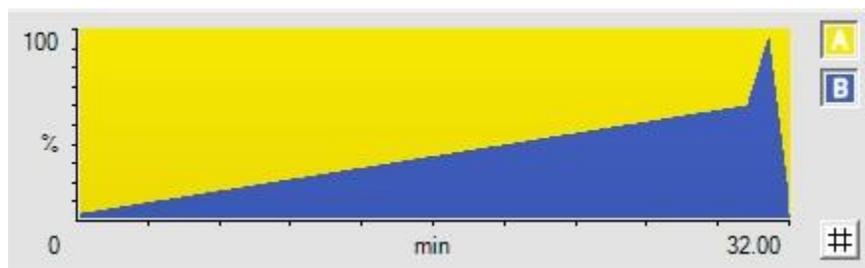


Figura 26. Gradiente utilizado en la prueba 3.

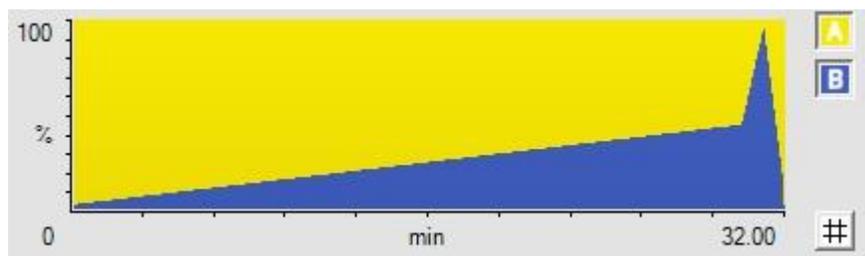


Figura 27. Gradiente utilizado en la prueba 4.

APÉNDICE

Apéndice I

Tabla B1. Compuestos volátiles identificados en mezcal de diferentes especies de agave.		Vera-Guzmán et al., 2018	Guzmán et al., 2009	López et al., 2006
	Componente			
	Alcoholes			
1	2-metil-1-propanol	o	o	o
2	3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol	o		
3	4-metil-1-(1-metiletil)-3-ciclohexen-1-ol	o		
4	Estragol	o		
5	4-trimetil-3-ciclohexen-1-metanol	o		
6	2,3-dihidro-1-H-inden-1-ol	o		
7	2,4-bis(1,1-dimetiletil)-fenol	o		
8	Propanol		o	
9	1-butanol	o		o
10	3-metil-1-butanol		o	o
11	3-metil-3-buten-1-ol			o
12	Ciclopentanol			o
13	4-metil-1-pentanol			o
14	3-metil-1-pentanol			o
15	3-metil-ciclopentanol			o
16	1-hexenol	o		o
17	3-etoxi-1-propanol			o
18	Butan-2,3-diol			o
19	1-octanol			o
20	Decanol			o
21	Alcohol benéfico	o		o
22	Alcohol fenéfico	o	o	o
23	1-hexadecanol			o
24	Etanol	o	o	o
25	2-metil-1-propanol	o	o	
26	Eucaliptol	o		
27	2-(3-)-metil-1-butanol	o		
28	1-pentanol	o		
29	1-heptanol	o		
30	2-metoxifenol			
31	Fenol			
32	2-etilfenol			
33	4-metil-fenol			
34	3-metil-fenol			
35	2-etil-6-metil-fenol			
36	2-metoxi-3-(2-propenil)-fenol			
37	4-etilfenol			
	Esteres			
38	Acetato de isoamilo	o	o	o
39	Pentanoato de etilo	o		
40	Heptanoato de etilo	o		
41	Acetato de etilo		o	
42	Etil furoato	o		
43	Hexanoato de etilo	o		o
44	2-hidroxiopropanoato de etilo	o	o	o

45	Octanoato de etilo	0	0	0
46	Decanoato de etilo	0	0	0
47	Butandecanoato de dietilo			0
48	Acetato de fenetilo	0	0	0
49	Dodecanoato de etilo		0	0
50	2-ciclohexeno-1-acetato de hidroxietilo			0
51	Tetradecanoato de etilo			0
52	Hexadecanoato de etilo			0
53	(R)-2-butenato de etilo			0
54	9,12-octadecadienoato de etilo			0
55	9,12,15-octadecatrienoato de metilo			0
	Ácidos			
56	Ácido acético	0	0	0
57	Ácido propanoico	0	0	0
58	Ácido dimetilpropanoico			0
59	Ácido butanoico	0	0	0
60	Ácido 3-metilbutanoico	0	0	
61	Ácido pentanoico	0		0
62	Ácido 4-metilpentanoico			0
63	Ácido 2-hidroxipropanoico		0	
64	Ácido 2-metilpropanoico	0	0	
65	Ácido hexanoico	0		0
66	Ácido heptanoico			0
67	Ácido octanoico	0		0
68	Ácido nonanoico			0
69	Ácido decanoico			0
70	Ácido benzoico			0
71	Ácido tetradecanoico			0
72	Ácido dodecanoico			0
73	Ácido pentadecanoico			0
74	Ácido hexadecanoico			0
	Furanos			
75	Dihidro-2-metil-3(2H)-furanona			0
76	5-eteniltetrahydro-furanona			0
77	Trimetil-2-furanmetanol			0
78	Furfural	0	0	0
79	1-(2-furanil) etanona	0	0	0
80	5-metil-2-furancarboxaldehído	0	0	0
81	Dihidro-5-metil-2(3H)-furanona			0
74	2-furanmetanol		0	0
75	Ácido 4-hexil-2,5-dihidro-2,5-dioxo-3-furanacetico			0
	Cetonas			
76	Ciclopentanona	0		0
77	3-hidroxi-2-butanona			0
78	3-etil-ciclopentanona			0
79	3,4-dimetil-2-ciclopenten-1-ona			0
80	3-metil-2-ciclopenten-1-ona	0		0
81	2,3-dimetil-2-cyclopenten-1-ona			0
82	1-(1 H-pirrol-2-il) etanona			0
	Terpenos			
83	Linalool			0
84	Terpineol			0
85	Farnesol			0
	Otros			
86	Piridina			0

87	1,1,3-trietoxipropano			0
88	Benzaldehído	0		0
89	1,8-dimetil naftaleno			0
90	Naftaleno	0	0	0
91	2,6-dimetil naftaleno			0
92	Acenaftileno			0
93	Fluoreno			0
94	Fenantreno			0
95	1,3,5-trimetil benceno	0		
96	1-metil-4-propil-benceno	0		
98	1-metil-2-(1-metiletil)benceno	0		
99	2-nonano	0		
100	1,3-bis(1,1-dimetiletil)-benceno	0		
101	1,2,3,4-tetrametil benceno	0		
102	1-metoxi-4-(1-propenil)-benceno	0		
103	4-metoxibenzaldehído	0		

Apéndice II

Tabla B2. Asignaciones para las 12 m/z obtenidas a través de la base de datos METLIN®

No.	Compuesto	Masa	Aducto	m/z	tr (min)	Error (ppm)
1	Pirimetamina-3-N-óxido	264.0778	[M+H] ⁺	265.0862	2.81	4
2	Pirimetamina-1-N-óxido		[M+H] ⁺	265.0862	2.81	4
3	N-acetil cistationina	264.0780	[M+H] ⁺	265.0862	2.81	3
4	2'-hidroxifuranol[2'',3''':4',3'] chalcona	264.0786	[M+H] ⁺	265.0862	2.81	1
5	Aspartil-metionina	264.0780	[M+H] ⁺	265.0862	2.81	3
6	Metionil-aspartato	264.7080	[M+H] ⁺	265.0862	2.81	3
7	Gama-glutamil-S-metilcisteina	264.7080	[M+H] ⁺	265.0862	2.81	3
8	Carajurin	300.0998	[M-2H ₂ O+H] ⁺	265.0862	2.81	3
9	2'-hidroxi-metoxi-4',5'- metilenedioxiflavanona	300.0998	[M-2H ₂ O+H] ⁺	265.0862	2.81	3
10	3'-metoxidihidroformononetina	300.0998	[M-2H ₂ O+H] ⁺	265.0862	2.81	3
11	Sativanona	300.0998	[M-2H ₂ O+H] ⁺	265.0862	2.81	3
12	Isosativanona	300.0998	[M-2H ₂ O+H] ⁺	265.0862	2.81	3
13	Metilinisolin	300.0998	[M-2H ₂ O+H] ⁺	265.0862	2.81	3
14	(6aR,11aR)-8-hidroxi-3,9- dimetoxipterocarpano	300.0998	[M-2H ₂ O+H] ⁺	265.0862	2.81	3
15	7-hidroxi-3,9-dimetoxipterocarpano (6aR,11aR)-2,3-dimethoxy-6a,11a-	300.0998	[M-2H ₂ O+H] ⁺	265.0862	2.81	3
16	dihydro-6H-[1]benzofuro[3,2- c]chromen-9-ol	300.0998	[M-2H ₂ O+H] ⁺	265.0862	2.81	3
17	2-metoximedicarpano	300.0998	[M-2H ₂ O+H] ⁺	265.0862	2.81	3
18	4-hidroxihomopterocarpano	300.0998	[M-2H ₂ O+H] ⁺	265.0862	2.81	3
19	4-metoximedicarpano	300.0998	[M-2H ₂ O+H] ⁺	265.0862	2.81	3
20	6a-hidroxi-3,9-dimetoxipterocarpano	300.0998	[M-2H ₂ O+H] ⁺	265.0862	2.81	3
21	Soforacarpano A	300.0998	[M-2H ₂ O+H] ⁺	265.0862	2.81	3
22	Astraciceran	300.0998	[M-2H ₂ O+H] ⁺	265.0862	2.81	3
23	2'-O-metilsepiol	300.0998	[M-2H ₂ O+H] ⁺	265.0862	2.81	3
24	Haginina A	300.0998	[M-2H ₂ O+H] ⁺	265.0862	2.81	3
25	Odoriflaveno	300.0998	[M-2H ₂ O+H] ⁺	265.0862	2.81	
26	7,2'-dihidroxi-8,4'-dimetoxiisoflav-3- eno	300.0998	[M-2H ₂ O+H] ⁺	265.0862	2.81	3
27	(S)-3'-hidroxi-4,4'-dimetoxidalbergiona	300.0998	[M-2H ₂ O+H] ⁺	265.0862	2.81	3
28	(R)-4'-hidroxi-3,4-dimetoxidalbergiona	300.0998	[M-2H ₂ O+H] ⁺	265.0862	2.81	3
29	2',4'-dihidroxi-3,4-dimetoxichalcona	300.0998	[M-2H ₂ O+H] ⁺	265.0862	2.81	3
30	2',4'-dihidroxi-3',4-dimetoxichalcona	300.0998	[M-2H ₂ O+H] ⁺	265.0862	2.81	3
31	Helianona A	300.0998	[M-2H ₂ O+H] ⁺	265.0862	2.81	3
32	2',4'-dihidroxi-4,6'-dimetoxichalcona	300.0998	[M-2H ₂ O+H] ⁺	265.0862	2.81	3
33	2',6'-dihidroxi-4,4'-dimetoxichalcona	300.0998	[M-2H ₂ O+H] ⁺	265.0862	2.81	3
34	4,4'-dihidroxi-2',6'-dimetoxichalcona	300.0998	[M-2H ₂ O+H] ⁺	265.0862	2.81	3
35	2',4'-dihidroxi-4',6'-dimetoxichalcona	300.0998	[M-2H ₂ O+H] ⁺	265.0862	2.81	3
36	Pashanona	300.0998	[M-2H ₂ O+H] ⁺	265.0862	2.81	3
37	2',4'-dihidroxi-3',6'-dimetoxichalcona	300.0998	[M-2H ₂ O+H] ⁺	265.0862	2.81	3
38	2',3'-dihidroxi-2',6'-dimetoxichalcona	300.0998	[M-2H ₂ O+H] ⁺	265.0862	2.81	3
39	2,4-dihidroxi-6,4'-dimetoxichalcona	300.0998	[M-2H ₂ O+H] ⁺	265.0862	2.81	3
40	Metiliderona	300.0998	[M-2H ₂ O+H] ⁺	265.0862	2.81	3
41	3'-formil-2',4'.6'-trihidroxi-5'- metildihidrochalcona	300.0998	[M-2H ₂ O+H] ⁺	265.0862	2.81	3
42	Farrerol	300.0998	[M-2H ₂ O+H] ⁺	265.0862	2.81	3

43	5,7-dihidroxi-4'-metoxi-8-metilflavanona	300.0998	[M-2H ₂ O+H] ⁺	265.0862	2.81	3
44	6,4'-dimetilnaringenina	300.0998	[M-2H ₂ O+H] ⁺	265.0862	2.81	3
45	(2R)-5,4'-dihidroxi-7-metoxi-6-metilflavanona	300.0998	[M-2H ₂ O+H] ⁺	265.0862	2.81	
46	5,4'-dihidroxi-7-metoxi-8-metilflavanona	300.0998	[M-2H ₂ O+H] ⁺	265.0862	2.81	3
47	Naringenina 7,4'-dimetil éter	300.0998	[M-2H ₂ O+H] ⁺	265.0862	2.81	3
48	Naringenina 5,7-dimetil éter	300.0998	[M-2H ₂ O+H] ⁺	265.0862	2.81	3
49	(2S)-5-hidroxi-6,7-dimetoxi-2-fenil-2,3-dihidrocumarin-4-ona	300.0998	[M-2H ₂ O+H] ⁺	265.0862	2.81	3
50	6-hidroxi-5,7-dimetoxiflavanona	300.0998	[M-2H ₂ O+H] ⁺	265.0862	2.81	3
51	5-hidroxi-7,8-dimetoxiflavanona	300.0998	[M-2H ₂ O+H] ⁺	265.0862	2.81	3
52	8-hidroxi-5,7-dimetoxiflavanona	300.0998	[M-2H ₂ O+H] ⁺	265.0862	2.81	3
53	2,5-dihidroxi-7-metoxi-6-metilflavanona	300.0998	[M-2H ₂ O+H] ⁺	265.0862	2.81	3
54	2,5-dihidroxi-7-metoxi-8-metilflavanona	300.0998	[M-2H ₂ O+H] ⁺	265.0862	2.81	3
55	Metilsainfurano	300.0998	[M-2H ₂ O+H] ⁺	265.0862	2.81	3
56	6,7-dimetoxi-2-oxatetraciclo[6.6.2.04.011,15]hexadeca-1(14),4,6,8(16),11(15),12-hexaeno-5,13-diol	300.0998	[M-2H ₂ O+H] ⁺	265.0862	2.81	3
57	Felopterina	300.0998	[M-2H ₂ O+H] ⁺	265.0862	2.81	3
58	9-metoxi-4-(3-metibut-2-enoxi)furo[3,2-g]cumarin-7-ona	300.0998	[M-2H ₂ O+H] ⁺	265.0862	2.81	3
59	Helianona B	300.0998	[M-2H ₂ O+H] ⁺	265.0862	2.81	3
60	6a-hidroxi-3,9-dimetoxipterocarpano	300.0998	[M-2H ₂ O+H] ⁺	265.0862	2.81	3
61	5,7-dihidroxi-4'-metoxi-8-metilisoflavanona	300.0998	[M-2H ₂ O+H] ⁺	265.0862	2.81	3
62	3,9-dihidroeucomin;5,7-dihidroxi-3-(4-metoxibenzil)-2,3-dihidro-4H-cumarin-4-ona	300.0998	[M-2H ₂ O+H] ⁺	265.0862	2.81	3
63	6,3'-dimetoxiflavona	282.0892	[M-H ₂ O+H] ⁺	265.0862	2.81	1
64	5,7-dimetoxiisoflavona	282.0892	[M-H ₂ O+H] ⁺	265.0862	2.81	1
65	4,7-dimetoxiflavona	282.0892	[M-H ₂ O+H] ⁺	265.0862	2.81	1
66	3,9-dimetoxipterocarpano	282.0892	[M-H ₂ O+H] ⁺	265.0862	2.81	1
67	7,4'-dimetoxiisoflavona	282.0892	[M-H ₂ O+H] ⁺	265.0862	2.81	1
68	6,4'-dimetoxiflavona	282.0892	[M-H ₂ O+H] ⁺	265.0862	2.81	1
69	5,2'-dimetoxiflavona	282.0892	[M-H ₂ O+H] ⁺	265.0862	2.81	1
70	7,2'-dimetoxiflavona	282.0892	[M-H ₂ O+H] ⁺	265.0862	2.81	1
71	8,2'-dimetoxiflavona	282.0892	[M-H ₂ O+H] ⁺	265.0862	2.81	1
72	3,7-dimetoxiflavona	282.0892	[M-H ₂ O+H] ⁺	265.0862	2.81	1
73	3',4'-dimetoxiflavona	282.0892	[M-H ₂ O+H] ⁺	265.0862	2.81	1
74	3,8-dimetoxiflavona	282.0892	[M-H ₂ O+H] ⁺	265.0862	2.81	1
75	Chrysindimetil éter	282.0892	[M-H ₂ O+H] ⁺	265.0862	2.81	1
76	6,7-dimetoxi-4-fenilcumarina	282.0892	[M-H ₂ O+H] ⁺	265.0862	2.81	1
77	7,8-dimetoxiflavona	282.0892	[M-H ₂ O+H] ⁺	265.0862	2.81	1
78	5,6-dimetoxiflavona	282.0892	[M-H ₂ O+H] ⁺	265.0862	2.81	1
79	5-hidroxi-4'-metoxi-7-metilflavona	282.0892	[M-H ₂ O+H] ⁺	265.0862	2.81	1
80	6-metiltectocrysin	282.0892	[M-H ₂ O+H] ⁺	265.0862	2.81	1
81	6,8-dimetilcrisina	282.0892	[M-H ₂ O+H] ⁺	265.0862	2.81	1
82	Cryptocariona	282.0892	[M-H ₂ O+H] ⁺	265.0862	2.81	1
83	2-hidroxi-1-(4-hidroxi-1-benzofuran-5yl)-fenilpropan-1-ona	282.0892	[M-H ₂ O+H] ⁺	265.0862	2.81	1
84	Agrostophyllin	282.0892	[M-H ₂ O+H] ⁺	265.0862	2.81	1

85	7-hidroxi-3-(4-metoxifenil)-4-metilcumarina	282.0892	[M-H ₂ O+H] ⁺	265.0862	2.81	1
86	7,4'-dimetoxiisoflavona	282.0892	[M-H ₂ O+H] ⁺	265.0862	2.81	1
87	3,9-dimetoxipterocarpano	282.0892	[M-H ₂ O+H] ⁺	265.0862	2.81	1
88	Chrysin 5,7-dimetil éter	282.0892	[M-H ₂ O+H] ⁺	265.0862	2.81	1
89	3-benzil-(4-hidroxifenil)furan-2(5H)-ona	282.0892	[M-H ₂ O+H] ⁺	265.0862	2.81	1
90	Teobromina	180.0647	[M+H] ⁺	181.0724	2.81	2
91	Paraxantina	180.0647	[M+H] ⁺	181.0724	2.81	2
92	Teofilina	180.0647	[M+H] ⁺	181.0724	2.81	2
93	Thr-Thr-OH	342.1063	[M-H ₂ O+H] ⁺	325.1048	1.29	3
94	Inositol hexanicotinato	271.0714	[M+3H] ³⁺	810.1922	1.29	0
95	Maltotreosa	666.2219	[M-H ₂ O+H] ⁺	649.2208	1.29	2
96	Estaquiosa	666.2219	[M-H ₂ O+H] ⁺	649.2208	1.29	2
97	Celutetraosa	666.2219	[M-H ₂ O+H] ⁺	649.2208	1.29	2
98	6-desmetoxihormotamnionetriacetato	526.1475	[M-H ₂ O+H] ⁺	509.1451	1.29	0
99	N-acetilprolina	157.0739	[M+H] ⁺	158.0807	1.29	2
100	Partenolido	248.1412	[M+H] ⁺	249.1473	6.81	4
101	Quadrona	248.1412	[M+H] ⁺	249.1473	6.81	4
102	Ácido-1-metilurico	182.0440	[M+H] ⁺	183.0514	7.2	0
103	7-hidroxietilteofilina	224.0909	[M+H] ⁺	225.0993	5.91	4
104	Dodecil glucósido	348.2512	[M+H-H ₂ O] ⁺	331.247	20.85	4
105	Bis(7)-tacrina	492.3253	[M+H-H ₂ O] ⁺	475.3236	15.87	2