



**UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**POSGRADO INSTITUCIONAL EN QUÍMICA**

**“DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES EN TEQUILAS  
UTILIZANDO CROMATOGRAFÍA DE GASES CON DETECCIÓN  
POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE**

**MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**PRESENTA**

**I.B. LUIS FERNANDO MEJÍA DÍAZ**

**Guanajuato, Gto.**

**Agosto de 2018**

Guanajuato, Gto., Agosto 2018

Por medio de la presente nos responsabilizamos de la autenticidad y originalidad del presente trabajo de investigación que lleva por título: **DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES EN TEQUILAS UTILIZANDO CROMATOGRAFÍA DE GASES CON DETECCIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS**". Realizado por el I.B. Luis Fernando Mejía Díaz en los laboratorios del Instituto de Investigaciones Científicas de la Universidad de Guanajuato, que para obtener el grado de Maestro en Ciencias Químicas bajo la dirección del Dr. Kazimierz Wrobel Zasada, la Dra. Katarzyna Wrobel Kaczmarczyk y la Dra. Alma Rosa Corrales Escobosa.

**“La Verdad os hará libres”**

---

Dr. Kazimierz Wrobel Zasada

---

Dr. Katarzyna Wrobel Kaczmarczyk

---

Dra. Alma Rosa Corrales Escobosa

Miembros del Jurados asignados para el Examen que para obtener el grado de Maestro en Ciencias Químicas, presenta el **I.B. Luis Fernando Mejía Díaz:**

---

Dr. Juan Carlos Torres Guzmán  
**Presidente**

---

Dra. Eunice Yáñez Barrientos  
**Secretario**

---

Dr. Armando Gómez Ojeda  
**Vocal**

---

Dr. Francisco Javier Acevedo Aguilar  
**Suplente**

## **Agradecimientos**

The past, like the future, is indefinite and exists only as a spectrum of possibilities.

## **Dedicatoria**

# Contenido

<b>Índice de Figuras .....</b>	<b>iii</b>
<b>Índice de Tablas .....</b>	<b>vii</b>
<b>Abreviaciones .....</b>	<b>x</b>
<b>Resumen .....</b>	<b>1</b>
<b>1. Introducción .....</b>	<b>3</b>
<b>1.1 Producción de tequila .....</b>	<b>3</b>
1.1.1 Cosecha de agave .....	4
1.1.2 Cocción de piñas de agave .....	4
1.1.3 Molienda y extracción de jugo .....	5
1.1.4 Fermentación .....	5
1.1.5 Destilación .....	7
1.1.6 Maduración .....	7
<b>1.2 Composición de tequila y diferentes objetivos de su análisis .....</b>	<b>9</b>
1.2.1 Composición de tequila .....	9
1.2.2 Diferentes objetivos de estudios en tequila .....	12
1.2.3 Norma oficial mexicana para el análisis de tequila .....	14
<b>1.3 Compuestos volátiles/semivolátiles como marcadores de añejamiento de licores ..</b>	<b>17</b>
1.3.1 Compuestos volátiles/semivolátiles relacionados con la maduración de tequila en madera de roble .....	19
<b>1.4 Revisión bibliográfica enfocada en el análisis de compuestos volátiles en bebidas alcohólicas .....</b>	<b>21</b>
1.4.1 Procedimientos basados en cromatografía de gases .....	21
1.4.2 Procedimientos basados en cromatografía de líquidos .....	25
<b>1. 5. Justificación del proyecto.....</b>	<b>27</b>
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>29</b>
2.1 Objetivo general .....	29
2.2 Objetivos específicos .....	29

<b>3. Parte experimental .....</b>	<b>30</b>
3.1 Reactivos y disolventes .....	30
3.2 Instrumentación analítica.....	30
3.3 Software utilizado.....	31
3. 4. Estándares.....	31
3.5 Muestras .....	32
<b>4. Resultados y discusión.....</b>	<b>32</b>
4.1 Introducción.....	32
4.2 Identificación de compuestos volátiles que confieren aroma al tequila en la etapa de maduración en barricas de roble.....	33
4.3 Desarrollo de un nuevo procedimiento basado en GC-TQMS para la determinación de nueve indicadores de añejamiento de tequilas en barricas de roble .....	38
4.3.1 Protocolo de tratamiento de muestra.....	38
4.3.2 Condiciones instrumentales establecidos para el análisis de compuestos volátiles por GC-TQMS en modo SIM .....	39
4.3.3 Proceso de calibración y evaluación de parámetros analíticos del procedimiento GC-TQMS en modo SIM.....	45
4.3.4 Calibración .....	47
4.3.5 Límite de detección y de cuantificación.....	52
4.3.6 Pruebas de exactitud y precisión .....	54
4.4 Aplicación del procedimiento desarrollado en el análisis de tequilas .....	59
4.4.1 Determinación de compuestos volátiles indicadores de maduración en tequilas .	59
4.5 Procedimientos alternativos de análisis en tequilas mediante FIA-ESI-QTOF-MS y cap-LC-ESI-QTOF-MS.....	63
4.5.1 Análisis de muestras por ESI-QTOF usando FIA para cuantificación de muestras reales de tequila.....	63
4.5.2 Aplicación del procedimiento desarrollado en el análisis de tequilas.....	73
4.5.3 Puesta a punto del sistema FIA-ESI-QTOF-MS integrando una trampa C18 para limpieza de muestra.....	81
4.5.4 Determinación de compuestos volátiles indicadores de maduración en tequilas por FIA-ESI-QTOF-MS con trampa C18.....	86

4.6 Estudio exploratorio: análisis de tequilas enfocado en su discriminación dependiendo del grado de añejamiento e identificación de compuestos atípicos.....	89
4.6.1 Análisis de tequilas por cap-HPLC-ESI-QTOF-MS .....	89
4.6.2 Análisis de datos capHPLC-ESI-QTOFMS por método multivariante PCA .....	93
4.6.3 Identificación de compuestos “atípicos” detectados en tequilas por PCA.....	95
4.6.4 Modelo PLS para predicción de tequilas .....	99
<b>5. Conclusiones.....</b>	<b>102</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>105</b>

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Proceso de producción de tequila: a) piña de agave, b) tradicional horno de cocción, c) molienda de las piñas cocidas, d) Formulación y fermentación del mosto, e) destilación y f) añejamiento en barricas de roble. ....	8
<b>Figura 2.</b> Proceso de maduración de tequilas en barricas de roble, almacenadas en condiciones óptimas de humedad y temperatura, reposada (3 meses), añeja (1 año) y extra-añeja (3 años).....	33
<b>Figura 3.</b> Procedimiento de extracción de compuestos volátiles indicadores de maduración usando extracción en fase sólida (HLB como sorbente) para screening de compuestos volátiles/semi-volátiles en tequilas.....	34
<b>Figura 4.</b> Gráfica volcano obtenida mediante prueba t de la comparación de dos tipos de tequila usando datos de GC TQMS (cada círculo representa un ion con respectivo tiempo de retención) .....	35
<b>Figura 5.</b> Cromatograma de ion extraído (EIC) para algunos de los compuestos identificados como indicadores de añejamiento en tequilas mediante extracción SPE, (a) cis-, tras- whiskey lactona; (b) siringaldehído; (c) vanilina y (d) apocinina. ....	36
<b>Figura 6.</b> Cromatograma de ion extraído (EIC) para algunos de los compuestos identificados como indicadores de añejamiento en tequilas (tratamiento de muestra mediante SPE), (a) guayacol; (b) 4-metilguayacol.....	37
<b>Figura 7.</b> El procedimiento de extracción de los compuestos volátiles de interés propuesto para el análisis de tequilas. ....	39

<b>Figura 8.</b> Cromatograma Total de Iones (TIC) obtenido para los estándares de compuestos seleccionados con concentración 10 µg/ml, utilizando 2-acetiltiazol como EI.....	41
<b>Figura 9.</b> Comparación entre espectros de masas teóricos y experimentales de compuestos volátiles indicadores de maduración obtenidos por impacto electrónico en GC-TQMS .....	44
<b>Figura 10.</b> Preparación de la solución stock de los estándares con concentración 6 µg/ml en AcOEt .....	46
<b>Figura 11.</b> Diluciones sucesivas (x5) para obtener concentraciones iniciales de mix de los estándares presentadas en la segunda columna de <i>Tabla 7</i> , los que se utilizaron para preparar las soluciones de calibración (en AcOEt).....	47
<b>Figura 12.</b> Cromatogramas correspondientes a curva de calibración en modo SIM con concentraciones de 0 ,8, 40, 200 y 1000 µg/l de los 9 analitos y del EI.....	48
<b>Figura 13.</b> Ampliación de los segmentos de cromatogramas presentados en <i>Fig. 12</i> , adquiridos en modo SIM para concentraciones 0 ,8, 40, 200 y 1000 µg/l de 2. guayacol, 3. 4-metilguayacol, 4-etilguayacol.....	48
<b>Figura 14.</b> Ampliación de los segmentos de cromatogramas presentados en <i>Fig. 12</i> , adquiridos en modo SIM para concentraciones 0, 8, 40, 200 y 1000 µg/l de 5 cis-whiskey lactona, 6 trans-whiskey lactona y 7. eugenol .....	49
<b>Figura 15.</b> Ampliación de los segmentos de cromatogramas presentados en <i>Fig. 12</i> , adquiridos en modo SIM para concentraciones 0, 40, 200, 1000 y 5000 µg/l de 8. vainilina, 9. apocinina y 10. siringaldehído.....	49
<b>Figura 16.</b> Cromatograma adquirido en modo SIM con y sin adición de estándar para los analitos de muestras en tequila blanca ( <b>B1</b> ) para guayacol, 4-metilguayacol, 4-etilguayacol, E/Z whiskey lactona. Rojo- tequila blanca B1; Azul- tequila blanca B1 con adición de estándar (100 µg/l).....	58
<b>Figura 17.</b> Ilustración del sistema FIA-ESI-QTOF-MS montado en laboratorio, con válvula de inyección Rheodyne y flujo de solvente usando bomba de carga de sistema HPLC .....	67
<b>Figura 18.</b> Fiagramas obtenidos para la curva de calibración de los seis compuestos con concentraciones 40, 100, 250, 500, 1000 y 2000 µg/l (estándar interno 500 µg/l). .....	70
<b>Figura 19.</b> Fiagramas típicos obtenido en el análisis de tequilas: 7 blancas y 7 reposadas, obtenidos bajo las mismas condiciones de operación y con iguales parámetros de corrección (a) 4-metilguayacol, (b) whiskey lactona, (c) apocinina y (d) siringaldehído.....	73

<b>Figura 20.</b> Cromatograma adquirido en modo “basepeak” para tequilas blancas (B) y reposadas (R), se indican los tequilas B5, B7, B11, R1 y R2 como las muestras con mayores intensidades y probables interferentes.....	75
<b>Figura 21.</b> Espectro típico de masas MS de las muestras de tequila, se observa el ion $m/z$ 203.0531 como el ion más abundante, seguidos de 171.1002 y 141.0529.....	75
<b>Figura 22.</b> Resultados obtenidos de SmartFormula y búsqueda de compuestos en CompundCrawler que explican el ion $m/z$ 203.0539 como posible monosacárido.....	76
<b>Figura 23.</b> Diagrama de cromatograma de ion extraído para ion $m/z$ 203.0531 de tequilas añejas, observamos muestras A1 y A2 con mayor contenido de azúcar .....	79
<b>Figura 24.</b> Cromatograma típico de análisis de azúcares en GC-FID: (-) mix de glucosa, fructosa y etil maltol 0.5 mg/ml cada uno de ellos, (-) mix de estándares 0.1 mg/ml, (-) muestra de tequila A2.....	79
<b>Figura 25.</b> Sistema de inyección de FIA-ESI-QTOF-MS usando trampa C18, se presenta válvula de 10 puertos de cromatógrafo de líquidos Ultimate 3000 con configuración 1-2 y 10-1.....	82
<b>Figura 26.</b> Señales analíticas obtenidas para soluciones de calibración usando trampa C18 en sistema FIA-ESI-QTOF-MS para concentraciones 0, 62.5, 125, 250, 500 y 1000 $\mu\text{g/l}$ de whiskey lactona, 4-metilguayacol y apocinina; y concentraciones 0, 125, 250, 500 y 1000 $\mu\text{g/l}$ para siringaldehído, guayacol y vanilina.....	84
<b>Figura 27.</b> Señales analíticas obtenidas en el análisis de tequilas utilizando el procedimiento FIA-ESI-QTOF-MS con trampa C18, se presenta comparación de muestras reales de tequila y puntos de calibración, (-) mix de analitos de calibración 62.5 y 125 $\mu\text{g/l}$ , (-) tequilas blancos, (-) tequilas reposadas, (-) tequilas añejos y (-) tequilas extra añejas.....	86
<b>Figura 28.</b> Ilustración del sistema instalado para análisis de tequilas por capHPLC-ESI (+)-QTOF-MS.....	91
<b>Figura 29.</b> Cromatogramas de pico base obtenidos para diferentes tipos de tequilas mediante cap-HPLC-ESI (+)-QTOF-MS.....	91
<b>Figura 30.</b> Cromatograma “dissect” obtenido en el análisis de tequila A2 por capHPLC-ESI- (+)-QTOF-MS .....	92

<b>Figura 31.</b> Modelo PCA obtenido con base de tablas buckets de 20 muestras con dos replicas técnicas para cada uno de ellos, si eliminar ningún dato. Azul-tequilas blancas; verde-reposadas; naranja- añejas; rojo-extra añejas .....	93
<b>Figura 32.</b> Modelo PCA obtenido para las mismas muestras de tequila eliminando buckets con valores excesivamente altos, pero que no se presentaron en todas tequilas. Azul- tequilas blancas; verde-reposadas; naranja- añejas; rojo-extra añejas .....	94
<b>Figura 33.</b> Resultado de PCA final obtenido después de eliminar todas señales atípicas características de solo algunos cuantos tequilas, se observa la correcta agrupación de tequilas de acuerdo con el tipo de categoría al cual corresponden. Azul- tequilas blancas; verde-reposadas; naranja- añejas; rojo-extra añejas. ....	95
<b>Figura 34.</b> Espectros de masas (MS) adquirido en tiempo de elución del compuesto “atípico” en tequila B3 y espectro de fragmentación del ion $m/z$ 274.2829 .....	96
<b>Figura 35.</b> Identificación de N-lauril etanodiamina como compuesto “atípico” en tequila B3 con base en búsqueda MetFrag (fragmentación del ion $m/z$ 274.2829) .....	96
<b>Figura 36.</b> Espectro de masas (MS) adquirido en minuto 17 del cromatograma de tequila E4 .....	97
<b>Figura 37.</b> (a) Identificación del compuesto detectado en tequila E4 en tiempo de retención de 17 min. (a) búsqueda mediante CompoundCrawler (DataAnalysis); (b) mecanismo de fragmentación del ion 279.1591 .....	97
<b>Figura 38.</b> Cromatograma MRM por GC-TQMS que confirma la presencia de di-butil ftalato en tequila E4. Cromatogramas: guinda- muestra E4; rojo- mix de estándares 300 pbb .....	98
<b>Figura 39.</b> Modelos PLS1 obtenido para la predicción de categorías de tequila, con variabilidad 56 % de variabilidad de los datos en matriz X y 98 % de la predicción de valores Y (categorías 0-4 tequilas).....	100
<b>Figura 40.</b> Análisis de discriminación por PLS, modelo construido con base a 20 muestras de tequilas (dos replicas técnicas de cada una), se presenta la predicción de ocho muestras desconocidas reportando valores de las predicciones, así como sus respectivas desviaciones .....	101

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Biosíntesis de alcoholes superiores .....	10
<b>Tabla 2.</b> Especificaciones fisicoquímicas del tequila .....	15
<b>Tabla 3.</b> Compuestos asociados con el proceso de maduración de licores en madera .....	19
<b>Tabla 4.</b> Algunas aplicaciones de cromatografía de gases para análisis de compuestos de importantes propiedades organolépticas de bebidas alcohólicas.....	23
<b>Tabla 5.</b> Algunas aplicaciones de cromatografía de líquidos en el análisis de compuestos de importancia para propiedades organolépticas de bebidas alcohólicas.....	26
<b>Tabla 6.</b> Muestras de tequila analizados en este trabajo para determinación de compuestos volátiles indicadores de añejamiento por GC-TQMS .....	32
<b>Tabla 7.</b> Condiciones instrumentales para análisis de nueve compuestos volátiles indicadores de añejamiento por GC-MSTQ en modo SIM. ....	40
<b>Tabla 8.</b> Tiempo de retención, iones seleccionados y ventana de tiempo de análisis de los estándares por metodología SIM en GC-TQMS .....	45
<b>Tabla 9.</b> Elaboración de las soluciones de calibración para el procedimiento GC-TQMS .	46
<b>Tabla 10.</b> Ecuaciones de regresión lineal obtenidas con base en tres replicas independientes. Se presentan valores promedios de las pendientes e intercepto. “Y” es la señal analítica definida como área de la señal de cada analito; “X” es la concentración en µg/l. ....	50
<b>Tabla 11.</b> Ecuaciones de regresión lineal obtenidos con base en tres replicas independientes. Se presentan valores promedios de las pendientes e intercepto. “Y” es señal analítica de estándar/señal analítica de estándar interno definida con área de pico; “X” es concentración del analito/ concentración de estándar interno; “R <sup>2</sup> ” – coeficiente de regresión; “DER” – desviación estándar relativa, calculada con base en los promedios de los factores de calibración individuales %.....	52
<b>Tabla 12.</b> Límites de detección (LD) y de cuantificación (LC) evaluados en el procedimiento de calibración y en el análisis de muestras reales .....	53
<b>Tabla 13.</b> Prueba de precisión, cálculo de la diferencia porcentual relativa (% RPD) para tequila blanca y tequila reposada.....	56
<b>Tabla 14.</b> Pruebas de precisión, cálculo de la diferencia porcentual relativa (% RPD) para tequila añeja y tequila extra-añeja .....	56

<b>Tabla 15.</b> Resultados de adición de estándar obtenidos en el análisis de tequila blanca se presentan valores promedio con respectivas desviaciones estándar.....	57
<b>Tabla 16.</b> Resultados de la determinación de compuestos volátiles en tequilas blancas y reposadas, se presentan valores promedio con sus respectivas DE, obtenidos de tres replicas independientes. ....	59
<b>Tabla 17.</b> Resultados de la determinación de compuestos volátiles en tequilas añejas y extra añejas, se presentan valores promedio con sus respectivas DE, obtenidos de tres replicas independientes .....	60
<b>Tabla 18.</b> Resultados obtenidos en el análisis de compuestos volátiles, representados como valores promedios por cada categoría de tequila: blancos, reposados, añejas y extra añejas, con sus respectivas DE .....	62
<b>Tabla 19.</b> Condiciones instrumentales establecidos para el análisis de indicadores de añejamiento por FIA-ESI-QTOF-MS.....	65
<b>Tabla 20.</b> Iones monitoreados de compuestos seleccionados como indicadores de añejamiento por FIA-ESI-QTOF-MS.....	66
<b>Tabla 21.</b> Ecuaciones de regresión lineal obtenidas con base en tres réplicas de cada punto. Se presentan valores promedios de las pendientes e intercepto. “Y” es señal analítica de estándar normalizada por la señal analítica de estándar interno (ambas adquiridas como área de pico); “X” es la concentración del analito/ concentración de estándar interno; “R <sup>2</sup> ” – coeficiente de regresión; “DER” – desviación estándar relativa, calculada con base en los promedios de los factores de calibración individuales %.....	71
<b>Tabla 22.</b> Ecuaciones de regresión lineal obtenidas con base en tres réplicas de cada puto. Se presentan valores promedios de las pendientes e intercepto. “Y” es señal analítica de estándar normalizada por la señal analítica de estándar interno (ambas adquirida como altura de pico); “X” es la concentración del analito/ concentración de estándar interno; “R <sup>2</sup> ” – coeficiente de regresión; “DER” – desviación estándar relativa, calculada con base en los promedios de los factores de calibración individuales %.....	71
<b>Tabla 23.</b> Límites de detección (LD) y de cuantificación (LC) evaluados en el procedimiento de calibración y en el análisis de muestras reales.....	72

<b>Tabla 24.</b> Resultados de la determinación de compuestos volátiles en tequilas blancas y reposadas por FIA-ESI-QTOF-MS, se presentan valores promedio con sus respectivas DE, obtenidos de tres replicas independientes.....	74
<b>Tabla 25.</b> Resultados obtenidos en MetFrag de las posibles estructuras moleculares a las cuales corresponde el ion $m/z$ 203.0531 (formula química $C_6H_{12}O_6$ )......	77
<b>Tabla 26.</b> Condiciones instrumentales empleadas para análisis de azucres en muestras reales de tequilas adulteradas con glucosa o fructosa.....	78
<b>Tabla 27.</b> Condiciones de la solución de flujo para bomba de carga y NC del equipo de HPLC; A- HCOOH 0.1 %; B- ACN .....	82
<b>Tabla 28.</b> Condiciones instrumentales utilizadas para el análisis de indicadores de añejamiento por FIA-ESI-QTOF-MS con trampa C18 .....	83
<b>Tabla 29.</b> Ecuaciones de calibración obtenidas utilizando el procedimiento FIA-QTOF-MS con trampa C18. Se presentan valores promedios de las pendientes e intercepto con base en tres réplicas. “Y” es señal analítica de estándar definida con área de pico; “X” es la concentración del analito en $\mu\text{g/l}$ ; “ $R^2$ ” – coeficiente de regresión; “DER” – desviación estándar.....	85
<b>Tabla 30.</b> Resultados obtenidos en el análisis de tequilas blancas por GC-TQMS y mediante FIA-ESI-QTOF-MS con trampa C18; se presentan valores promedio con respectivas desviaciones estándar en base a tres réplicas.....	87
<b>Tabla 31.</b> Resultados obtenidos en el análisis de tequilas reposadas por GC-TQMS y mediante FIA-ESI-QTOF-MS con trampa C18; se presentan valores promedio con respectivas desviaciones estándar en base a tres réplicas.....	87
<b>Tabla 32.</b> Resultados obtenidos en el análisis de tequilas añejas por GC-TQMS y mediante FIA-ESI-QTOF-MS con trampa C18; se presentan valores promedio con respectivas desviaciones estándar en base a tres réplicas.....	88
<b>Tabla 33.</b> Condiciones de retención de compuestos en trampa (etapa controlado por la bomba de carga) y de separación cromatográfica (etapa controlado por la bomba nano). Soluciones: A - A- ácido acético 0.1 % y B – acetonitrilo.....	90
<b>Tabla 34.</b> Condiciones instrumentales utilizadas para análisis de tequilas utilizando cap-HPLC-ESI (+)-QTOF-MS.....	90

## Abreviaciones

Abreviación	Descripción
acetil-CoA	acetil coenzima A
ANOVA	Análisis de varianza
CID	Ionización inducida por colisiones
DAD	Detector espectrofotométrico de arreglo de diodos
DER	Desviación estándar relativa
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazina
EI	Ionización por el impacto de electrones
ESI	Ionización por electro nebulización
MS	Espectrometría de masas
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem
FOS	Fructo-oligosacáridos
GC	Cromatografía de gases
AED	Detector de emisión atómica
FID	Detector de ionización en flama
GC-O	Cromatografía de gases con detector olfatométrico
GCxGC	Cromatografía de gases de dos dimensiones
GDA	Análisis de discriminación general
TOF	Analizador de masas de tiempo de vuelo
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
IT	Filtro de masas de trampa iónica
HS-SPME	Headspace solid-phase microextraction
LLE	Extracción liquido-líquido
MRM	Monitoreo de reacciones múltiples
PCA	Análisis de componentes principales
RP	Fase inversa
ECD	Detector electroquímico
S/N	Relación señal ruido
SAX	Intercambiados fuerte de aniones
SIM	Monitoreo selectivo de iones
SPME	Micro-extracción en fase sólida
TIC	Cromatograma de iones totales

## Resumen

En el presente trabajo de tesis se enfocó, primeramente, en el desarrollo de un nuevo procedimiento analítico basado en cromatografía de gases con detector másico para la determinación y cuantificación de compuestos volátiles indicativos de la maduración en el tequila. Se realizó screening de compuestos volátiles por GC-MS y en base de análisis estadístico (t-test) se seleccionaron nueve potenciales indicadores de maduración en tequilas y se puso a punto el procedimiento establecido para la determinación de estos compuestos en modo SIM con simple pretratamiento de muestra asistido por el efecto “salting out”. El análisis de las categorías de tequila reveló diferencias en concentraciones de los nueve compuestos dependiendo del grado de añejamiento: (i) blancos; (ii) reposados; (iii) añejos y (iv) extra-añejos. Las concentraciones de los analitos fueron encontradas en un intervalo desde 0 a 5 µg/ml.

Como segunda parte del trabajo se exploró la posibilidad de cuantificar los indicadores de maduración previamente seleccionados por GC-MS, se propuso realizarlo mediante ESI (+)-QTOF-MS eliminando la separación cromatográfica y aprovechando la alta resolución ofrecida por ESI. Se construyó un sistema de inyección de flujo continuo FIA-ESI-QTOF-MS para la introducción directa de las muestras/estándares que permite una alta repetibilidad de las señales debido a un volumen constante inyectado y a una velocidad de flujo constante, ambos controlados por bomba de HPLC Dionex Ultimate 3000. El procedimiento permitió obtener la calibración para seis compuestos de interés con parámetros analíticos adecuados para la aplicación en el análisis de trazas; sin embargo, la matriz química de los tequilas provocó fuertes interferencias que no permitieron la cuantificación confiable. Los principales interferentes fueron identificados como azúcares simples (glucosa, fructuosa, etil maltol) y posiblemente furfuraldehído.

En la tercera parte de trabajo de tesis, se procedió a eliminar interferentes polares mediante el uso de una trampa C18 integrada en el sistema FIA, permitiéndonos hacer la cuantificación de los analitos de interés de manera rápida (cuatro minutos de adquisición por cada solución muestra/calibración analizada), sin la necesidad de hacer la separación cromatográfica, teniendo un adecuado poder de detección, fácil manejo de datos tanto de calibración como cuantificación. Los resultados obtenidos presentaron una mejor concordancia con los datos de GC-TQMS

respecto a los resultados arrojados sin la limpieza de la muestra; sin embargo, no se logró eliminar las interferencias por completo.

Finalmente, como última parte del trabajo de tesis se realizó un estudio exploratorio de la composición del tequila utilizando cap-HPLC-ESI-QTOF-MS que nos permitió utilizar datos crudos en el análisis estadístico PCA y PLS, y obtener el modelo de discriminación de los tequilas de acuerdo con su grado de maduración, es decir como tequila blanco, reposado, añejo y extra añejo. El análisis de componentes principales permitió la detección de algunos compuestos atípicos presentes en algunos de los tequilas; posteriormente, dichos compuestos fueron asignados a las contaminaciones o incluso adulteraciones de tequilas asignándolos como N-lauril etanodiamina, ftalatos y azúcares. Una vez eliminado de los datos crudos capHPLC-ESI-QTOF-MS el ruido y los compuestos atípicos, se obtuvo el modelo PLS1 de discriminación, el cual con base en dos componentes abarcó el 97% de variabilidad de los datos para la variable “Y” con coeficientes de correlación 0.9841 en la etapa de calibración y 0.9810 en la etapa de validación. Este modelo permitió predicción adecuada del grado de añejamiento de ocho tequilas.

## **1. Introducción**

El aroma es una de las más importantes propiedades de los licores, la cual decide de su calidad, aceptación en el mercado y también de su precio. El aroma se debe a la presencia de una gran cantidad de diferentes compuestos volátiles y semi-volátiles provenientes de la materia prima o son formados durante las sucesivas etapas de producción, maduración y almacenaje [1, 2]. Uno de estos licores, de importancia tanto en México como a nivel mundial, es el tequila. En el presente trabajo de tesis se pretende avanzar en la metodología analítica de determinación de compuestos volátiles en el tequila.

### **1.1 Producción de tequila**

El tequila es una bebida alcohólica destilada con sabor único, producida a partir del extracto de jugo de agave, su producción está estrictamente regulada tanto que, solamente bebidas producidas a partir de la planta Agave tequilana weber variedad azul y cultivadas en una región protegida de México pueden ser etiquetadas con denominación de origen (NOM-006-SCFI-2012). De acuerdo a la norma anteriormente mencionada el tequila puede clasificarse en dos categorías básicas; tequila 100% de agave y tequila mixto, el primero no enriquecido con otros azúcares distintos a los obtenidos del agave de la especie tequilana weber variedad azul, en tanto el segundo es producido mediante la adición de azúcar de caña o de maíz al jugo de agave antes de la fermentación con una proporción no mayor al 49 % de azúcares reductores totales [3, 4].

Los métodos de producción del tequila han ido cambiando a través de los años, siendo actualmente más eficientes y reproducibles debido a la estandarización de los procesos, introducción de autoclaves en lugar de los típicos hornos, empleo de levaduras seleccionadas contrario a la típica fermentación espontánea, diseño de novedoso equipo de destilación, etc. [5].

El proceso industrial de su elaboración está regulado por la Norma Oficial Mexicana NOM-006-SCFI-2012, donde se describen las siguientes etapas: (i) cosecha de las plantas; (ii) cocción de las piñas de agave (agave tequilana Weber var. Azul) para hidrolizar poli-azúcares (inulina); (iii) molienda de las piñas cocidas para extracción de jugo; (iv) fermentación etanólica mediada por

la(s) adecuada(s) cepa(s) de levadura; (v) doble destilación; (vi) añejamiento; (vii) filtrado y embotellamiento [6].

El Tequila blanco se refiere al producto directo de la destilación mientras que el tequila reposado se matura en barriles de roble blanco por al menos 2 meses; los tequilas añejo y extra añejo se depositan en barriles por los periodos de un año y al menos tres años, respectivamente [3].

### 1.1.1 Cosecha de agave

El proceso de producción del tequila dura aproximadamente entre 7 y 9 años e inicia con la plantación del agave; materia prima para la elaboración de esta bebida alcohólica. De acuerdo con la declaración general de protección a la denominación de origen, la citada variedad de agave debe de cumplir lo siguiente: (i) su cultivo debe realizarse dentro de la zona geográfica delimitada en la declaración de denominación de origen; (ii) estar registrado en el organismo de certificación de tequila [1, 5].

El primer proceso que se hace al agave es comúnmente conocido como jima; acción en la cual se desprenden las partes no aprovechables de las hojas y penca del agave cuando éste ha alcanzado madurez suficiente para su industrialización. De esta manera se obtiene la “piña” de agave; formada por el tallo y parte basal de las hojas, donde se encuentran almacenados los carbohidratos utilizados en la elaboración del tequila; para la producción del tequila 100% agave, la única fuente de carbohidratos son los presentes naturalmente en la planta, principalmente la inulina [3, 5].

### 1.1.2 Cocción de piñas de agave

Durante la producción del tequila, las piñas de Agave tequilana son sometidas a un proceso de cocción de por lo menos 32 h a 100 °C, con el principal objetivo de hidrolizar la inulina; polisacárido presente en la corteza de la piña de agave, la inulina es entonces convertida en azúcares simples mayoritariamente fructosa, para su posterior fermentación. Además de la hidrólisis de inulina, en esta etapa se forman muchos compuestos determinantes en el perfil organoléptico del producto final.

La complejidad de esta etapa es debido a las condiciones usadas para hidrolizar el agave debido a los fructooligosacáridos (FOS) presentes, los cuales requieren condiciones más drásticas para ser

hidrolizados que los azúcares de cadena sencilla, razón por la cual los FOS bajo ciertas condiciones pueden caramelizarse y representar pérdidas dado que no pueden fermentarse.

Aunado a lo anterior, durante la caramelización de los azúcares presentes en las piñas se generan compuestos secundarios como furfural y 5-hidroximetil furfural; las condiciones de cocción tales como alta temperatura, bajo pH - 4.5, tiempo y presencia de agua, favorecen a los procesos denominados reacción de Maillard que acompaña a la hidrólisis de inulina. Un importante aspecto de la cocción de la piña es hacerla más suave lo que permite extracción de azúcares durante la molienda.

### **1.1.3 Molienda y extracción de jugo**

Posterior a la hidrólisis, los carbohidratos hidrolizados deben ser separados de la fibra, esta extracción se realiza comúnmente con una combinación entre una desgarradora y un tren de molinos de rodillos que corta el agave en pequeñas tiras o fibras (mosto) [3]. Los molinos usados para extraer azúcares del agave son similares a los utilizados en la industria azucarera, sin embargo, son de menor tamaño y regularmente se usa agua para facilitar la extracción.

En la molienda se genera un producto secundario llamado mosto - residual que corresponde a la fibra restante después de extraer el jugo de la piña. La composición de este producto es aproximadamente 43% celulosa, 19% hemicelulosa, 15% lignina, 3% nitrógeno total, 1% pectina, 10% azúcares residuales y 9% otros compuestos, respecto a la masa seca del producto. Durante mucho tiempo se ha tratado de dar una aplicación a el mosto residual, tal como uso para alimentación de ganado, intentos por recuperar celulosa, hemicelulosa y pectina mediante diseño de reactores termoquímicos de alta eficiencia para generar furfurales, pequeñas partículas o enzimas. Sin embargo, mayoría de los proyectos solo se han realizado a escala laboratorio y no hay suficiente información para evaluar su factibilidad a escala industrial [5].

### **1.1.4 Fermentación**

El proceso de fermentación es la etapa clave en la fabricación del tequila; además de etanol se produce una importante cantidad de compuestos volátiles/semivolátiles que aportan las propiedades organolépticas finales y definen la calidad del tequila. Como ya se mencionó anteriormente, para producir tequila 100 % agave se requiere elaborarlo a

partir de azúcares extraídos exclusivamente del agave, mientras que en tequilas mixtos es válido adicionar azúcares, recordando que la ley permite el uso no mayor al 49 % en masa de azúcares reductores totales para su formulación.

El jugo extraído del agave es enviado a tanques de fermentación con adición de levadura (*S. cerevisiae*) y se realiza ajuste de pH; el resultado de esta operación se conoce como mosto fresco, el cual se encuentra listo para ser fermentado [3, 5].

La fermentación es el proceso por el cual los azúcares presentes en el mosto son transformados, por acción metabólica de las levaduras, en alcohol etílico y dióxido de carbono; los factores críticos a controlar en el proceso son: temperatura (32 °C- 35 °C), pH (4- 5), disponibilidad de nutrientes para microorganismos y tiempo. Es necesario evitar una posible contaminación por microorganismos que puedan entrar en competencia con las levaduras; principalmente hongos o bacterias [5, 7, 8].

Las compañías tequileras no inoculan cepas comerciales de *S. cerevisiae* en el mosto y prefieren que la fermentación ocurra en forma natural con levaduras propias de la materia prima. Para mantener la calidad y lograr altas eficiencias se aíslan levaduras del proceso natural de fermentación y estas son “mejoradas” mediante herramientas de biotecnología. De hecho, las cepas de levaduras aisladas de la fermentación de agave fueron depositadas en la colección nacional de cultivos microbiológicos del Departamento Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV-IPN.

Cuando el mosto ya está formulado, se inocula con 5 -10 % v/v de *S. cerevisiae* previamente crecida con población de 100-200 millones células/ml. Sin adicionar inoculo, la fermentación dura aproximadamente siete días, mientras que, introduciendo cepa mediante inoculación, el tiempo se acorta (20 h-tres días) [5]; la experiencia en la industria tequilera dicta que la formación de compuestos con propiedades organolépticas se ve favorecida en fermentaciones lentas contrario a las que son muy rápidas; en conclusión, el sabor y calidad general de tequila obtenido empleando procesos de fermentación largos es la mejor a pesar de la desventaja en cuanto a tiempo se refiere [8]. Finalmente es de resaltar que las propiedades organolépticas del tequila se establecen no solamente durante la fermentación, pero también en las etapas siguientes de destilación y maduración [1, 3].

### **1.1.5 Destilación**

Una vez terminada la fermentación, el siguiente paso es la destilación; los mostos contienen cantidades pequeñas de azúcares y a su vez, cantidades considerables de alcohol etílico que pueden variar desde el 5 % al 10 % v/v. Además de los componentes ya mencionados, el mosto contiene pequeñas partículas-residuos de agave; pectina y celulosa, levadura, proteínas, sales minerales y algunos ácidos orgánicos. La destilación permite eliminar a los componentes sólidos y compuestos no-volátiles de la bebida. Debido a que la temperatura de ebullición del etanol (78 °C) es más baja que del agua, la destilación permite aumentar el porcentaje en etanol respecto al mosto [5, 9, 10].

El producto de la primera destilación se le conoce como ordinario y esta etapa sirve para eliminar componentes no deseables tales como sales, proteínas, sólidos, sustancias nutritivas y algunos subproductos de menor volatilidad (a estos compuestos comúnmente se les denomina vinazas). En la segunda destilación se obtiene la fracción con porcentajes de etanol de hasta el 50 % v/v considerada ya como tequila. El tequila blanco se comercializa directamente o se somete al proceso de maduración [10].

### **1.1.6 Maduración**

La destilación es la última etapa de producción en caso de tequila blanco, mientras que para tequilas reposados y añejados es necesario llevar a cabo su maduración, usualmente en barriles de roble blanco o encino, con capacidad de 200 l. Para obtener tequilas reposados, la norma NOM-006-SCFI-2012 establece un periodo de añejamiento de por lo menos tres meses, mientras que para tequilas añejos el proceso de maduración debe ser de un año y, por último, cuando el añejamiento dura por lo menos tres años el producto se denomina tequila extra añejo [5, 9]. En México, para la producción de tequila principalmente se emplean barriles ya utilizados previamente para maduración de otras bebidas alcohólicas como whiskey, brandy etc.; justificando que éstas son apropiadas para obtener muy buen aroma final del tequila [11]. Compuestos complejos (taninos) son extraídos de la madera por el tequila lo que confiere el color y un sabor particular. Aunado a ello, como resultado de diferentes reacciones químicas entre compuestos contenidos en el tequila y los extraídos de madera se producen nuevos compuestos que mejoran las propiedades organolépticas; tal es el caso de los procesos de oxidación que contribuyen en el aumento de la concentración de ácidos, aldehídos y ésteres.

Por otro lado, el papel de los barriles consiste también en la eliminación de compuestos indeseables, por ejemplo, durante la maduración ocurre la absorción de alcoholes superiores en la madera [12].

Después del añejamiento y dilución con agua, el color del tequila puede ser ajustado a los valores deseados por la adición de caramelo, cabe hacer mención que el Consejo Regulador del Tequila inspecciona todo el proceso de añejamiento, y antes del embotellamiento de la bebida, se hace una filtración a través de filtros de celulosa y, al ser necesario, se usa carbón activado para quitar la turbidez. En *Fig. 1* se observa el proceso completo de la producción de tequila.



a)



b)



c)



d)



e)



f)

**Figura 1.** Proceso de producción del tequila: a) piña de agave, b) tradicional horno de cocción, c) molienda de las piñas cocidas, d) Formulación y fermentación del mosto, e) destilación y f) añejamiento en barricas de roble [3, 4].

## 1.2 Composición del tequila y diferentes objetivos de su análisis

### 1.2.1 Composición del tequila

Además del etanol y agua, la presencia de compuestos minoritarios en el tequila es de suma importancia ya que ésta decide sobre las propiedades organolépticas de la bebida. De manera general, se han reportado hasta 327 compuestos relacionando su presencia principalmente con las etapas de fermentación y destilación del tequila [1]. Por otra parte, se ha investigado el efecto que tiene la etapa de maduración sobre las propiedades organolépticas y en particular, sobre el aroma de licores; sin embargo, la mayoría de estos estudios abarcaron la caracterización de bebidas tales como vinos de mesa, whiskey y brandy [10, 13-16] mientras que los tequilas han sido menos estudiados [2].

En cuanto al tipo de compuestos asociados con el aroma, se consideran los siguientes grupos: acetales, aldehídos, cetonas, alcoholes, fenoles, ésteres, terpenos y lactonas. A continuación, se muestra una pequeña descripción de los principales grupos de compuestos volátiles/semivolátiles presentes en el tequila; cabe mencionar que además de aquellos que confieren propiedades organolépticas agradables, en el tequila pueden formarse compuestos tóxicos y algunos de ellos (alcoholes superiores, aldehídos, esterres, furfural) son regulados por la Norma Oficial Mexicana NOM-006-SCFI-2012.

*Alcoholes superiores:* Tienen un aroma fuerte, entre ellos podemos mencionar 1-propanol, isobutanol, 1-butanol, 2-metil-1-butanol, alcohol isoamílico; éstos compuestos son frecuentemente encontrados en bebidas alcohólicas y pueden ser producidos a partir de aminoácidos mediante reacciones catabólicas o anabólicas (*Tabla 1*). Las reacciones catabólicas comienzan con una reacción de desaminación seguida por una descarboxilación la cual produce aldehídos, que posteriormente son convertidos a alcoholes mediante la acción catalítica de la enzima alcohol deshidrogenasa. El mecanismo de formación de los alcoholes a través de reacciones anabólicas se da cuando los  $\alpha$ -cetoácidos son descarboxilados produciendo aldehídos, los cuales son finalmente transformados a alcoholes superiores [17].

Tabla 1. Biosíntesis de alcoholes superiores [18, 19]

<b>Aminoácido</b>	<b><math>\alpha</math>-Cetoácido</b>	<b>Aldehído</b>	<b>Alcohol superior</b>
Treonina o Metionina	$\alpha$ -cetobutirato	propil aldehído	propanol
Valina	$\alpha$ -cetoisovalorato	$\alpha$ -hidroxi-isovaleraldehído	isobutilico
Leucina	$\alpha$ -cetoisocaproato	isovaraldehído	isoamflico
Isoleucina	$\alpha$ -ceto-metilvalerico	$\alpha$ -hidroxi-iso caprilaldehído	amflico

*Metanol:* es producido durante la elaboración del tequila en la etapa de cocción de las piñas, ya que el agave contiene pectinas con grupos metoxilos en su estructura; temperatura de cocción (100 °C) favorece la desmetilación con la formación del metanol como producto final. Otro factor que influye al aumento en la concentración del metanol durante la fermentación es la actividad de las enzimas pectin-metil-esterasas de algunas cepas presentes en el medio, que catalizan el corte de los grupos metoxilos de la pectina produciendo metanol.

*Etil Ésteres:* Estos compuestos de suma importancia dan tanto sabor como aroma a las bebidas, sin embargo, tienen un bajo umbral de olor, lo que compromete el poder de detección mediante olfatometría. En el tequila se han identificado más de 47 diferentes ésteres, principalmente mediante cromatografía de gases con detectores másicos. El acetato de etilo es el principal éster presente en las bebidas alcohólicas generado mediante la enzima acetil alcohol transferasa durante el proceso de la fermentación, permitiendo así la unión del acetato de una molécula de acetato de etilo con una molécula de etanol. La producción de ésteres está directamente relacionada con la cantidad de aminoácidos presentes. Un caso especial es el etil carbamato, reconocido como carcinógeno, genotóxico presente en los alimentos fermentados y en bebidas alcohólicas, identificado en 1985 en bebidas alcohólicas en Canadá donde altos niveles fueron detectados [5, 17].

*Ácidos orgánicos:* Tanto ácidos orgánicos pequeños como ácidos grasos de cadena alifática relativamente larga son producidos durante la fermentación, el primer grupo es producto principalmente del metabolismo de los microorganismos y depende de la presencia de oxígeno, mientras que ácidos grasos son sintetizados por la membrana durante el crecimiento celular. En tequila se ha descrito principalmente la presencia de ácido octanoico y decanoico [2, 20].

*Terpenos:* Los terpenos son compuestos encontrados en el agave, ya sea de forma libre o glicosilada (mono terpenos y sesquiterpenos). Los Monoterpenos con 10 átomos de carbono se caracterizan por tener un fuerte aroma a frutas o hierbas; se han reportado cerca de 32 diferentes terpenos en el agave tequilana weber variedad azul, durante la fermentación, los sesquiterpenos pueden ser transformados por la acción de las enzimas en mono terpenos, estos cambios provocan las diferencias aromáticas en las bebidas alcohólicas [21, 22]. La variedad y concentración de terpenos formados durante la producción del tequila y vinos contribuyen de manera importante en el aroma final del producto. En el tequila se han encontrado compuestos terpénicos tal como:  $\alpha$ -terpinol, limoneno, citronelol, linalool, oxido trans-linalool, farnesol,  $\alpha$ -nerolidol y  $\alpha$ -terpineno [23].

*Furanos:* Los furanos son compuestos formados principalmente durante procesos térmicos, ejemplo de ello es durante la cocción de las piñas o en el proceso de destilación, la mayoría de los compuestos furánicos en el tequila han sido identificados y cuantificados por varios autores, siendo los principales compuestos 2-furfuraldehído y 5-hidroximetil-2-furfuraldehído, producidos por la degradación de la fructuosa presente en el agave tequilana weber variedad azul.

*Fenólicos:* Se han reportado diferentes tipos de compuestos fenólicos en el agave tales como ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, saponinas, ligninas etc. En el agave tequilana solo se había reportado el estudio de homoisoflavanones. El perfil de compuestos fenólicos presentes en agave tequilana weber es claramente modificado durante el proceso de elaboración del tequila, la maduración en los barriles de roble es una importante fuente de pequeños compuestos fenólicos, en ese sentido, los compuestos tal como: ácido gálico, ferrulico, vanílico, siríngico y protocatecuico han sido estudiados como indicadores de añejamiento en bebidas alcohólicas [24-27].

## 1.2.2 Diferentes objetivos de estudios en tequila

La composición química del tequila ha sido estudiada con enfoque en el control de calidad, autenticación, discriminación entre tequilas 100% de agave y tequilas mixtas, posibles adulteraciones y también con el fin de mejorar el proceso de su elaboración [2, 4, 28-30].

Se ha avanzado en la caracterización de compuestos volátiles en tequila; en particular, Estrada *et al.* analizaron muestras de tequilas con el objeto de hacer una caracterización de compuestos volátiles; llevaron a cabo la cuantificación de éster etílico utilizando micro-extracción en fase sólida (SPME) acoplado a cromatografía de gases con detector de ionización por flama (GC-FID). En este trabajo, se estableció un procedimiento para bebidas alcohólicas tales como vino, vodka, cerveza y tequila. La cuantificación de éster etílico en tequila por SPME-GC-MS se propuso como una herramienta útil en la clasificación de tequilas en sus diferentes tipos, sin embargo, para establecer los intervalos de concentración de éster etílico que permitan una clasificación correcta es necesario más datos con un alto número de muestras de tequilas [31].

La determinación de aldehídos en diferentes marcas de tequila fue realizada por el grupo de investigación de Wrobel *et al.* usando cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) y 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) como reactivo derivatizante, el método permite determinar 5-(hidroximetil)-2-furfuraldehído, formaldehído, siringaldehído, acetaldehído, 2-furfuraldehído y 5-metilfurfuraldehído, los resultados obtenidos indicaron que los niveles de 2-furfuraldehído y 5-metilfurfuraldehído pueden ser usados para discriminar entre tequilas 100 % agave y tequilas mixtos [29, 32].

De la misma manera existen diferentes metodologías para identificación y cuantificación de compuestos indicadores de añejamiento, los cuales son de suma importancia para las principales tequileras, con el objeto de conocer los compuestos que pueden ser utilizados como marcadores de añejamiento. Como un ejemplo, se ha propuesto un procedimiento basado en la separación por cromatografía de líquidos de alta resolución con detector espectrofotométrico de arreglo de diodos (HPLC-DAD) en el cual se cuantifican un total de 11 compuestos representativos que actúan como indicadores de maduración en tequila; estos son: ácido gálico, 5-(hidroximetil)-furfural, ácido protocatecuico, ácido vanílico, ácido siríngico, vanilina, siringaldehído, ácido ferrulico, coniferilaldehído, sinapinaldehído y escopoletin [33].

Usando una prueba ANOVA combinada con análisis discriminador se realizó la clasificación de los tequilas de acuerdo con el tiempo de maduración, este método es sugerido por sus autores que puede ser utilizada como control de calidad en la industria tequilera para clasificar entre tequilas blancos, reposados, añejos y extra-añejos [2, 25].

En la composición del tequila, los terpenos pertenecen a un grupo muy diverso de compuestos presentes en las bebidas alcohólicas, considerados importantes en cuanto al sabor y al aroma; numerosos estudios se han realizado con el objetivo de relacionar la presencia de terpenos con el perfil organoléptico de diferentes bebidas alcohólicas y destilados. Peña *et al.* establecieron un procedimiento mediante cromatografía de gases con detector másico, previa micro extracción en fase sólida en “headspace” (HS-SPME-GC-MS) en la que cuantificaron siete terpenos de mayor abundancia relativa en bebidas alcohólicas; linalool, terpinen-4-ol,  $\alpha$ -terpinol, citronelol, eugenol, cis-nerolidol y trans farnesol, a los cuales atribuyen mayor contribución en el perfil organoléptico del tequila [23].

En cuanto al control de calidad, varios estudios se han realizado con un enfoque hacia el cumplimiento de las normas en contenido de etanol y del cumplimiento de los máximos niveles permisibles de compuestos no deseables, mencionados en la sección anterior (alcoholes superiores, aldehídos, metanol, furfural). En norma oficial mexicana se han establecido procedimientos válidos para la cuantificación de los principales compuestos que se regulan [3, 28].

Por otro lado, quedó demostrada la utilidad de los perfiles de metales/metaloideos y de aniones inorgánicos en la autenticación geográfica de tequila y en la diferenciación entre tequilas 100% de agave y tequilas mixtas [32, 34]. La autenticación se ha estudiado también mediante el análisis de relaciones isotópicas  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  y  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ; Schereier *et al.* especificaron los intervalos de las relaciones isotópicas para discriminar entre tequila 100 % agave y tequilas mixtas; así mismo, definieron los criterios para diferenciar entre tequilas blancos, reposados y añejos con base en las relaciones isotópicas, incluso aplicaron el procedimiento desarrollado para comparar diferentes tipos de bebidas alcohólicas y lograron su clasificación [34, 35]. Una importante línea de investigación y de control de calidad es la identificación/cuantificación de compuestos volátiles, como indicadores de maduración.

En este sentido, se ha logrado distinguir los tequilas reposados, añejos y extra-añejos con base en el contenido de 1-propanol, acetato de etilo, 2-metilpropanol, 3-metilbutanol, 2-metilbutanol, 5-(hidroximetil)-2-furaldehído y 2-furfural [32, 36].

Otros autores reportaron como compuestos volátiles/semivolátiles que aportan el aroma de tequilas, los siguientes: 3-metilbutanal, 3-metilbutanol,  $\beta$ -damascenona y 2-feniletanal [36]. López *et al.* indicaron la importancia de feniletanol, de feniletil acetato, vanilina y detectaron adicionalmente algunos compuestos cuya identificación no fue posible con las herramientas utilizadas en su estudio [36]. El añejamiento ha sido estudiado también mediante perfiles de compuestos fenólicos, encontrándose la importancia de los ácidos gálico, procatecuico, vanílico, siríngico y ferúlico, entre otros [37].

### **1.2.3 Norma oficial mexicana para el análisis de tequila**

La norma oficial mexicana NOM-006-SCFI-2012, bebidas alcohólicas-tequila especificaciones, establece las características y especificaciones que deben cumplir todos los integrantes de la cadena productiva, industrial y comercial de tequila. En su sexto capítulo hace mención de los respectivos análisis que se deben hacer al tequila con el objeto de cumplir con los estándares de calidad para su distribución nacional o su exportación, según sea el caso. En la norma se hace mención de ciertos compuestos volátiles que pueden estar presente en altas concentraciones en el tequila tales como metanol, acetaldehído, acetato de etilo, alcoholes superiores y furfural, dichas cantidades son reguladas y deben ser estrictamente controladas [3].

De acuerdo con el consejo regulador del tequila, el producto debe de cumplir con las especificaciones señaladas en la *Tabla 2*.

**Tabla 2.** Especificaciones fisicoquímicas del tequila

Parámetros	Tequila blanco		Tequila Reposado		Tequila Añejo		Tequila Extra añejo		Método de ensayo <sup>(1)</sup>
	MIN	MAX	MIN	MAX	MIN	MAX	MIN	MAX	
Contenido alcohólico a 20 °C (% V/V)	35	55	35	55	35	55	35	55	NMX-V-013-NORMEX
Extracto seco (g/l)	0	0.30	0	5	0	5	0	5	NMX-V-017-NORMEX
Valores expresados en mg/100 ml de alcohol anhidro									
Alcoholes superiores	20	500	20	500	20	500	20	500	NMX-V-017-NORMEX <sup>(3)</sup>
Metanol <sup>(2)</sup>	30	300	30	300	30	300	30	300	NMX-V-017-NORMEX
Aldehídos (acetaldehído)	2	200	2	250	2	250	2	250	NMX-V-017-NORMEX
Esteres (acetato de etilo)	2	200	2	250	2	250	2	250	NMX-V-017-NORMEX
Furfural	0	4	0	4	0	4	0	4	NMX-V-004-NORMEX

(1) Los métodos o pruebas ensayo son referenciadas en el capítulo 3 de la norma

(2) El parámetro mínimo puede disminuir si el productor de Tequila demuestra al Organismo Evaluador de la Conformidad, que cuenta con un método viable para reducir el contenido de metanol.

(3) Para la determinación de alcoholes superiores en esta norma, sólo se permite el método por cromatografía de gases, debido a que el método espectrofotométrico (vía húmeda) no cuantifica el n-propanol presente en las muestras (ello para evitar que haya mucha diferencia con los resultados de alcoholes superiores debido al método utilizado en el laboratorio (cromatográfico o vida húmeda).

Para la comprobación de las especificaciones establecidas en la presente NOM, se aplicarán las normas oficiales mexicanas y normas mexicanas vigentes o las que las sustituyan y que se mencionan a continuación [3]:

## **Normas oficiales mexicanas**

NOM-127-SSA1-1994 Salud ambiental, agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización, publicada en el Diario oficial de la Federación el 18 de enero de 1996.

NOM-142-SSA1-1995, Bienes y servicios- Bebidas alcohólicas -Especificaciones sanitarias- Etiquetado sanitario y comercial, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 9 de julio de 1997.

NOM-251-SSA1-2009, Prácticas de higiene para el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 1 de marzo de 2010.

## **Normas mexicanas**

NMX-V-004-NORMEX-2005, Bebidas alcohólicas- Determinación de furfural- Métodos de ensayo. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 23 de junio de 2005.

NMX-V-005-NORMEX-2005, Bebidas alcohólicas-Determinación de aldehídos, ésteres, metanol y alcoholes superiores-Métodos de ensayo (prueba). Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 23 de junio de 2005.

NMX-V-017-NORMEX-2005, Bebidas alcohólicas-Determinación de extracto seco y cenizas- Métodos de ensayo (prueba). Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 23 de junio de 2005.

NMX-V-049-NORMEX-2004, Bebidas alcohólicas-Bebidas alcohólicas que contienen Tequila-Denominación, etiquetado y especificaciones. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 21 de mayo de 2004.

NMX-V-050-NORMEX-2010, Bebidas alcohólicas-Determinación de metales como Cobre (Cu), Plomo (Pb), Arsénico (As), Zinc (Zn), Hierro (Fe), Calcio (Ca), Mercurio (Hg), Cadmio (Cd), por absorción atómica-Métodos de ensayo (prueba). Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 22 de febrero de 2011.

Son aplicables para los efectos de la presente norma las especificaciones sanitarias relativas a metales pesados y metaloides contenidas en la NOM-142-SSA1, para lo cual debe tomarse en consideración la NMX-V-050-NORMEX-2010.

Dichas especificaciones son susceptibles de ser verificadas por parte de las Autoridades Competentes y por lo tanto su certificación, en términos de esta norma no es obligatoria.

### 1.3 Compuestos volátiles/semivolátiles como marcadores de añejamiento de licores

Los compuestos asociados con el aroma de un licor tales como acetales, aldehídos, cetonas, alcoholes, compuestos fenólicos, ésteres, terpenos y lactonas [2, 31], en gran parte provienen del proceso de añejamiento en la madera de roble. Los procesos que ocurren durante este añejamiento incluyen la extracción/solubilización de los componentes de la madera (principalmente taninos y compuestos aromáticos), la interacción de estos compuestos con los componentes del licor, los procesos provocados por microoxigenación (conversión de aldehídos fenólicos en sus respectivos ácidos y formación de ésteres de etilo), la inhibición del crecimiento de microorganismos, etc. [16]. Cabe también señalar que la variedad y concentración de los compuestos provenientes de la madera en los licores depende del tipo de madera, su tratamiento, el volumen del barril, el tiempo y las condiciones de almacenamiento y también depende de la composición inicial del licor que se deposita en el barril [16, 38].

El añejamiento en la madera de roble ha sido estudiado ampliamente en licores tales como whiskey y brandy, pero la información sobre tequilas es escasa. González-Robles *et al.* compararon los perfiles de los compuestos volátiles en tequilas añejo y blanco reportando los siguientes marcadores de maduración provenientes de madera: eugenol, guayacol, 4-etil guayacol, vanilina, whiskey lactona y lactona de roble [2], estos resultados fueron consistentes con trabajos anteriores realizados en otros tipos de licores [11, 12, 14, 16]. Algunos autores también reportaron compuestos volátiles/semivolátiles específicos que aportan el aroma del tequila. El particular, 3-metilbutanal, 3-metilbutanol,  $\beta$ -damascenona, 2-feniletanal y vanilina fueron asignados como componentes mayoritarios de aroma por Benn and Peppard [64]; por su parte, López *et al.* indicaron la importancia del feniletanol, feniletil acetato y vanilina, y adicionalmente detectaron algunos compuestos que no fueron identificados [31, 36]. En un trabajo enfocado a la determinación de compuestos fenólicos de baja masa molecular, Alcázar y col. asociaron la presencia de ácidos siríngico, vanílico, protocátequico y gálico con el proceso de maduración del tequila en barriles de roble [25].

De acuerdo a los diferentes estudios realizados se sabe que, durante la etapa de maduración del tequila, la concentración de los alcoholes superiores disminuye, contrario a lo ocurrido con el inminente aumento en la concentración de ácidos, aldehídos y ésteres, así mismo la importancia del tipo de carcasa en la barrica, la cual define las propiedades fisicoquímicas del tequila, sin embargo, los mecanismos de cómo evolucionan los compuestos volátiles durante la maduración y los factores que tienen impacto significativo en este fenómeno no han sido totalmente estudiados.

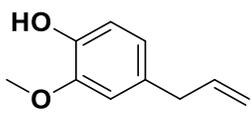
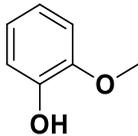
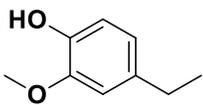
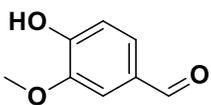
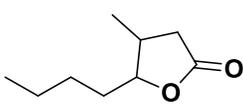
El grupo de investigación de Estarrón *et al.* propuso una metodología para comparar los cambios en las propiedades fisicoquímicas y en los perfiles de los compuestos volátiles presentes en el tequila durante la maduración; para ello, utilizaron diferentes tipos de barricas de roble francés, y llevaron a cabo la comparación de la variedad y concentración de los compuestos presentes de acuerdo con el tipo de barrica usada para la maduración del tequila y de acuerdo con el tiempo de maduración [12, 25, 38].

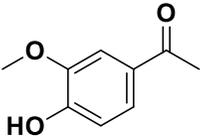
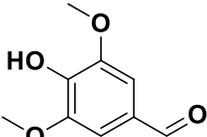
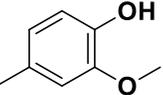
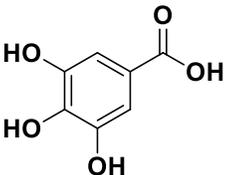
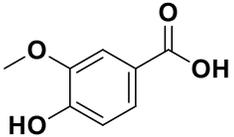
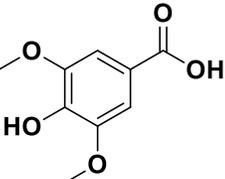
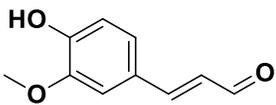
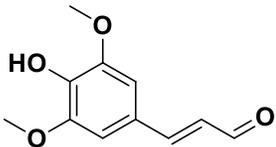
Por otro lado, los tequilas fueron clasificados de acuerdo con el tipo de barrica utilizada en la maduración con base en el color, turbidez y contenido de furfural. Con el modelo de discriminación propuesto GDA (análisis general de discriminación), se logró la clasificación de 69% de los tequilas de acuerdo con el tipo de barrica usada en su maduración [12, 36]. De manera similar, se utilizó el método GDA para discriminar los tequilas de acuerdo con el tiempo de maduración, seleccionando para ello 12 parámetros: color, pH, turbidez, furfural, acetato de etilo, 2-hidroxiopropanoato de etilo, acetaldehído, ésteres, metanol, 2-metilpropanol y 3-metilbutanol. Con el modelo construido fue posible clasificar 97 % de las muestras [2, 12].

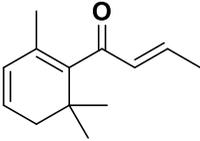
### 1.3.1 Compuestos volátiles/semivolátiles relacionados con la maduración del tequila en madera de roble

Como resultado de la revisión bibliográfica presentada en las secciones anteriores, en la *Tabla 3*, se muestra la lista de los compuestos claves asociados con el proceso de maduración de licores en madera. Se incluye el nombre del compuesto, su estructura química, tipo de licor donde se encontró, técnica analítica utilizada y referencia bibliográfica.

**Tabla 3.** Compuestos asociados con el proceso de maduración de licores en madera

Compuesto	Estructura	Licor	Técnica analítica	Ref.
eugenol		tequila cachaça whiskey brandi	GC-FID; GC-MS GC-FID; GC-MS GC-FID; GC-MS GC-MS	[2] [39] [40] [41]
guayacol		tequila whiskey vino (Rioja)	GC-FID; GC-MS GC-FID; GC-MS RP-HPLC	[2] [40] [42]
4-etil guayacol		tequila brandy vino(Rioja)	GC-FID; GC-MS HS-SPME-GC-MS/GC-O RP-HPLC	[2] [41] [42]
vanilina		tequila bebida japonesa brandy vino(Rioja)	GC-FID; GC-MS HPLC-DAD HS-SPME-GC-MS/GC-O RP-HPLC	[2] [43] [41] [42]
trans-whiskey lactona		tequila	GC-FID; GC-MS	[2]

apocinina		tequila	GC-FID; GC-MS	[2]
siringaldehído		tequila alcohol de caña de azúcar	GC-FID; GC-MS HPLC-DAD ESI-MS/MS	[2] [33] [39]
4-metil guayacol		tequila vino (Rioja)	GC-FID; GC-MS RP-HPLC; GC-MS	[2] [42]
ácido gálico		tequila vino	HPLC-ESI-ITMS HPLC-DAD ESI-MS/MS	[25] [33] [44]
ácido vanílico		tequila vino	HPLC-ESI-ITMS HPLC-DAD ESI-MS/MS	[25] [33] [44]
ácido siríntrico		tequila alcohol de caña de azúcar	HPLC-ESI-ITMS HPLC-DAD ESI-MS/MS	[25] [33] [39]
coniferaldehído		tequila alcohol de caña de azúcar	HPLC-DAD ESI-MS/MS	[33] [39]
sinapaldehído		tequila alcohol de caña de azúcar	HPLC-ESI-ITMS HPLC-DAD ESI-MS/MS	[25] [33] [39]

β- damascenona		tequila brandi vino tinto vino (Rioja)	GC-FID; GC-MS SPME-GC-MS/GC O HS-SPME-GC-IT/MS RP-HPLC; GC-MS	[2] [41] [45] [42]
----------------	---	---	--	-----------------------------

Cabe mencionar que en la *Tabla 3* se presentan aquellos compuestos que se mencionan comúnmente en la literatura a menudo con relación a tequilas. Estos compuestos son de interés en el presente trabajo de tesis, aunque se pretende incluir también una parte explorativa; es decir, se intentará identificar otros compuestos posiblemente presentes en tequilas, utilizando herramientas de espectrometría de masas.

## 1.4 Revisión bibliográfica enfocada en el análisis de compuestos volátiles en bebidas alcohólicas

### 1.4.1 Procedimientos basados en cromatografía de gases

La determinación de compuestos volátiles/semivolátiles que confieren aroma a las bebidas alcohólicas se lleva a cabo principalmente por cromatografía de gases utilizando diferentes tipos de detectores. La más común ha sido la técnica de olfatometría, basada en la evaluación del olor por asesores humanos [46] y en particular, técnica de diluciones sucesivas hasta llegar al umbral de percepción del olor por un experto [44, 47]. Sin embargo, cabe señalar que el sustento de la detección/identificación/cuantificación de los compuestos por el panel de expertos impone alta exigencia en cuanto al tratamiento de muestra, resolución cromatográfica, uso de cromatografía multi-dimensional, operación del puerto de olor y relacionado con estos requisitos, representa un costo elevado y tiempos largos del análisis.

Además, para algunos compuestos de interés el umbral de su aroma es relativamente alto, lo que limita la utilidad de olfatometría cuando es necesaria la cuantificación a nivel de trazas, ejemplo de ello son los compuestos fenólicos volátiles extraídos durante la etapa de maduración de la barrica de roble los cuales modifican el perfil organoléptico de la bebida.

De esta manera, se han encontrado trazas de 4-vinilfenol en madera de roble, sin embargo, su contenido se acerca a los umbrales olfatorios a concentración 605  $\mu\text{g/l}$  donde podía detectarse como un aroma medicinal y estable, otro ejemplo es el 4-etilfenol que puede ser detectado a umbrales olfatorios con concentración mayor a 425  $\mu\text{g/l}$  percibido como olor a cuero o sudor.

El guayacol y sus derivados, aunque presentan umbrales olfatorios más bajos, aun son niveles altos comparados con el poder de detección de los detectores de masas, Zhang *et. al* reportan para el guayacol y 4-metil guayacol un característico aroma ahumado y especiado con umbral olfatorio de 25 y 65  $\mu\text{g/l}$  respectivamente, también reportan para el 4-etil guayacol un umbral en la precepción del olor a partir de 33  $\mu\text{g/l}$  con un aroma ahumado y tostado.

Es por ello, que varios estudios han sido centrados en la aplicación de detectores másicos en el análisis de compuestos volátiles/semivolátiles responsables de las propiedades organolépticas y del olor en particular [1]. Las ventajas de espectrometría de masas respecto a otros tipos de detectores, incluyen: (i) identificación de compuestos con base en sus espectros de masa y de masas-masas, (ii) alta selectividad que puede recompensar por incompleta separación cromatográfica, (iii) posibilidad de utilizar métodos de cuantificación basados en monitoreo selectivo de iones o monitoreo de reacciones múltiples. En resumen, con la aplicación de espectrometría de masas, se tienen muy amplias posibilidades de descubrir nuevos compuestos y lograr la cuantificación confiable a bajos niveles de los compuestos conocidos utilizando relativamente cortas corridas cromatográficas.

Una etapa importante en el análisis por cromatografía de gases es el tratamiento de muestra. En el caso de licores, se han explorado dos tipos de extracciones: (i) liquido - liquido (LLE) y (ii) diferentes modalidades de extracción en fase solida (SPE) [1, 2, 10, 46]. Específicamente, González-Robles *et al.* compararon la LLE y SPE en el análisis de tequilas observando diferente selectividad de estas dos técnicas. De manera general, la eficacia de extracción fue mejor utilizando LLE, pero para compuestos semi-volátiles mejores resultados se obtuvieron utilizando SPE.

El pretratamiento de muestra mediante extracción permite eliminar potenciales interferentes y ofrece la preconcentración de analitos, pero al mismo tiempo aumenta el riesgo de la pérdida de compuestos importantes, el procedimiento se hace más laborioso, de mayor costo y el tiempo de análisis aumenta.

El análisis de compuestos orgánicos volátiles tanto en bebidas como en alimentos se realizan principalmente mediante cromatografía de gases, siendo los detectores más utilizados los siguientes: (i) detector de ionización de flama (FID) y (ii) espectrometría de masas (MS). Hay que resaltar que, en el contexto de las propiedades organolépticas de las bebidas alcohólicas, la cromatografía de gases es la técnica de primera selección por excelencia. Algunos ejemplos de este tipo de análisis se presentan en la *Tabla 4*. De manera general, en gran parte de las muestras analizadas en los diferentes trabajos revisados en bibliografía, el tratamiento de las muestras consiste en la extracción líquido-líquido o extracción en fase sólida.

**Tabla 4.** Algunas aplicaciones de cromatografía de gases para análisis de compuestos de importantes propiedades organolépticas de bebidas alcohólicas [1, 2, 17, 20, 24, 31, 37, 48-57].

<b>Bebida</b>	<b>Compuestos</b>	<b>Procedimiento</b>	<b>Comentarios</b>	<b>Ref</b>
tequila	59 compuestos volátiles fueron confirmados usando estándares; fenoles, esterés, ácidos grasos y aldehídos	GC-MS; GC-FID	Identificación y evaluación cuantitativa de compuestos volátiles presentes durante la elaboración de tequila	[2]
tequila	39 compuestos volátiles fueron cuantificados tanto en LLE como en SPE	LLE- GC-MS SPE-GC-MS GC-FID	Indicadores de añejamiento en barricas: eugenol, guayacol, 4-etil guayacol, vanilina y (E)/(Z)-whiskey lactona	[1]
tequila	Identificación de 30 compuestos aromáticos	GC-MS GC-ECD GC-AED	Identificación de compuestos que contribuyen a las propiedades organolépticas de tequila, vanilina, 2-feniletanol, alcohol isoamílico, isovaleraldehído, $\beta$ -damascenona,	[31]
vino tinto	4-etilguayacol, metilguayacol, 4-etilfenol, whiskey lactona, guayacol, eugenol, vanilina, siringaldehído, furfural, 5-hidroximetilfurfural	GC-MS	Evaluación comparativa entre el uso de barricas nuevas y reutilizadas en la concentración de compuestos volátiles provenientes de la maduración y compuestos furánicos	[49]
vino tinto (Rioja)	Identificación de 52 compuestos olfativos	GC-MS	Evaluación sensorial de los principales compuestos aromáticos en vino añejo. (E)-whiskey lactona, 4-etilfenol, $\beta$ -damascenona, eugenol, ácido valérico y ácido hexanoico	[42]

vino tinto	1-hexanol, 1-butanol, ácido hexanoico, ácido octanoico, 2-feniletacetato, dietil succinato, 1-feniletanol	GC-MS; GC-FID	Estudio de la composición de compuestos fenólicos y compuestos volátiles y su relación con el tipo de tecnología de añejamiento	[48]
ron blanco vodka	acetato isoamílico, etil octanoato, etil decanoato, isoamil octanoato, etil dodecanoato, etil oleato	SAX-SPE-GC-MS SPME-GC-MS	Aplicación de diferentes técnicas de extracción para análisis de ácidos grasos y ésteres en diferentes tipos de bebidas alcohólicas	[20]
mezcal	metanol, ácido acético, 2-propanol, propanol, 2-metil-1-propanol, butanol, 3-metil-butanol,	GC-FID	Evaluación de compuestos volátiles mayoritarios durante producción de mezcal comparando dos especies de agaves procedentes del estado de Oaxaca	[50]
destilado de caña de azúcar	acetaldehído, isobutanol, etil acetato, metanol, propanol, isobutanol, isoamil alcohol, ácido gálico, furfural, 5-HMF, ácido vanílico, ácido siríngico, coniferaldehído vanilina, sinapaldehído	GC-FID	Estudio del perfil de compuestos volátiles y marcadores específicos de añejamiento comparando diferentes barricas elaboradas con distinto tipo de madera	[51]
whiskey	65 compuestos volátiles identificados con SPME 55 compuestos aromáticos identificados usando LLE	GC-FID LLE-GC-ITMS HS-SPME-GC-ITMS	Cuantificación de compuestos volátiles en diferentes muestras de whiskey, comparando perfiles de LLE y HS-SPME	[37]
cachaça	acetato de etilo y alcoholes superiores, ácidos orgánicos, ésteres. Un total de 38 compuestos fueron cuantificados	GC-FID GC/MS	Comparación entre metodologías SPME y LLE, en la identificación y cuantificación de alcoholes superiores y acetato de etilo	[17]
destilado de azúcar de caña	aldehídos, ésteres, alcoholes superiores: n-propílico, isobutanol, metanol, alcohol isoamílico	GC-FID	Evaluación de la composición química de aguarra durante el añejamiento en barricas de roble.	[52]
destilado de caña de azúcar	alcoholes, aldehído, ésteres, alcoholes superiores	GC-FID	Evaluación del efecto de la barrica sobre la calidad y composición química de la cachaça durante el añejamiento	[53]
cachaça	acetato de etilo, alcoholes superiores, ácidos orgánicos, ésteres, Un total de 70 compuestos fueron identificados	GC x GC/ TOFMS	Estudio de la composición química durante la fermentación, y después del añejamiento, obtención de perfiles de compuestos volátiles característicos para cachaça	[54]

destilado de uva	33 compuestos orgánicos volátiles	GC-FID	Desarrollo y validación de una metodología simple para la determinación de compuestos volátiles presentes en destilado de uva.	[55]
destilado de cereza	32 compuestos aromáticos fueron identificados (ésteres, ácidos, benzaldehído, linalool)	GC-FID GC-MS	Estudio en la composición de compuestos volátiles y sobre las características sensoriales, usando diferentes tipos de cerezas	[56]
bebidas de mezcal	105 compuestos fueron identificados, incluyendo alcoholes, cetonas, ésteres, ácidos orgánicos, furanos, terpenos entre otros	HS-SPME-GC-MS	Desarrollo de una metodología para identificación de los compuestos principales provenientes de bebidas de agave, compuestos como indicadores de autenticidad	[24]
tequila	Esteres, aldehídos, acetato de etilo, 2-metilpropanol, 3-metilbutanol	GC-FID	Evaluación de los cambios de los parámetros fisicoquímicos y compuestos volátiles durante el añejamiento de tequila	[57]

#### 1.4.2 Procedimientos basados en cromatografía de líquidos

Las aplicaciones de HPLC no incluyen la separación de compuestos volátiles. En contexto de las propiedades organolépticas de las bebidas alcohólicas, esta técnica separativa ha sido utilizada principalmente en el análisis de compuestos fenólicos. Algunos ejemplos de este tipo de análisis se presentan en la *Tabla 5*. De manera general, el tratamiento de muestra consiste en una simple dilución, filtración y/o centrifugación de la muestra, la separación se lleva a cabo en columnas de fase inversa y el típico detector es el espectrofotométrico de arreglo de diodos.

Algunos autores utilizaron espectrometría de masas para asegurar una mejor selectividad y poder de detección o para fines de confirmación/identificación de compuestos.

**Tabla 5.** Algunas aplicaciones de cromatografía de líquidos en el análisis de compuestos de importancia para propiedades organolépticas de bebidas alcohólicas [25-27, 33, 39, 51, 58-61].

<b>Bebida</b>	<b>Compuestos</b>	<b>Procedimiento</b>	<b>Comentarios</b>	<b>Ref.</b>
tequila	31 compuestos fenólicos de baja masa molecular	HPLC-ESI-ITMS, SIM	Indicadores de añejamiento en barricas: ácido siríngico, vanílico, procatecuico y gálico	[25]
licores de caña de azúcar	vanilina, ácido vanílico, siringaldehído, sinapaldehído, ácido gálico, HMF, furfural	HPLC-UV	Evaluación comparativa de diferentes tipos de madera brasileña utilizada en maduración de licores	[51]
tequila	ácido gálico, ácido vanílico, ácido siríngico, vanilina, siringaldehído, coniferaldehído, sinapinaldehído	HPLC-DAD	Indicadores de añejamiento y su evolución de acuerdo con tiempo de maduración del tequila.	[33]
cerveza	ácido sinápico, 4-etilguayacol, ácido ferúlico, 4-vinilguayacol	RP-HPLC-ECD	Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos presentes en cerveza	[59]
vino griego	compuestos fenólicos, catecol, ácido gálico, ácido <i>p</i> -cumarico, ácido vanílico, ácido ferrulico, ácido siríngico, epicatequina	RP-HPLC-DAD	Evaluación comparativa de diferentes tipos de vinos griegos, estudiando el contenido de compuestos fenólicos y el efecto del tiempo de añejamiento	[60]
licores de caña de azúcar	14 compuestos fenólicos de baja masa molecular	HPLC-DAD HPLC-ESI-MS	Evaluación comparativa de diferentes tipos de madera brasileña, y americana utilizada en la maduración de licores vanilina, ácido vanílico, siringaldehído, sinapaldehído...	[39]
mezcal	Contenido total de fenol, expresado como equivalentes de ácido gálico (GAE)	HPLC-DAD	Determinación del cambio de perfil fenólico del mezcal durante el añejamiento	[26]
vino espumoso	32 compuestos fenólicos de baja masa molecular	HPLC-DAD HPLC-MS	Evolución de los compuestos fenólicos durante tiempo de añejamiento	[61]

vino	10 compuestos fenólicos de baja masa molecular, incluyendo ácido gálico, ferrulico, siríngico...	SPE-HPLC-DAD	Desarrollo de metodología automática para determinación de compuestos volátiles en vinos	[58]
------	--	--------------	--	------

## 1. 5. Justificación del proyecto

Debido a poca información sobre la variedad y concentración de compuestos volátiles que confieren propiedades organolépticas a los tequilas madurados en barricas de madera, así como a la demanda de esta información por parte de las compañías tequileras, el objetivo de este trabajo es identificar compuestos volátiles indicativos de la maduración del tequila y poner a punto un nuevo procedimiento para su determinación en tequilas del mercado.

En la parte de la selección de los compuestos, se propone realizar screening de una serie de tequilas incluyendo tequilas blancos, reposados y añejos. Los datos obtenidos se analizarán mediante herramientas de análisis multivariante buscando aquellas señales analíticas y compuestos que sean característicos para cada uno de los grupos de tequila (blancos, reposados, añejos). Una alternativa es el método de componentes principales (PCA), el cual, mediante la reducción de la dimensionalidad del sistema, permite asignar parámetros de mayor importancia para las muestras del sistema estudiado (diferentes tipos de tequilas) y hallar posibles relaciones entre estos parámetros; dicho método ha sido utilizado en el grupo de trabajo en el análisis de tequilas y otros tipos de muestras [4, 25, 62]. Otra posibilidad es el test-t incluido en programas de software de los equipos disponibles en el laboratorio (gráfica volcano). Con base en los resultados del test-t y PCA, se pretende identificar los compuestos cuyas señales aparezcan (o presenten mayor abundancia) en los tequilas añejos respecto a otros grupos de tequilas. Una vez definidos los compuestos provenientes de la etapa de maduración, se desarrollará un procedimiento analítico para su cuantificación, basado en la separación por cromatografía de gases y la detección por espectrometría de masas.

La gran ventaja de los detectores másicos es utilizar en la cuantificación las opciones de monitoreo de iones selectivos o monitoreo de reacciones múltiples.

En el laboratorio se cuenta con el cromatógrafo de gases de triple cuadrupolo (Scion TQ, Bruker Daltonics); este detector permite adquirir los datos en las siguientes modalidades: barrido completo (FULL SCAN) en el que se obtiene un cromatograma total de iones (TIC), monitoreo selectivo de iones (SIM), monitoreo de productos de fragmentación de iones precursores (PRODUCT), monitoreo de iones precursores (PRECURSOR) y monitoreo de reacciones múltiples (MRM).

Para screening de los tequilas se piensa utilizar el modo de barrido completo (FULL SCAN), realizando adquisición continua y virtualmente simultánea de todos los valores  $m/z$  en el intervalo establecido inicialmente; el cromatograma TIC obtenido permite detectar la presencia de compuestos y asignar los picos cromatográficos que corresponden a la elución de cada uno de ellos. De esta manera, se generarán datos para el análisis PCA, pero sin posibilidad de cuantificación debido a la falta de selectividad y bajos valores S/N.

Por otro lado, una vez teniendo la lista de los compuestos de interés se puede utilizar el modo SIM que consiste en la extracción, a partir del TIC, los iones más abundantes de cada uno de ellos, reduciendo el ruido para aumentar los valores S/N.

En la tercera parte de trabajo, se propone explorar otras alternativas del análisis del tequila mediante espectrometría de masas de alta resolución, eliminando la etapa de separación cromatográfica. Para ello, se montó un sistema de análisis por inyección al flujo (FIA) para la introducción directa de la muestra a la fuente de ionización por electro-nebulización del espectrómetro con analizador de cuadrupolo – tiempo de vuelo (ESI-QTOF-MS).

Finalmente, se llevó a cabo el análisis de una serie de tequilas por cromatografía de líquidos en escala capilar (capHPLC), acoplada al ESI-QTOF-MS. Utilizando datos crudos obtenidos, con ayuda de las herramientas de análisis de datos disponibles se exploró la factibilidad de discriminación entre tequilas dependiendo del grado de su añejamiento.

## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivo general**

Identificar compuestos volátiles indicativos de la maduración de tequila, desarrollar un procedimiento analítico para su determinación basado en cromatografía de gases con detector másico utilizando monitoreo selectivo de iones y explorar otras alternativas del análisis de tequilas empleando espectrometría de masas de alta resolución.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Seleccionar compuestos volátiles asociados con el proceso de maduración de tequila, mediante screening de una serie de tequilas comerciales (blancos, añejos, reposados) y el análisis multivariante.
- Estudiar sistemáticamente las condiciones de cuantificación de cada uno de los compuestos seleccionados, explorando las modalidades de adquisición de las señales.
- Poner a punto un procedimiento por GC-MS y/o GC-MS/MS para la determinación de los compuestos asignados como indicadores del proceso de maduración; evaluación de los parámetros analíticos y aplicación del procedimiento desarrollado para el análisis de licores disponibles en el mercado mexicano.
- Explorar la posibilidad de determinar los mismos indicadores de maduración mediante ESI-QTOFMS sin previa separación por cromatografía de líquidos.
- Llevar a cabo un estudio explorativo de la composición de tequila, utilizando el sistema capHPLC-ESI-QTOFMS.

### 3. Parte experimental

#### 3.1 Reactivos y disolventes

- Acetato de etilo, grado HPLC
- Acetonitrilo, grado HPLC
- Agua desionizada
- Carburo de calcio
- Cloruro de Sodio
- Formiato de sodio
- Isopropanol, grado HPLC
- Sulfato de sodio anhidro

#### 3.2 Instrumentación analítica

- Cromatógrafo de gases con detección de masas de triple cuadrupolo (GC-TQMS). Modelo Bruker Scion 459TM, GC-TQMS. Columna BP5-MS de Bruker (**30 m x 0.25 mm, 0.25  $\mu$ m**).
- Cromatógrafo de gases con detección por ionización con flama (GC-FID), con auto muestreador. Modelo Clarus 500 de Perkin Elmer. Columna PE-XLB de Perkin Elmer (**30 m x 0.25 mm x 0.25  $\mu$ m**)
- UHPLC Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific)
- Maxis Impact QTOF-MS (Bruker Daltonics)
- Purificador de agua Milli Q Labconco Water PRO-PS
- Centrifuga Thermo Scientific Sorvall Legend Micro 17
- Balanza analítica

### 3.3 Software utilizado

- Agilent Chemstation. Data analysis, análisis de datos de GC-FID
- Chemdraw Professional 15.0, dibujo de las estructuras químicas de moléculas
- DataAnalysis Versión 4.1, análisis de datos de ESI-QTOF-MS
- Microsoft Office 2016
- MS-Workstation, MS Data Builder versión 8.2, Bruker Daltonics SCION TQMS 45X-GC
- ProfileAnalysis Versión 2.1, para análisis de datos de ESI-QTOF-MS
- Programa Grams 8.0 para conversión de formatos de datos en GC-FID
- TotalChrom Navigator, Versión 6.2.1, control de GC modelo Clarus 500 de Perkin Elmer

### 3.4. Estándares

- (*E*)-whiskey lactona (5-butildihidro-4-metil-2(3H)-furanona)
- (*Z*)-whiskey lactona (5-butildihidro-4-metil-2(3H)-furanona)
- 2-acetiltiazol (estándar interno)
- apocinina (4'-hidroxi-3'-metoxiacetofenona)
- 4-etil guayacol (4-etil-2-metoxifenol)
- eugenol (2-metoxi-4-(2-propenil) fenol)
- guayacol (2-metoxifenol)
- 4-metil guayacol (2-metoxi-4-metilfenol)
- siringaldehído (4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzaldehído)
- vanilina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído)

### 3.5 Muestras

En total, se analizaron 28 muestras de tequila, las cuales fueron proporcionadas por el Consejo Regulador del Tequila, clasificadas como: 11 tequilas blancos, 11 tequilas reposados, 10 añejos y 8 extra-añejos. Se analizaron 7 muestras de cada grupo con tres repeticiones de cada una de ellas tomando alícuotas de 1 ml (*Tabla 6*).

**Tabla 6.** Muestras de tequila analizados en este trabajo para determinación de compuestos volátiles indicadores de añejamiento por GC-TQMS

Tequila	Número de muestras
Blanco	7
Reposado	7
Añejo	7
Extra-añejo	7

## 4. Resultados y discusión

### 4.1 Introducción

Debido a la poca y no uniforme información sobre el tipo de componentes y la concentración de los compuestos volátiles presentes antes y después del proceso de maduración en barricas de madera aunado a la demanda de esta información por parte de la industria tequilera, el enfoque del trabajo como ya se mencionó en la justificación fue identificar los compuestos volátiles indicativos de la maduración del tequila mediante un análisis estadístico (prueba t) y poner a punto un nuevo procedimiento para la determinación estos compuestos volátiles logrando obtener una metodología para discriminar e identificar entre tipos de tequilas: (i) blanco, (2) reposado, (3) añejo y (iv) extra añejo (*Fig. 2*).

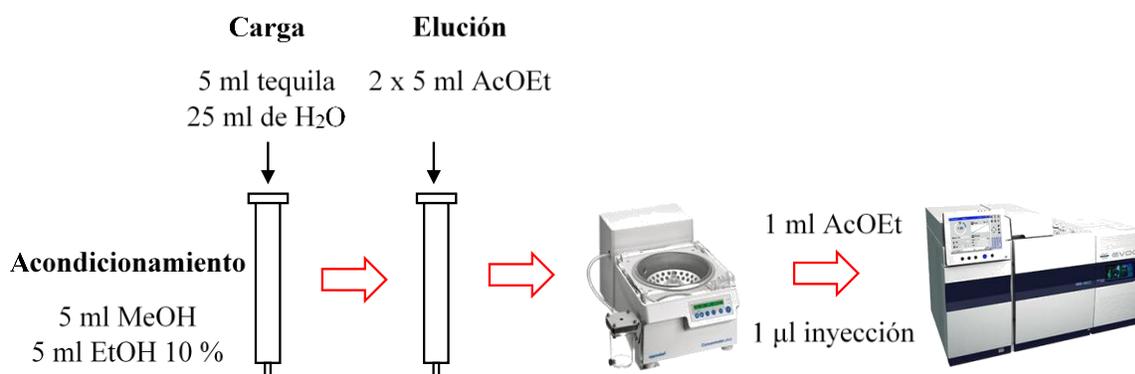


**Figura 2.** Proceso de maduración de tequilas en barricas de roble, almacenadas en condiciones óptimas de humedad y temperatura; tequila reposado (3 meses), añejo (1 año) y extra-añejo (3 años).

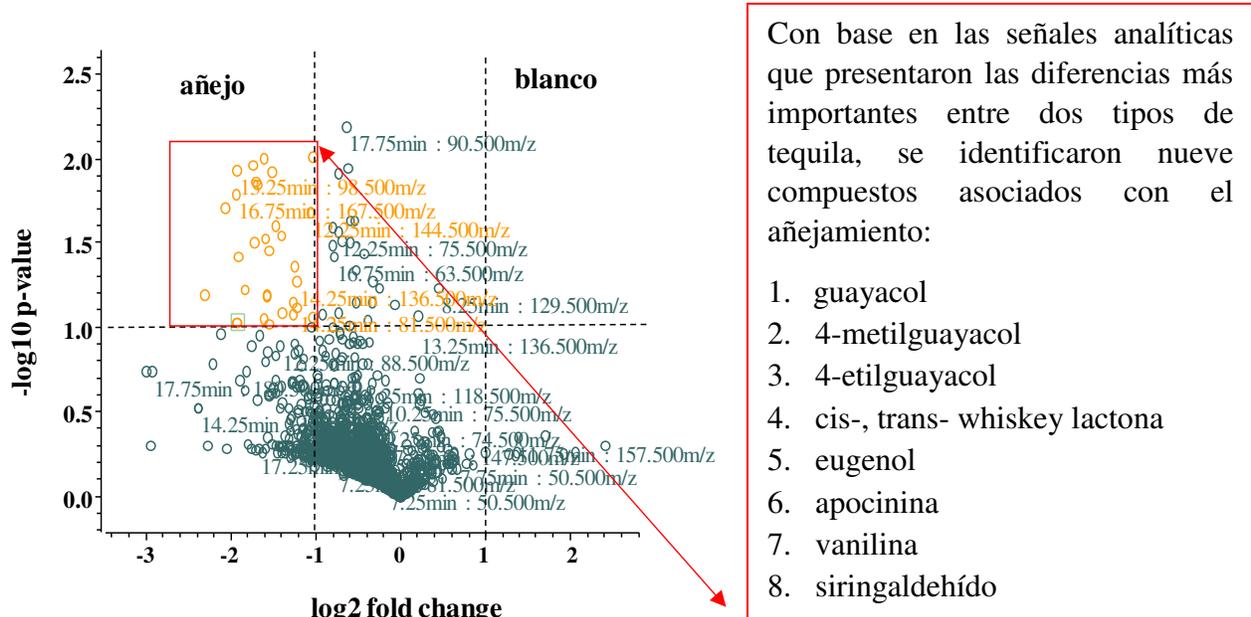
#### **4.2 Identificación de compuestos volátiles que confieren el aroma al tequila en la etapa de maduración en barricas de roble**

Para seleccionar aquellos compuestos que confieren el aroma al tequila en la etapa de maduración en barriles de roble, se realizó un screening de una serie de tequilas incluyendo tequilas blancos, reposados y añejos. El análisis se llevó a cabo por cromatografía de gases con detector másico. El tratamiento de la muestra consistió en la extracción en fase sólida (SPE), para lo cual se seleccionó un cartucho con la fase HLB (200 mg). Se tomaron muestras de tequila con volumen de 5 ml y se diluyeron con 25 ml de agua. Una vez acondicionado el cartucho (5 ml de MeOH, 10% EtOH 5 ml), se cargó la muestra y los compuestos volátiles retenidos se eluyeron con 2 x 5 ml de AcOEt. El extracto se secó con sulfato de sodio y se evaporó hasta el volumen de 1 ml. La muestra tal preparada (1  $\mu$ l) se introdujo al sistema GC-TQMS operado en el modo Full Scan en un intervalo de  $m/z$  40-250. (Véase *Fig. 3*). En este modo de adquisición, se registran de manera continua y virtualmente simultánea todos los valores  $m/z$  en el intervalo establecido inicialmente; el cromatograma de iones totales TIC obtenido permite detectar la presencia de compuestos y asignar los picos cromatográficos a compuestos individuales (si se tiene disponibles los estándares auténticos).

De esta manera, se generarán datos para el análisis estadístico, pero sin posibilidad de cuantificación debido a la falta de selectividad y bajos valores S/N. Cabe también señalar que los perfiles de elución en las diferentes muestras se comparan directamente, sin necesidad de identificar todos compuestos presentes en la muestra. Dicha identificación es necesaria solamente para conocer compuestos que presentan cambios de abundancia entre diferentes muestras, en nuestro caso, los compuestos que distinguen a los diferentes tipos de tequilas. Las condiciones cromatográficas fueron establecidas usando un cromatógrafo de gases con detección de masas de triple cuadrupolo (GC-TQMS). La Columna BP5-MS de Bruker (30 m x 0.25 mm, 1.0  $\mu$ m), empezando con temperatura en el horno de 40 °C (2 min) seguido por una rampa de 10 °C/min hasta 250 °C (2.5 min). El gas helio fue usado como gas de arrastre con flujo de 1 ml/min e inyección (1  $\mu$ l, temperatura 250 °C) en modo Split 1:10 y duración total de la cromatografía de 25.5 min.

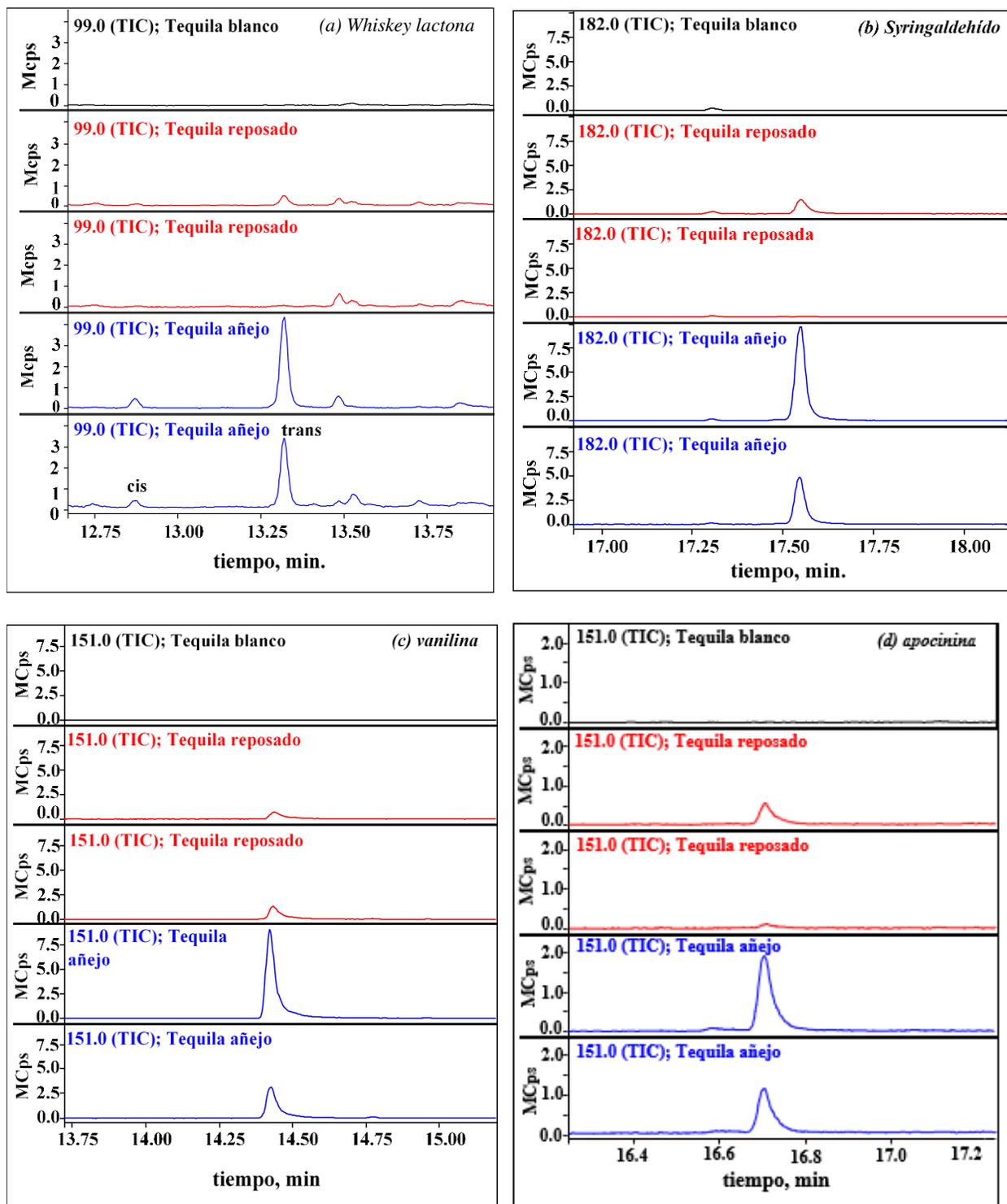


**Figura 3.** Procedimiento de extracción de compuestos volátiles indicadores de la maduración usando extracción en fase sólida (HLB como sorbente) para el screening de compuestos volátiles/semi-volátiles en tequilas.

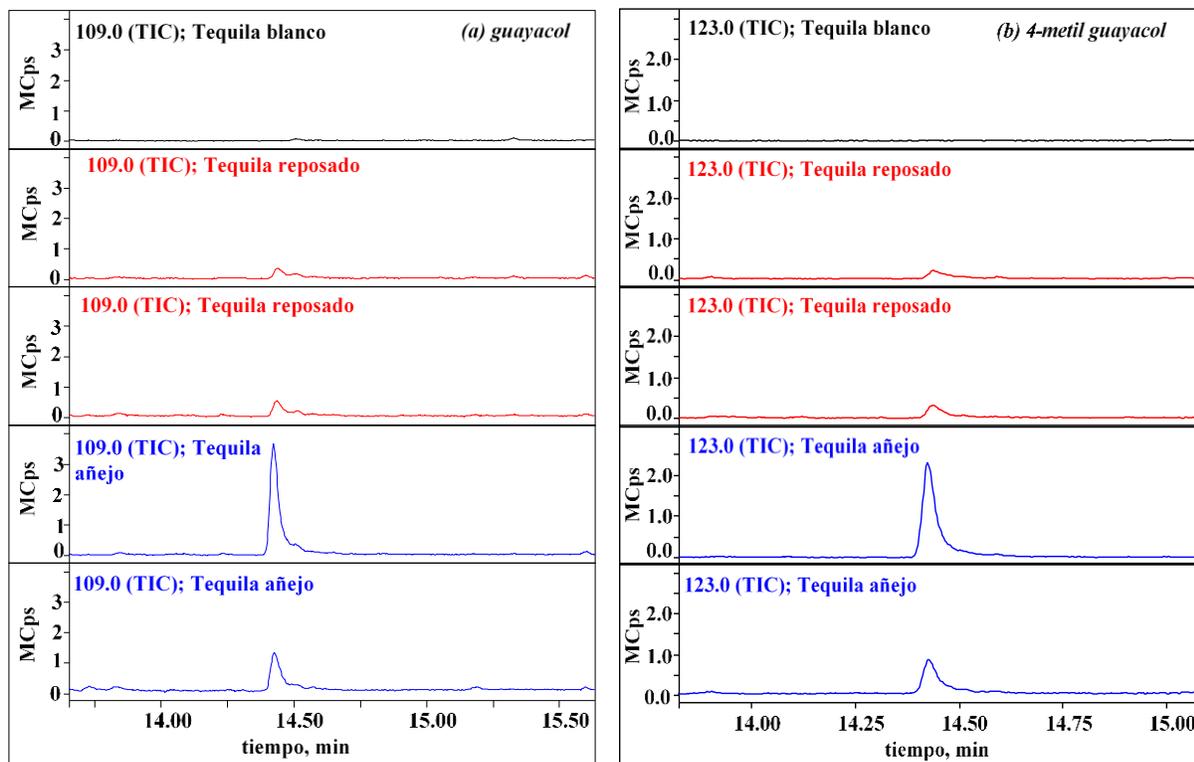


**Figura 4.** Gráfica volcano obtenida mediante prueba t de la comparación de dos tipos de tequila (añejo y blanco) usando datos de GC TQMS (cada círculo representa un ion con respectivo tiempo de retención).

Los datos GC-MS obtenidos para las muestras de tequilas añejos y blancos fueron importados a ProfileAnalysis y se llevó a cabo la prueba t obteniéndose la gráfica volcano, misma que se muestra en la Fig. 4, la zona marcada con un cuadro contiene las señales que presentaron los cambios más notorios a nivel estadísticamente significativo entre dos tipos de tequila. Cada uno de los círculos amarillos dentro del cuadro corresponde a un ion y su respectivo tiempo de retención en el cromatograma, el cual presentó mayor abundancia en tequilas añejas respecto reposadas, asumiendo el nivel de significancia estadística  $p < 0.05$ . Una vez encontrados los iones asociados con el tequila añejo, se procedió con la identificación de compuestos respectivos que podrían servir como indicadores de añejamiento en barriles de madera. Con base en los tiempos de retención, espectros de masa y datos de la librería NIST/EPA/NIH versión 2.0, 2011, los compuestos seleccionados fueron: guayacol, 4-metilguayacol, 4-etilguayacol, cis-, trans- whiskey lactona, eugenol, apocinina, vanilina y siringaldehído. En Fig. 5 y 6, se presentan cromatogramas de iones extraídos obtenidos para cada uno de los compuestos identificados en tres tipos de tequilas, donde claramente se observa una mayor cantidad de cada uno de ellos en tequilas añejas respecto a los blancos y reposados.



**Figura 5.** Cromatograma de ion extraído (EIC) para algunos de los compuestos identificados como indicadores de añejamiento en tequilas mediante extracción SPE, (a) cis-, tras- whiskey lactona; (b) siringaldehído; (c) vanilina y (d) apocinina.



**Figura 6.** Cromatograma de ion extraído (EIC) para algunos de los compuestos identificados como indicadores de añejamiento en tequilas de muestra mediante SPE, (a) guayacol; (b) 4-metilguayacol.

Con base en los resultados obtenidos, se seleccionó a nueve compuestos como candidatos a indicadores de añejamiento del tequila en barricas de madera y se procedió con el desarrollo de un nuevo procedimiento para su determinación, buscando simplificar el proceso de tratamiento de muestra, así como mejorar la selectividad y el poder de detección afinando el proceso cromatográfico y utilizando el modo SIM.

### **4.3 Desarrollo de un nuevo procedimiento basado en GC-TQMS para la determinación de nueve indicadores de añejamiento de tequilas en barricas de roble.**

Una etapa importante para análisis en cromatografía de gases es el pretratamiento de muestra; de acuerdo con la revisión bibliográfica, en los licores se han explorado dos tipos de extracciones: (i) líquido-líquido (LLE) y (ii) extracción en fase sólida (SPE) [1, 2, 8, 10, 11, 16, 17]. Específicamente Gonzales *et. al.* compararon la LLE y SPE en análisis de tequila encontrando diferentes selectividades de las técnicas [1]. La eficacia de extracción fue mejor en LLE, pero para compuestos semi-volátiles los mejores resultados fueron obtenidos con la extracción en fase sólida. El pretratamiento de la muestra usando la extracción permite eliminar los interferentes y ofrece la ventaja de pre-concentrar los analitos, pero al mismo tiempo aumenta el riesgo de pérdida de compuestos importantes, el proceso se vuelve más laborioso, de mayor costo y el tiempo de análisis de las muestras aumenta considerablemente. En este contexto, la idea original del proyecto de tesis fue simplificar el procedimiento de extracción líquido- líquido, utilizando un sistema de tres solventes (agua-etanol-acetato de etilo) y logrando la separación de fases por adición de una sal. Una vez eliminada el agua, la muestra puede introducirse al sistema GC-TQMS.

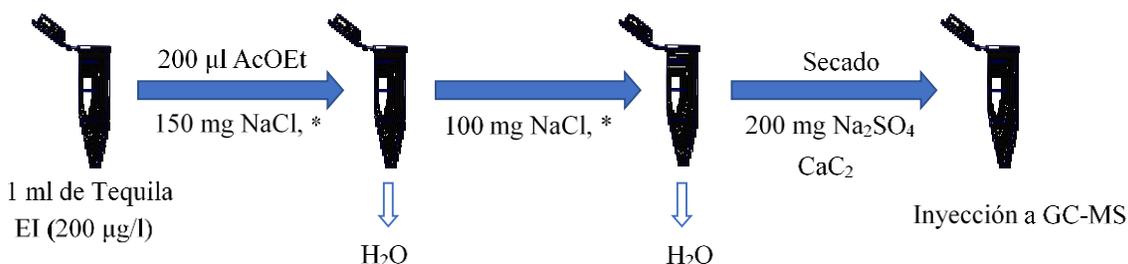
#### **4.3.1 Protocolo de tratamiento de muestra**

Para establecer el protocolo de tratamiento de muestra, se tomaron en cuenta los siguientes aspectos:

- (i) Uso de 2-acetil tiazol como estándar interno (EI); el EI debe agregarse directamente a la muestra en una concentración que produzca la magnitud de la señal analítica comparable o mayor que las señales de los estándares en el más alto punto de la curva de calibración.
- (ii) Uso de acetato de etilo como solvente, debido a la solubilidad de los compuestos de interés en este solvente y su miscibilidad con el etanol presente en el tequila.
- (iii) Adición de cloruro de sodio para la separación de fases por el efecto “salting out”: la fase acetato de etilo-etanol contiene los analitos y la fase acuosa es descartada.
- (iv) Adición de sulfato de sodio anhidro para eliminar trazas de agua.

- (v) Optimización de cada uno de los pasos para asegurar el uso de mínimas cantidades de solventes, poder realizar operaciones en viales de volumen pequeño, así como ajustar la cantidad de muestra y de solventes para que las señales de los analitos estén dentro del intervalo de calibración.

El protocolo establecido se muestra en *Fig. 7*. En concreto, se tomaron tres alícuotas de 1 ml para cada una de las muestras de tequilas y se les adicionó 10 µl del EI (20 µg/ml). La extracción se llevó a cabo con 200 µl de AcOEt, agregando 150 mg de NaCl. Las muestras se centrifugaron (5 min, 7200 g) recuperando la fase orgánica. Posteriormente, se adicionó 100 mg de NaCl para separar el agua restante; y finalmente, la fase orgánica extraída se secó con 0.20 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro antes de su introducción al sistema GC-TQMS.



**Figura 7.** El procedimiento de extracción de los compuestos volátiles de interés propuesto para el análisis de tequilas.

#### 4.3.2 Condiciones instrumentales establecidas para el análisis de compuestos volátiles por GC-TQMS en modo SIM.

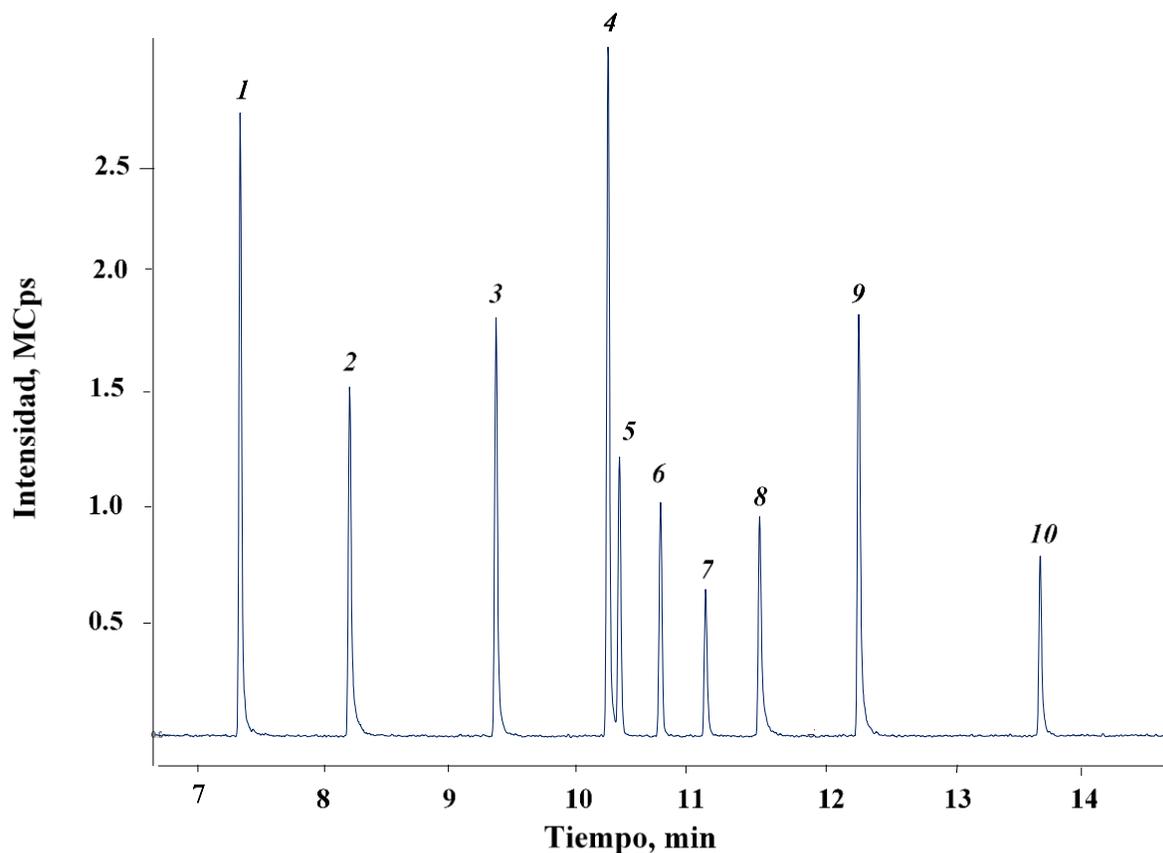
Para establecer las condiciones de separación cromatográfica y detección por GC-TQMS en modo SIM de los nueve compuestos seleccionados como indicadores de la maduración y del 2-acetiliazol (EI), se utilizó una solución stock mixta con una concentración de 5 µg/ml para cada uno de los estándares: guayacol, 4-metilguayacol, 4-etilguayacol, cis-whiskey lactona, trans-whiskey lactona, eugenol, vanilina, apocinina, siringaldehído y EI. El objetivo fue obtener un tiempo de separación relativamente corto, pero el cual asegure la detección selectiva y sensible en el modo SIM. Se utilizó una columna capilar BP5-MS para GC-MS; apta para un amplio intervalo de temperatura (60 °C a 325 °C); con dimensiones de 30 m x 0.25 mm, 0.25 µm y de bajo sangrado.

Se eligió la inyección con split (10:1). Con la adquisición en modo FULL SCAN ( $m/z$  50- 400), se probaron diferentes gradientes de temperatura y flujo de gas de arrastre (He) para encontrar las mejores condiciones de separación, en la *Tabla 7* se presentan las condiciones finales que permitieron la resolución de todos los picos cromatográficos. Utilizando estas condiciones, se propusieron los parámetros de adquisición en el modo de monitoreo selectivo (SIM) de los iones seleccionados.

**Tabla 7.** Condiciones instrumentales para análisis de nueve compuestos volátiles indicadores de añejamiento por GC-MSTQ en modo SIM.

<b>Parámetro</b>	<b>Condiciones seleccionadas</b>			
Inyector	1 $\mu$ l			
Temp. de inyector	250 °C			
Split	10:1			
Flujo de gas acarreador	1 ml/min He			
Columna	BP5-MS (30 m x 0.25 mm, 0.25 $\mu$ m)			
Programa de temperatura del horno	°C/min	Temp. °C	Hold (min)	Total (min)
	-	40.0	2.0	2.0
	14.0	250.0	1.0	18.0
Temp. de fuente de ionización	250 °C			
Modo de adquisición	SIM			
Temp. de línea de transferencia	250 °C			

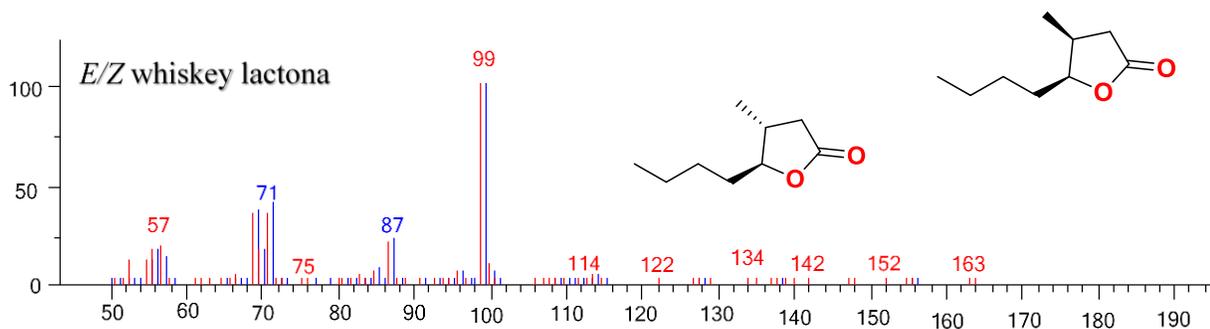
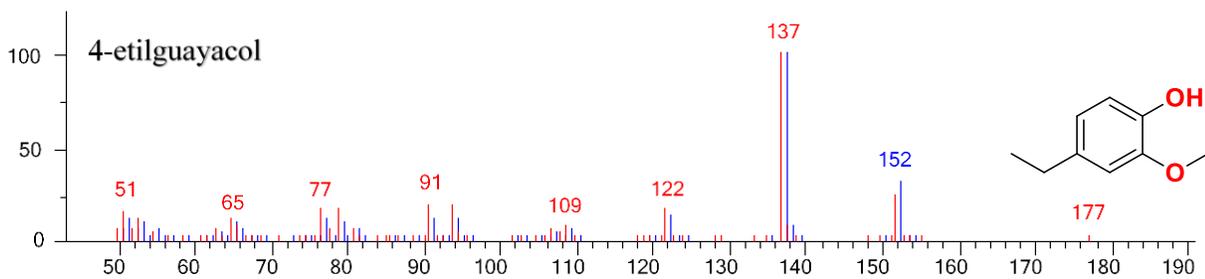
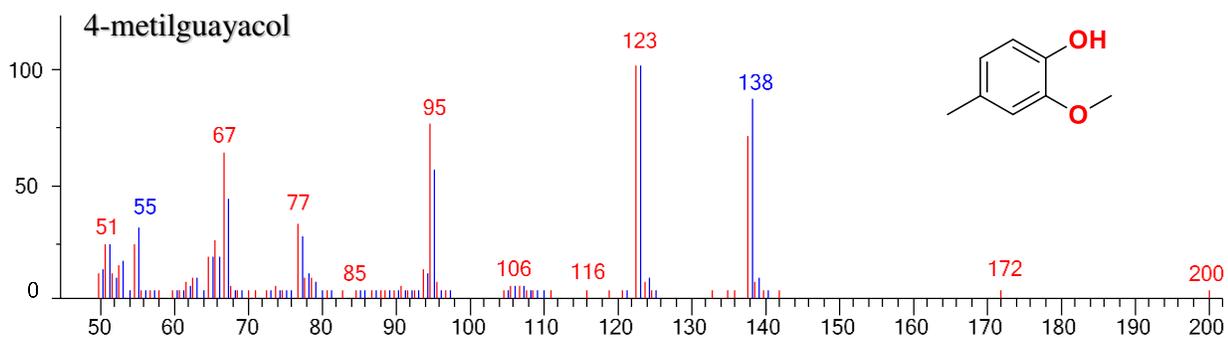
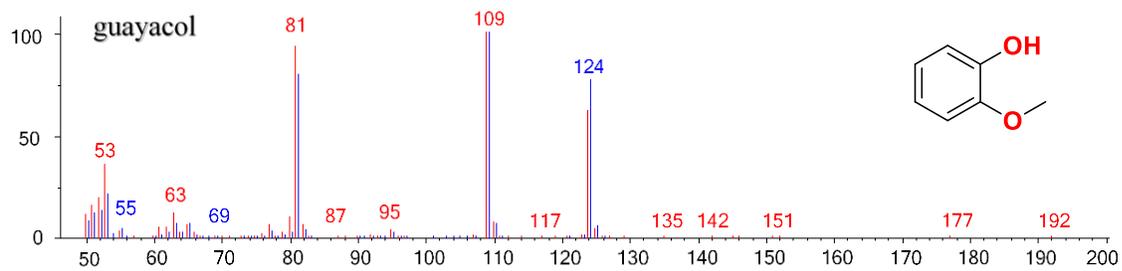
El tiempo total del cromatograma fue de 18 minutos (el detector de masas fue encendido hasta el minuto 7 de la cromatografía), logrando la correcta resolución de todos los compuestos. En la *Fig. 8* se presenta el cromatograma TIC obtenido a partir de una solución mix con los estándares con concentración de 10  $\mu$ g/ml, las señales cromatográficas fueron asignadas a los compuestos individuales de acuerdo con el tiempo de retención y la comparación de los espectros de masas obtenidos con los incluidos en librería NIST/EPA/NIH versión 2.0, 2011.

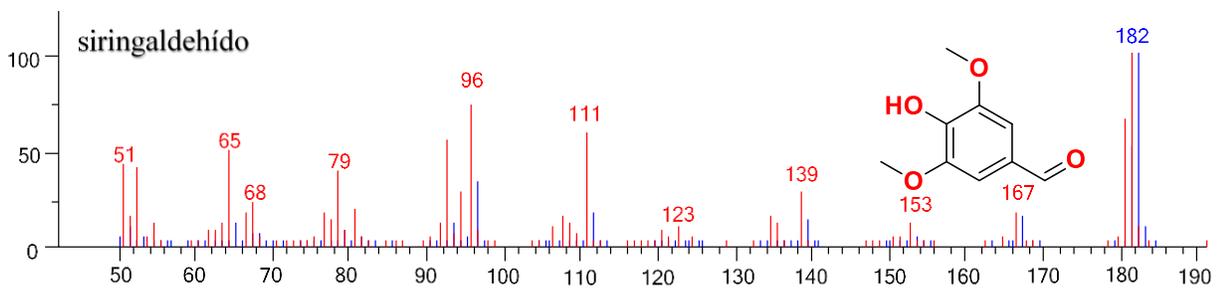
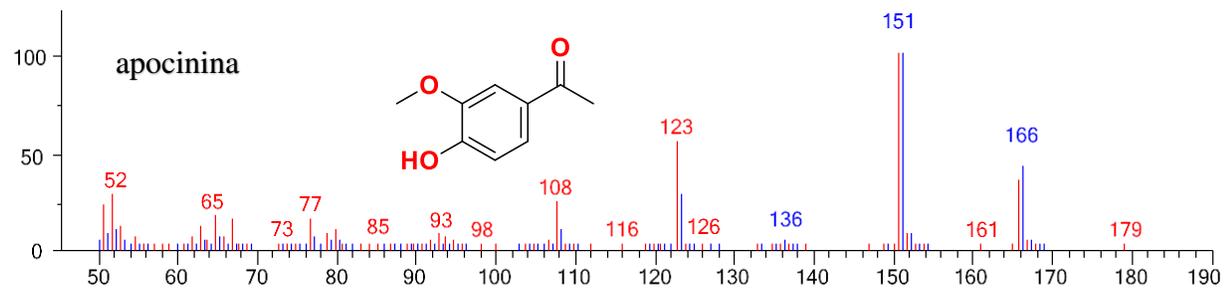
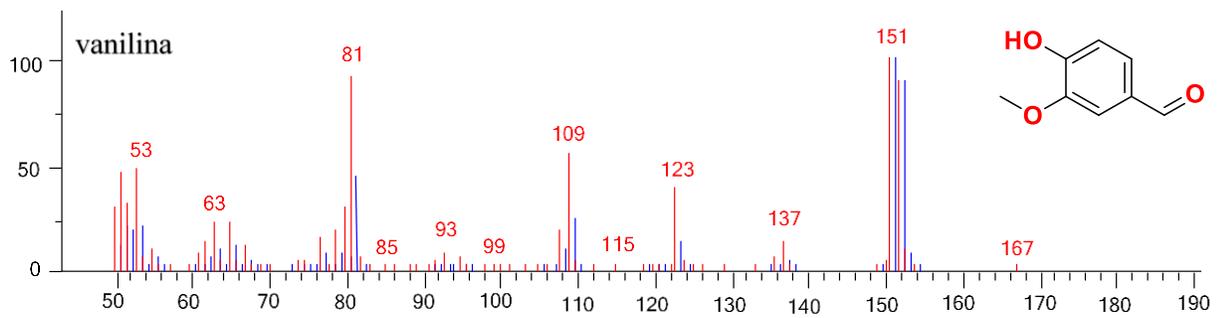
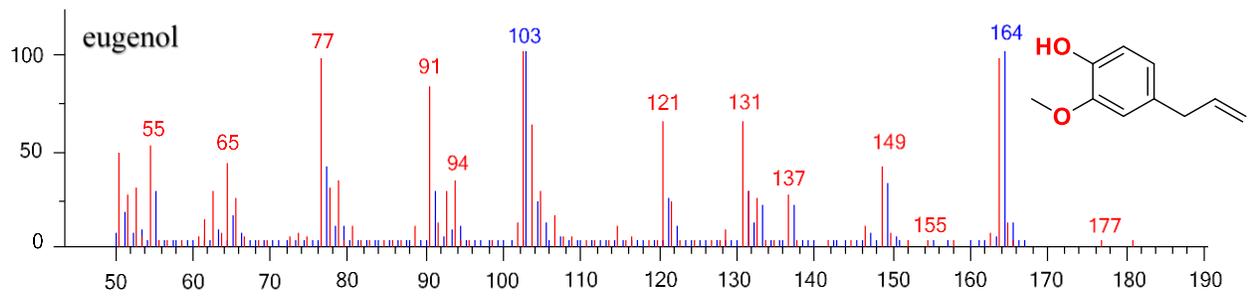


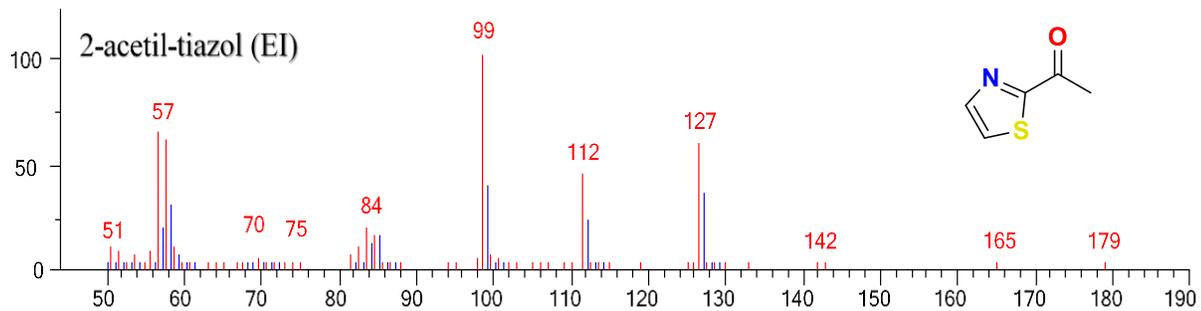
- |                        |                          |                    |
|------------------------|--------------------------|--------------------|
| 1. 2-acetiltiazol (EI) | 5. trans whiskey lactona | 8. vanilina        |
| 2. guayacol            | 6. cis whiskey lactona   | 9. apocinina       |
| 3. 4-metilguayacol     | 7. eugenol               | 10. siringaldehído |
| 4. 4-etilguayacol      |                          |                    |

**Figura 8.** Cromatograma Total de Iones (TIC) obtenido para los estándares de compuestos seleccionados con concentración de 10  $\mu\text{g/ml}$ , utilizando 2-acetiltiazol como estándar interno.

En *Fig. 9*, se muestran los espectros de masas para cada uno de los compuestos, comparando el espectro experimental (rojo) con el de la librería NIST (azul), observándose muy buena concordancia.







**Figura 9.** Comparación entre espectros de masas teóricos y experimentales de compuestos volátiles indicadores de maduración obtenidos por impacto electrónico (IE) en GC-TQMS

Con base en los resultados obtenidos, se seleccionaron tres iones mayoritarios para cada uno de los compuesto de interés, el más abundante de ellos como ion cuantificador (**Q1**) y los otros dos como iones calificadores (**Q2** y **Q3**). Q1 nos permitirá realizar la cuantificación de los analitos, mientras Q2 y Q3 serán utilizados para la confirmación de los analitos cuantificados. El tiempo de retención de los estándares se muestra en la *Tabla 8*, así como los valores  $m/z$  para Q1, Q2, Q3 y la ventana del tiempo para la adquisición de datos en el método SIM para cada uno de los compuestos.

**Tabla 8.** Tiempo de retención, iones seleccionados y ventana del tiempo de análisis de los estándares por metodología SIM en GC-TQMS

Compuesto	Tiempo de retención (min)	Ventana de tiempo (min)	Q1, Q2, Q3 ( <i>m/z</i> )
2-acetiltiazol (EI.)	7.58 ± 0.01	1.0	98.9, 57.0, 127.0
guayacol	8.38 ± 0.02	1.0	109.0, 81.0, 124.0
4-metilguayacol	9.56 ± 0.02	0.50	123.0, 95.0, 138.0
4-etilguayacol	10.46 ± 0.01	0.80	137.0, 152.0, 122.0
trans-whiskey lactona	10.61 ± 0.02	0.80	99.0, 69.3, 87.0
cis whiskey lactona	10.95 ± 0.02	1.0	99.0, 69.3, 87.0
eugenol	11.26 ± 0.02	0.42	103.0, 77.0, 164.0
vanilina	11.70 ± 0.05	0.65	151.0, 81.0, 152.0
apocinina	12.50 ± 0.04	0.80	151.0, 123.0, 166.0
siringaldehído	13.96 ± 0.03	0.70	182.0, 167.0, 96.0

### 4.3.3 Proceso de calibración y evaluación de los parámetros analíticos del procedimiento GC-TQMS en modo SIM.

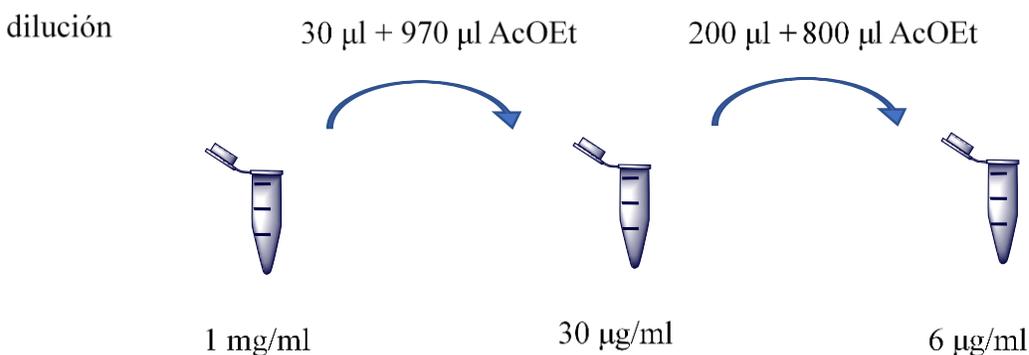
Una vez establecidas las condiciones instrumentales, se llevó a cabo el proceso de calibración. Se prepararon soluciones individuales stock de guayacol, 4-metilguayacol, 4-etilguayacol, eugenol, *Z/E*-whiskey lactona, vanilina, apocinina, siringaldehído y 2-acetil tiazol (EI) con concentración de 10 mg/ml de cada una de ellas, usando isopropanol como disolvente. A partir de las soluciones individuales, se preparó una solución mix tomando 1 ml de cada solución y se llevó a un volumen final de 10 ml, para obtener de esta manera una dilución de 10 veces respecto a la solución patrón de cada compuesto, alcanzando finalmente una solución mix de 1 mg/ml para cada estándar en la solución; posteriormente se hicieron las diluciones correspondientes para obtener las soluciones de trabajo para la calibración.

En el primer paso, se hizo una dilución para obtener el mix principal 30 µg/ml y posteriormente, se hicieron diluciones sucesivas con razón de 5, es decir, a 100 µl de la solución anterior se adiciona 400 µl de acetato de etilo y así sucesivamente para obtener concentraciones iniciales de mix de 6000, 1200, 240, 48, 9.6 y 0 µg/l, a las cuales se les hace una dilución con adición de acetato de etilo y solución de estándar interno para obtener los puntos de calibración con la concentración final deseada para la curva de calibración de 5000, 1000, 200, 40 y 8 µg/l y de 200 µg/l del estándar interno. Véase *Fig. 10 y 11, Tabla 9*.

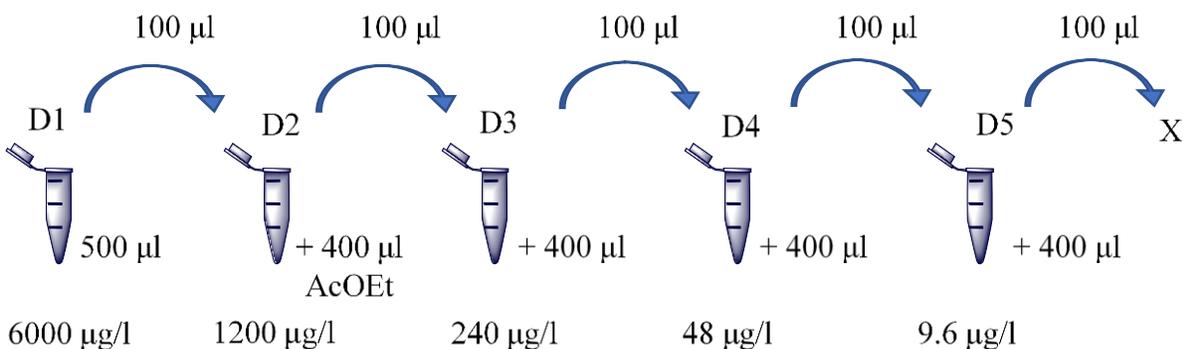
**Tabla 9.** Elaboración de las soluciones de calibración para el procedimiento GC-TQMS

Solución	Conc. inicial (µg/l)		Volumen (µl)				Conc. final (µg/l)	
	Mix*	SI	Mix	IS	AcOEt	Vol. final	Mix	IS
1	9.6	10000	400	9.6	70.4	480	<b>8</b>	<b>200</b>
2	48	10000	400	9.6	70.4	480	<b>40</b>	<b>200</b>
3	240	10000	400	9.6	70.4	480	<b>200</b>	<b>200</b>
4	1200	10000	400	9.6	70.4	480	<b>1000</b>	<b>200</b>
5	6000	10000	400	9.6	70.4	480	<b>5000</b>	<b>200</b>

\*concentraciones obtenidas mediante dilución sucesiva del stock con 30 µg/ml de cada uno de los analitos



**Figura 10.** Preparación de la solución stock de los estándares con concentración 6 µg/ml en AcOEt

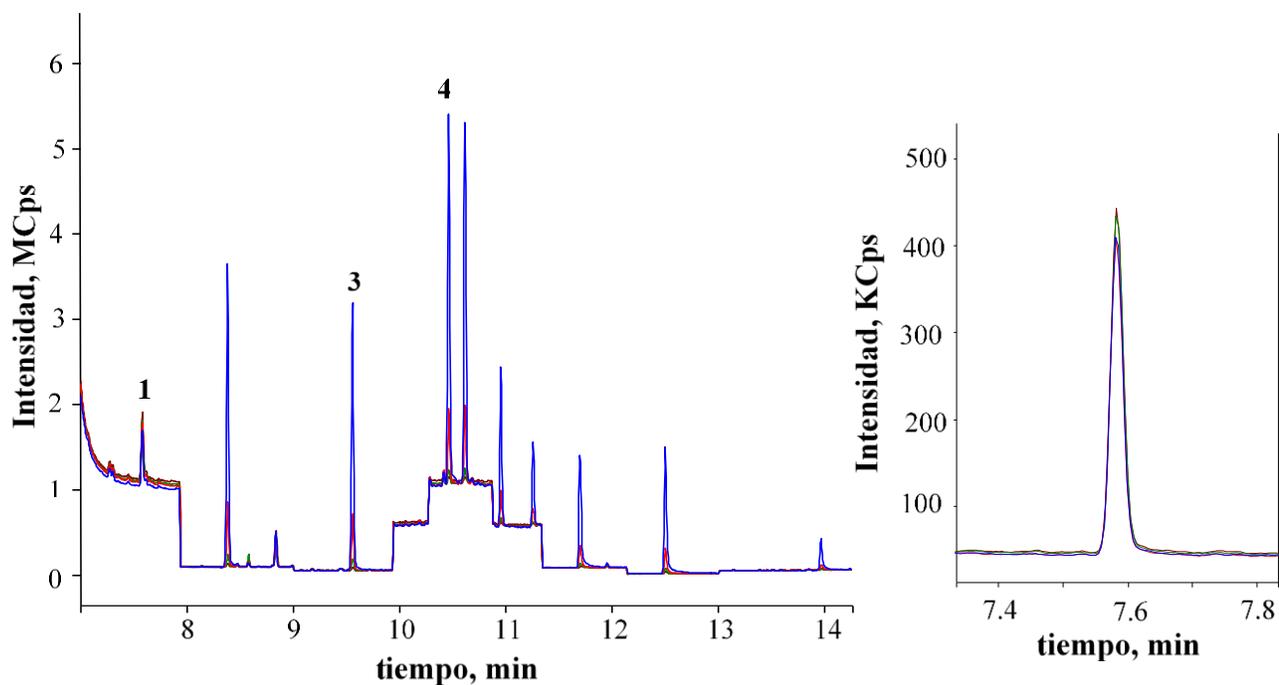


**Figura 11.** Diluciones sucesivas (x5) para obtener concentraciones iniciales del mix de los estándares presentadas en la segunda columna de *Tabla 7*, los que se utilizaron para preparar las soluciones de calibración (en AcOEt).

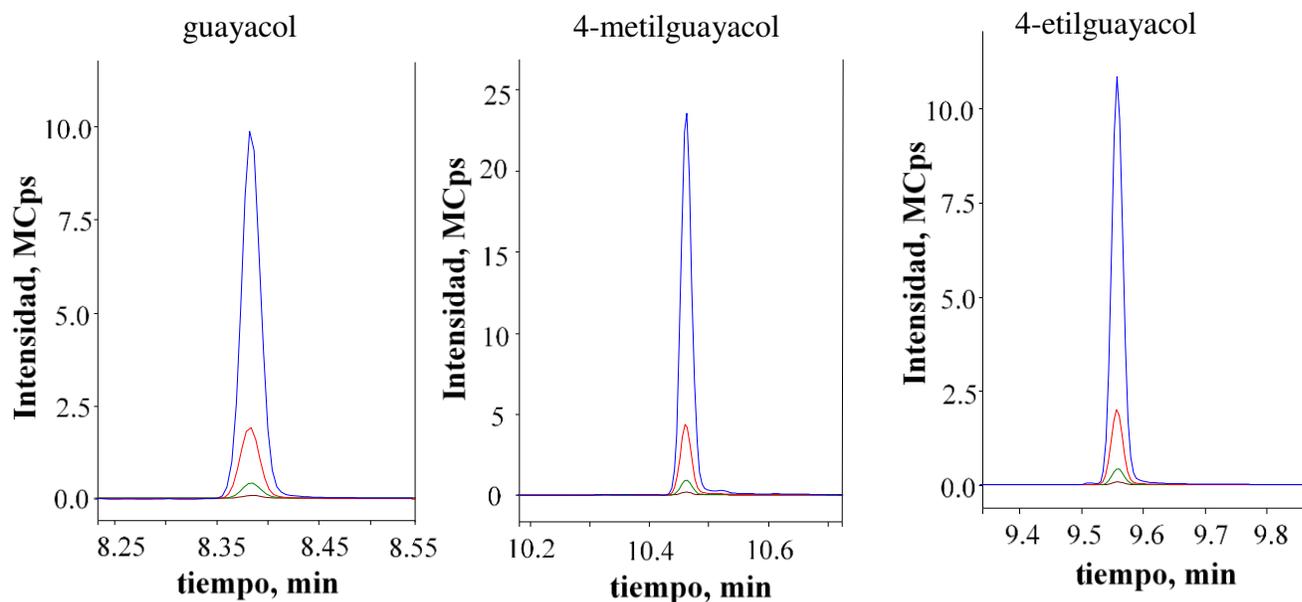
Las soluciones preparadas por tres replicas independientes fueron introducidas al sistema GC-TQMS utilizando las condiciones establecidas. Los datos obtenidos, se analizaron con el software MS Data Review (Plot, Chromatograms and Spectra).

#### 4.3.4 Calibración

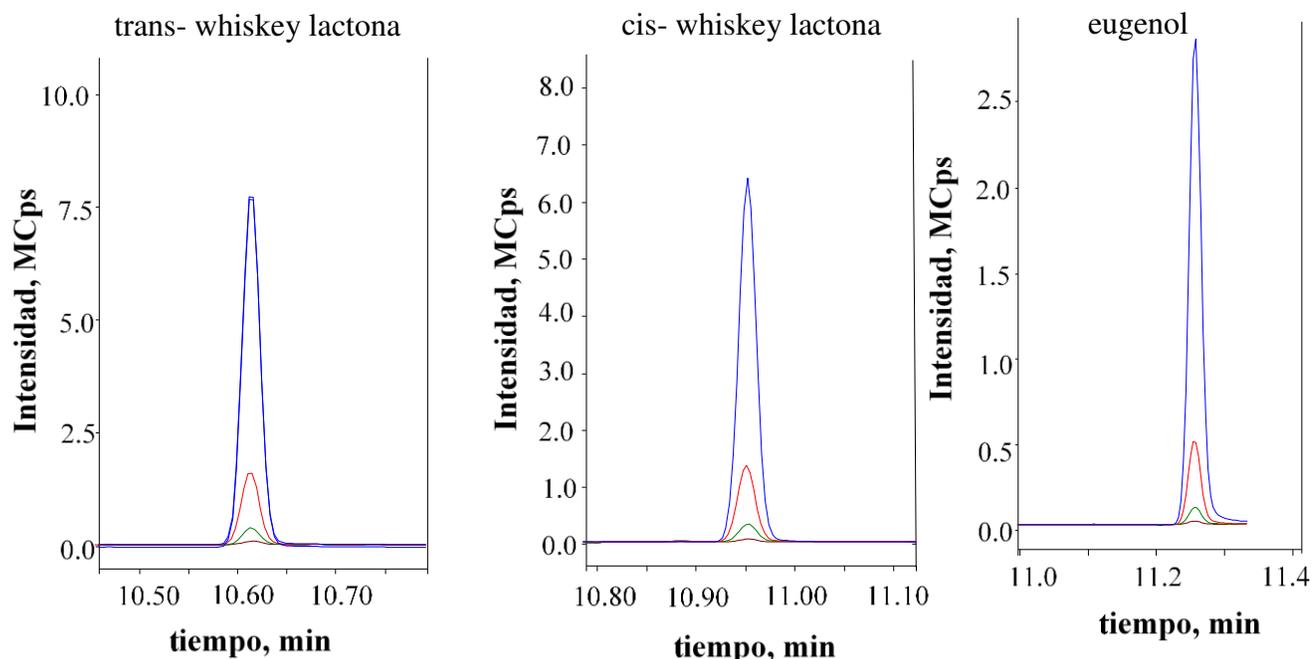
Cabe señalar que, en la construcción de las funciones de calibración para guayacol, 4-metilguayacol y 4-etilguayacol, se tomaron los datos adquiridos para las soluciones 0, 8, 40, 200 y 1000 µg/l, mientras que para whiskey lactona, eugenol, vanilina, apocinina y siringaldehído se utilizaron datos adquiridos para las cinco soluciones con concentración 0, 40, 200, 1000 y 5000 µg/l de cada uno de los compuestos. Los cromatogramas adquiridos en modo SIM para los estándares en sus diferentes concentraciones son presentados en *Fig. 12*, para observar los cambios de intensidad con el aumento de concentración, en *Fig. 13* y *14* se presentan los segmentos de estos mismos cromatogramas, correspondientes a la elución y adquisición de los datos para cada uno de los compuestos. Tomando como la señal analítica el área del pico adquirido para Q1 de cada analito sin y con normalización por el área del EI, se computaron las respectivas funciones de regresión lineal utilizando el software MS Workstation de Bruker para GC-TQMS SCION. Las funciones obtenidas sin tomar en cuenta EI, se presentan en la *Tabla 12*.



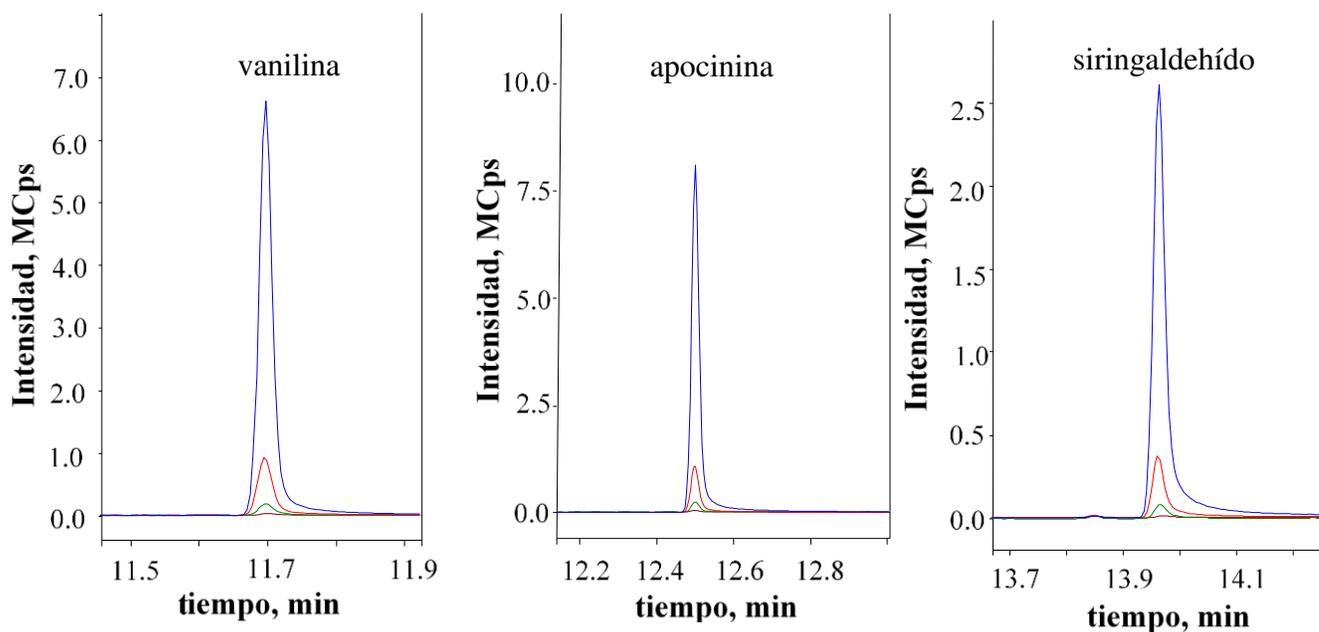
**Figura 12.** Cromatogramas correspondientes a la curva de calibración en modo SIM con concentraciones de 0 ,8, 40, 200 y 1000  $\mu\text{g/l}$  de los 9 analitos y del EI.



**Figura 13.** Ampliación de los segmentos de los cromatogramas presentados en *Fig. 12*, adquiridos en modo SIM para concentraciones de 0 ,8, 40, 200 y 1000  $\mu\text{g/l}$  de 2. guayacol, 3. 4-metilguayacol, 4-etilguayacol



**Figura 14.** Ampliación de los segmentos de los cromatogramas presentados en *Fig. 12*, adquiridos en modo SIM para concentraciones de 0, 8, 40, 200 y 1000 µg/l de 5 cis-whiskey lactona, 6 trans-whiskey lactona y 7. eugenol



**Figura 15.** Ampliación de los segmentos de los cromatogramas presentados en *Fig. 12*, adquiridos en modo SIM para concentraciones de 0, 40, 200, 1000 y 5000 µg/l de 8. vainilina, 9. apocinina y 10. siringaldehído

**Tabla 10.** Ecuaciones de regresión lineal obtenidas con base en tres replicas independientes. Se presentan los valores promedios de las pendientes e intercepto. “Y” es la señal analítica definida como el área de la señal de cada analito; “X” es la concentración en µg/l.

<b>Estándar</b>	<b>Ecuación</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>DER %</b>
guayacol	$y = 2.68 \times 10^3 X + 3.43 \times 10^4$	0.9997	4.5
4-metilguayacol	$y = 2.80 \times 10^3 X + 3.36 \times 10^4$	0.9999	5.6
4-etilguayacol	$y = 6.09 \times 10^3 X + 3.10 \times 10^4$	0.9998	4.0
trans- w. lactona	$y = 2.13 \times 10^3 X + 3.54 \times 10^4$	0.9996	6.4
cis- w. lactona	$y = 1.74 \times 10^3 X + 3.49 \times 10^4$	0.9996	8.7
eugenol	$y = 6.62 \times 10^2 X + 2.39 \times 10^3$	0.9999	1.5
vanilina	$y = 1.59 \times 10^3 X + 1.67 \times 10^4$	0.9999	1.3
apocinina	$y = 1.87 \times 10^3 X + 8.95 \times 10^4$	0.9999	2.6
siringaldehído	$y = 5.40 \times 10^2 X - 3.62 \times 10^3$	0.9998	3.2

El análisis de regresión lineal es una herramienta estadística que nos permite estudiar la relación existente entre una variable dependiente y una o más variables independientes; siendo el coeficiente de determinación o regresión (**R<sup>2</sup>**) una medida estandarizada del grado de linealidad. De acuerdo con los requerimientos de la EPA para el análisis cromatográfico con fines cuantitativos, R<sup>2</sup> debe ser mayor o igual a 0.99; asimismo, la desviación estándar relativa de los factores de respuesta individuales DER para los estándares de una curva de calibración deben ser menores o igual a 20 % [63]. En la *Tabla 11* se presenta las ecuaciones de regresión lineal de las respectivas curvas de calibración para los estándares utilizados, aclarando que estos resultados fueron calculados primeramente sin adición de estándar interno. Para evaluar la linealidad en la calibración se utilizó el factor de respuesta, con base a los factores de calibración (CF) obtenido para cada punto de calibración como el cociente entre la respuesta del detector (señal analítica) y la concentración del analito (CF= S/C), dicho factor representa la pendiente de la línea formada entre el origen de las coordenadas y la señal dada por una solución estándar en particular.

Para evaluar la linealidad de la calibración, se debe de calcular el promedio del factor de calibración CF ( $\overline{CF}$ ), su desviación estándar (SD) y finalmente obtener la desviación estándar relativa (DER), la cual, si se expresa en porcentaje, corresponde al coeficiente de varianza (CV). Bajo los criterios mencionados y con base en resultados de tres replicas independientes de procesos de calibración, se obtuvieron los valores  $R^2$  y DER que se presentan en *Tabla 10*, concluyendo que las funciones de calibración cumplen con los criterios de la EPA para el análisis cromatográfico.

De la misma manera se realizó la evaluación de linealidad para la curva de calibración cuando se hace calibración normalizando cada una de las señales del analito por el área de la señal del estándar interno.

Cuando se usa la adición del estándar interno se realiza la evaluación de la linealidad mediante el factor de respuesta (RF) para cada uno de los estándares de la calibración, se calcula el RF para cada analito respecto al estándar interno como en la siguiente ecuación:

$$RF = \frac{A_e/C_e}{A_{ei}/C_{ei}}$$

$A_e$  = Área del pico del estándar

$A_{ei}$  = Área del pico del estándar interno

$C_e$  = Concentración de estándar

$C_{ei}$  = Concentración de estándar interno

Los resultados obtenidos se presentan en la *Tabla 11* incluyendo los valores  $R^2$  y DER. Comparando los datos incluidos en las *Tablas 10 y 11*, queda claro que el uso de EI mejora la linealidad de las curvas de calibración; por ejemplo, para cis whiskey lactona sin adición del estándar interno  $R^2$  tiene valor de 0.9996 y DER de 8.7% mientras que, normalizando las señales por uso del EI, los valores respectivos fueron  $R^2 = 0.9999$  y DER de 5.0%. Es de notar sin embargo que tanto con cómo sin el EI, se cumple con las indicaciones de la EPA para el análisis cromatográficos.

**Tabla 11.** Ecuaciones de regresión lineal obtenidos con base en tres replicas independientes. Se presentan los valores promedios de las pendientes e intercepto. “Y” es señal analítica del estándar/señal analítica del estándar interno definida con área de pico; “X” es concentración del analito/ concentración del estándar interno; “R<sup>2</sup>” – coeficiente de regresión; “DER” – desviación estándar relativa, calculada con base en los promedios de los factores de calibración individuales %.

Estándar	Ecuación	R <sup>2</sup>	DER %
guayacol	y = 1.06 x + 0.005	0.9999	0.4
4-metilguayacol	y = 1.11 x + 0.001	0.9999	2.3
4-etilguayacol	y = 2.41 x - 0.07	0.9999	5.6
cis-w. lactona	y = 0.844 x + 0.018	0.9999	2.4
trans-w. lactona	y = 0.687 x + 0.026	0.9999	5.0
eugenol	y = 0.262 x - 0.001	0.9999	2.8
vanilina	y = 0.629 x - 0.003	0.9998	6.5
apocinina	y = 0.741 x - 0.023	0.9999	4.9
siringaldehído	y = 0.214 x - 0.017	0.9993	6.5

#### 4.3.5 Límite de detección y de cuantificación

El límite de detección (LD) se define como la mínima cantidad o concentración del analito que puede ser detectada de manera confiable por el procedimiento analítico utilizado, para cromatografía se puede definir el límite de detección como la cantidad inyectada que resulta en una señal analítica al menos tres veces mayor respecto al ruido de la línea base ( $\sigma$ ). El límite de detección puede expresarse como:

$$LD = \frac{3\sigma}{S}$$

Por su parte, el valor S en la ecuación se refiere a la pendiente de la función lineal que relaciona la respuesta del instrumento con la concentración del analito, puede ser evaluado de maneras diferentes; (i) usando todas las concentraciones de los estándares de calibración, (ii) utilizando solamente estándares de baja concentración, (iii) usando un solo punto de calibración en este caso usando el RF para el más bajo punto de calibración del estándar cuya respuesta es cercana al límite de cuantificación.

El límite de cuantificación (LC) de un procedimiento analítico se define como la menor cantidad de analito que puede ser cuantificada con precisión y exactitud que caracterizan el procedimiento empleado. El límite de cuantificación se puede calcular con la siguiente ecuación:

$$LC = \frac{10 \sigma}{S}$$

De igual forma  $\sigma$  es la desviación estándar de la respuesta analítica en ausencia del analito y S es la pendiente, ambos determinados como anteriormente se describió.

Los límites de detección y cuantificación deben ser calculados tanto para las condiciones de calibración como de análisis en las muestras reales. Para evaluar el LD y LC del procedimiento, la calibración debe realizarse en presencia de la matriz de la muestra siguiendo exactamente el mismo pretratamiento empleado que en las muestras reales.

**Tabla 12.** Límites de detección (LD) y de cuantificación (LC) evaluados en el procedimiento de calibración y en el análisis de muestras reales

Analito	Calibración $\mu\text{g/l}$		Blanca $\mu\text{g/l}$	
	LD	LC	LD	LC
guayacol	1.3	4.0	2.1	6.4
4-metilguayacol	4.8	14.6	6.7	20.5
4-etilguayacol	0.8	2.4	6.8	20.4
trans w. lactona	4.2	12.8	3.8	11.5
cis w. lactona	3.6	10.9	2.6	7.7
eugenol	9.0	27.3	10.2	30.7
vanilina	6.1	18.6	8.2	24.6
apocinina	11.2	34.1	11.7	35.0
siringaldehído	11.6	35.2	10.3	30.9

En la *Tabla 12* se observan los límites de detección y cuantificación calculados para todos los analitos estudiados en el trabajo, tanto en condiciones de calibración como en las muestras reales de tequila, es evidente que los valores de los límites de cuantificación varían de un compuesto a otro como se puede distinguir, encontrando que, para el guayacol, 4-metilguayacol, 4-etilguayacol, cis-/ trans- whiskey lactona y vanilina se obtuvieron valores relativamente bajos tanto en la etapa de calibración externa como en presencia de la matriz de la muestra ( $< 20 \mu\text{g/l}$ ) lo cual nos habla de un procedimiento con suficiente poder de detección para ser utilizado en el análisis de muestras reales. En el caso de eugenol, apocinina y siringaldehído los límites fueron un poco peores, del orden de las  $30 \mu\text{g/l}$  respecto a otros compuestos. De manera general, el procedimiento GC-TQMS en el modo SIM propuesto ofrece mucho más alta selectividad y poder de detección al análisis por GC con detector de ionización por flama FID.

#### **4.3.6 Pruebas de exactitud y precisión.**

En la validación de un procedimiento analítico, se evalúa la exactitud y la precisión de los resultados; estos parámetros reflejan los posibles errores sistemáticos y aleatorios, respectivamente. La exactitud se refiere al grado de concordancia entre el resultado experimental y el contenido verdadero del analito en la muestra, mientras que precisión se mide como discrepancia entre valores individuales alrededor del valor promedio, obtenidos en replicas independientes de la misma muestra (desviación estándar, desviación estándar relativa, coeficiente de varianza).

La precisión puede ser calculada de diferentes condiciones. (i.) Repetibilidad, se evalúa con base en repeticiones realizadas en un corto intervalo de tiempo, mismas condiciones de operación y por el mismo analista, equipo y laboratorio. (ii.) Precisión intermedia, se define como la precisión dentro del laboratorio, es decir, análisis realizados diferentes días, con analistas distintos y diferentes equipos. (iii.) Reproducibilidad, expresado como la precisión entre distintos laboratorios, usualmente aplicada para la estandarización de un método.

La evaluación de la exactitud de los resultados en cambio se realiza mediante la comparación entre la media de los resultados obtenidos para una muestra respecto al contenido real en dicha muestra, sin embargo, debido a que el valor verdadero es desconocido, se plantean diferentes estrategias para evaluar la exactitud y minimizar los errores sistemáticos.

Es por lo que resulta muy práctico realizar los experimentos de recuperación, la comparación de los resultados obtenidos mediante el método de adición de estándar y calibración externa.

En este trabajo, se llevaron a cabo los experimentos de recuperación, analizando las muestras sin y con adición de una conocida cantidad de los analitos.

La repetibilidad de los experimentos fue evaluada a partir de dos análisis independientes, realizadas para la misma muestra, de tal manera que se estimó la precisión del análisis mediante el cálculo de la diferencia porcentual relativa (% RPD), este factor fue calculado tanto para los tequilas blancos, reposados, añejos y extra-añejos con el fin de evaluar el procedimiento total (desde la extracción hasta calibración). La forma en la que se realizó el cálculo de esta diferencia fue mediante el proceso de cuantificación de la misma muestra en dos análisis con el mismo procedimiento para la misma muestra.

Ecuación que nos permite calcular el % RPD:

$$\% RPD = \frac{|C_1 - C_2|}{\left(\frac{C_1 + C_2}{2}\right)} \times 100$$

Donde  $C_1$ - concentración promedio obtenida en tres replicas técnicas del primer análisis de la muestra,  $C_2$ - concentración promedio obtenida en tres replicas técnicas del segundo análisis de la misma muestra. En la *Tabla 13* se presentan resultados obtenidos para las muestras de tequila blanco 3 y reposado1, mientras que en la *Tabla 14* se muestran resultados para el tequila añejo1 y extra-añejo 3; cada uno de los análisis se realizó por triplicado, mostrando en las tablas los valores promedio ( $c_1$ ,  $c_2$ ) con respectivas desviaciones estándar.

**Tabla 13.** Prueba de precisión, cálculo de la diferencia porcentual relativa (% RPD) para tequila blanco y tequila reposado

Analito	Tequila blanco			Tequila Reposado		
	C <sub>1</sub> (µg/l)	C <sub>2</sub> (µg/l)	% RPD	C <sub>1</sub> (µg/l)	C <sub>2</sub> (µg/l)	% RPD
guayacol	21.5±0.4	21.8±0.4	<b>1.4</b>	75.6±0.9	80.7±1.0	<b>6.5</b>
4-metilguayacol	7.62±0.12	7.28±0.11	<b>4.6</b>	66.5±4.9	65.8±4.9	<b>1.0</b>
4-etilguayacol	10.1±0.1	10.4±0.1	<b>2.9</b>	15.8±0.2	16.1±0.2	<b>1.9</b>
cis- whiskey lactona	ND	ND	-	197±1	201±1	<b>2.0</b>
trans- whiskey lactona	ND	ND	-	46.8±0.6	45.8±0.5	<b>2.2</b>
eugenol	50.1±1.1	49.7±1.1	<b>0.8</b>	58.9±1.1	60.2±1.2	<b>2.2</b>
vanilina	ND	ND	-	165±2	178±2	<b>7.6</b>
apocinina	ND	ND	-	ND	ND	-
siringaldehído	ND	ND	-	1450±3	1476±3	<b>1.8</b>

**Tabla 14.** Pruebas de precisión, cálculo de la diferencia porcentual relativa (% RPD) para tequila añejo y tequila extra-añejo

Analito	Tequila añejos			Tequila extra añejos		
	C <sub>1</sub> (µg/l)	C <sub>2</sub> (µg/l)	% RPD	C <sub>1</sub> (µg/l)	C <sub>2</sub> (µg/l)	% RPD
guayacol	75.6±0.3	80.7±0.3	<b>6.5</b>	51.6±0.3	48.6±0.3	<b>6.0</b>
4-metilguayacol	66.5±1.8	65.8±1.8	<b>1.0</b>	64.8±1.3	63.3±1.3	<b>2.3</b>
4-etilguayacol	15.8±0.2	16.1±0.2	<b>1.9</b>	14.3±0.2	13.6±0.1	<b>5.0</b>
cis- whiskey lactona	197±1	201±1	<b>2.0</b>	242±3	244±3	<b>0.8</b>
trans- whiskey lactona	46.8±0.8	45.8±0.8	<b>2.2</b>	37.9±0.8	38.8±0.8	<b>2.3</b>
eugenol	58.9±0.3	60.2±0.3	<b>2.2</b>	31.0±0.3	32.9±0.3	<b>5.9</b>
vanilina	165±1	178±1	<b>7.6</b>	475±2	491±2	<b>3.3</b>
apocinina	ND	ND	-	36.6±0.7	35.7±0.6	<b>2.5</b>
siringaldehído	1450±27	1476±28	<b>1.8</b>	18.3±0.2	17.2±0.2	<b>6.2</b>

La diferencia porcentual relativa evaluada para los diferentes tipos de tequila presentó porcentajes bajos, lo cual se traduce en buena repetibilidad del procedimiento propuesto. De manera general, los valores RPD van desde 1 a 7 %; pero se observa una mejor precisión en el análisis de tequilas blancos respecto a los tequilas añejos y extra-añejos, lo cual era de esperarse ya que al añejarse el tequila su composición química se vuelve más compleja lo que contribuye en el aumento de errores aleatorios.

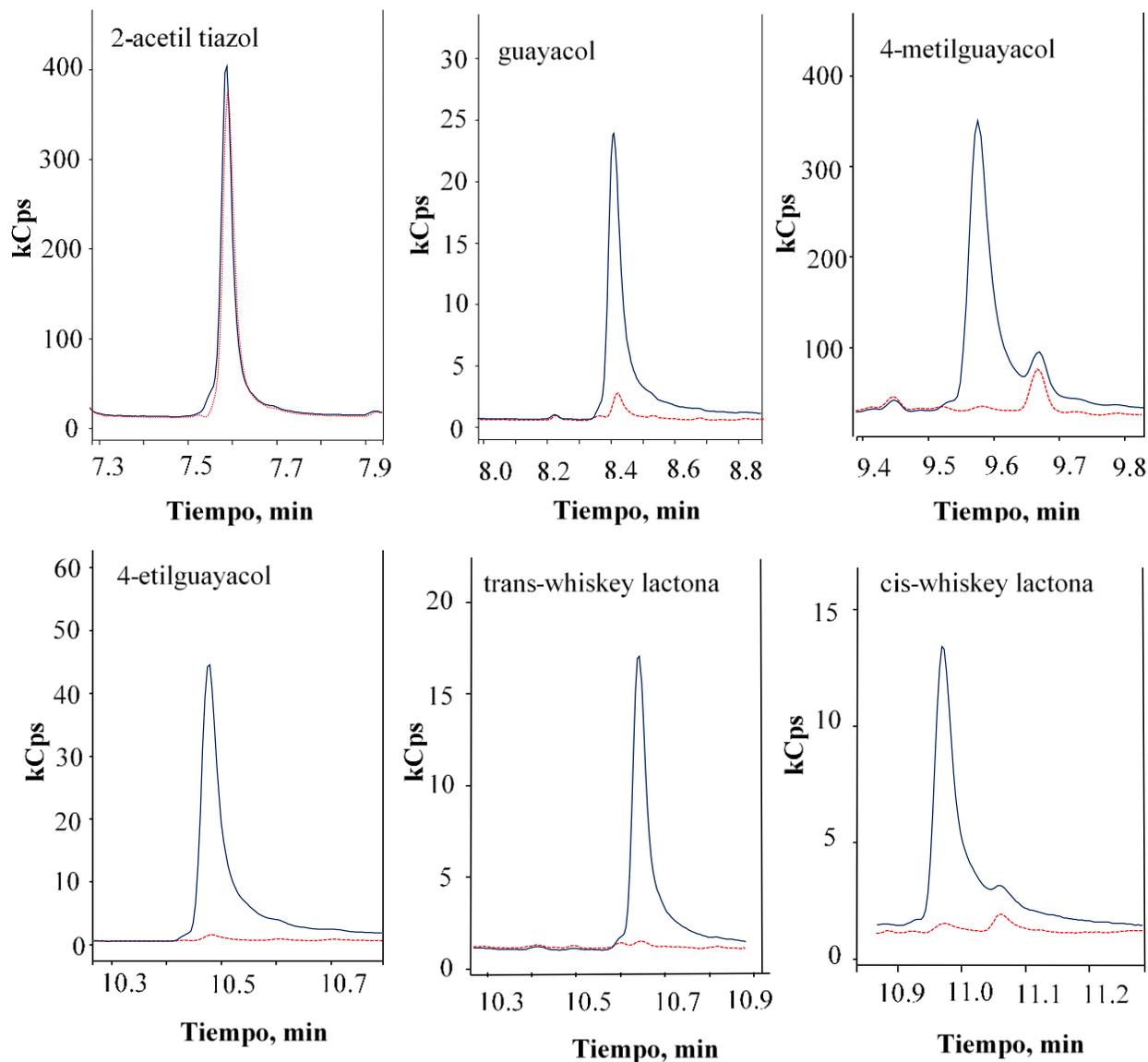
Finalmente se llevaron a cabo las pruebas de exactitud mediante experimentos de recuperación. En particular, a 1 ml de la muestra de tequila se adicionaron 10 µl de una solución mix 10 µg/ml, lo que equivale a la adición de 0.1 µg de cada uno de los compuestos de interés (concentración en tequila 100 µg/l). De la misma manera se hizo la adición de 25 µl y 100 µl, obteniéndose concentraciones de los compuestos individuales adicionados a tequila de 250 µg/l y 1000 µg/l, respectivamente. En otras palabras, se agregaron 0.25 µg y 1.00 µg de cada compuesto directamente a la alícuota de 1 ml de tequila. Los resultados que se obtienen para este análisis son presentados en la *Tabla 15* con los respectivos porcentajes de recuperación para cada muestra.

**Tabla 15.** Resultados de adición de estándar obtenidos en el análisis de tequila blanco, se presentan los valores promedio con sus respectivas desviaciones estándar.

Analito	Sin adición	Adición de		Adición de	
		estándar (100 µg/l)	Recuperación	estándar (1000 µg/l)	Recuperación
guayacol	18.3 ± 1.6	113 ± 4	94.7 %	970 ± 5	95.2 %
4-metilguayacol	51.2 ± 0.6	167 ± 2	115 %	1230 ± 5	118 %
4-etilguayacol	10.4 ± 0.2	107 ± 4	96.6 %	913 ± 4	90.3 %
trans-w. lactona	ND	92.1 ± 3.6	92.1 %	897 ± 9	89.7 %
cis-w. lactona	ND	97.8 ± 3.2	97.8 %	997 ± 2	99.7 %
eugenol	50.1 ± 4.0	185 ± 3	135 %	1553 ± 8	150 %
vanilina	ND	94.2 ± 2.6	94.2 %	1006 ± 10	101 %

Mediante los experimentos de recuperación se demuestra una buena exactitud del procedimiento propuesto. Los valores de porcentajes de recuperación fueron en el intervalo desde 84.9 % y 118 %, cumpliendo con las regulaciones recomendadas por la EPA para el análisis cromatográfico, con la única excepción para el caso del eugenol donde la recuperación fue de 135 % y 150 % respectivamente.

En la Fig. 16 se muestran los cromatogramas con y sin adición de estándar para los indicadores de maduración en tequila blanco (B1).



**Figura 16.** Cromatograma adquirido en modo SIM con y sin adición de estándar para los analitos de muestras en tequila blanco (B1) para guayacol, 4-metilguayacol, 4-etilguayacol, *E/Z* whiskey lactona. Rojo- tequila blanco B1; Azul- tequila blanco B1 con adición de estándar (100 µg/l).

## 4.4 Aplicación del procedimiento desarrollado en el análisis de tequilas.

### 4.4.1 Determinación de compuestos volátiles indicadores de la maduración en tequilas.

Se analizaron 4 diferentes tipos de tequilas como ya se mencionó en *capítulo 3.5* de esta tesis, tequilas blancos, reposados, añejos y extra-añejos. Para todas las muestras incluidas en la realización de este trabajo de tesis se utilizó el proceso de extracción y método de cuantificación por GC-TQMS en modo SIM descritos en la sección 4.3.1 y 4.4.1 respectivamente. En la *Tabla 16* se muestran los resultados obtenidos; se incluye el valor promedio con su respectivo valor de desviación estándar (con base en tres replicas), todos expresados en microgramo de analito por litro de muestra ( $\mu\text{g/l}$ ). Es preciso mencionar que para todas las muestras analizadas siempre se corrió un blanco entre cada serie de muestras y curva de calibración.

**Tabla 16.** Resultados de la determinación de compuestos volátiles en tequilas blancos y reposados, se presentan los valores promedio con sus respectivas DE, obtenidos de tres replicas independientes.

Tequilas	Compuestos volátiles indicadores de añejamiento ( $\mu\text{g/l}$ )								
	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>B1</b>	88.4 $\pm$ 1.6	35.2 $\pm$ 0.5	20.4 $\pm$ 0.2	ND	ND	192 $\pm$ 4	ND	26.6 $\pm$ 0.7	22.7 $\pm$ 0.4
<b>B2</b>	132 $\pm$ 2	51.2 $\pm$ 0.8	31.6 $\pm$ 0.3	ND	ND	318 $\pm$ 6	ND	ND	19.2 $\pm$ 0.3
<b>B3</b>	86.0 $\pm$ 1.5	23.8 $\pm$ 0.4	15.5 $\pm$ 0.2	ND	ND	194 $\pm$ 4	ND	ND	ND
<b>B4</b>	52.6 $\pm$ 0.9	6.62 $\pm$ 0.10	6.10 $\pm$ 0.06	ND	ND	53.6 $\pm$ 1.0	ND	ND	ND
<b>B11</b>	70.1 $\pm$ 1.3	42.4 $\pm$ 0.7	ND	ND	47.5 $\pm$ 0.6	ND	ND	ND	164 $\pm$ 3
<b>R1</b>	392 $\pm$ 7	42.6 $\pm$ 0.6	49.2 $\pm$ 0.5	227 $\pm$ 4	1346 $\pm$ 16	280 $\pm$ 5	892 $\pm$ 23	49.1 $\pm$ 1.3	6818 $\pm$ 120
<b>R2</b>	386 $\pm$ 7	37.2 $\pm$ 0.6	46.4 $\pm$ 0.5	209 $\pm$ 4	1284 $\pm$ 15	258 $\pm$ 4	945 $\pm$ 24	30.5 $\pm$ 0.8	7808 $\pm$ 137
<b>R3</b>	606 $\pm$ 11	51.0 $\pm$ 0.8	64.3 $\pm$ 0.6	311 $\pm$ 6	1854 $\pm$ 22	437 $\pm$ 8	1093 $\pm$ 28	135 $\pm$ 4	9914 $\pm$ 174
<b>R4</b>	126 $\pm$ 2	126 $\pm$ 2	31.7 $\pm$ 0.3	69.2 $\pm$ 1.2	697 $\pm$ 8	139 $\pm$ 3	530 $\pm$ 13	18.5 $\pm$ 0.5	2338 $\pm$ 41
<b>R7</b>	153 $\pm$ 3	40.7 $\pm$ 0.6	9.27 $\pm$	15.5 $\pm$ 0.3	249 $\pm$ 3	172 $\pm$ 3	65.4 $\pm$ 1.7	ND	150 $\pm$ 3
<b>R11</b>	249 $\pm$ 5	75.8 $\pm$	11.3 $\pm$	13.5 $\pm$ 0.3	220 $\pm$ 4	211 $\pm$ 4	33.0 $\pm$ 0.8	10.6 $\pm$ 0.3	1050 $\pm$ 18

**Tabla 17.** Resultados de la determinación de compuestos volátiles en tequilas añejos y extra añejos, se presentan los valores promedio con sus respectivas DE, obtenidos de tres replicas independientes.

Tequilas	Compuestos volátiles indicadores de añejamiento (µg/l)								
	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A1	199±1	44.8±1.2	31.1±0.4	53.6±0.9	573±4	83.7±0.4	1218±5	34.4±0.2	8080±149
A2	180±1	546±15	10.4±0.1	497±9	4323±28	382±2	2169±9	115±1	13415±247
A3	337±2	79.0±2.1	56.2±0.7	90.1±1.5	878±6	156±1	1638±7	51.1±0.3	12024±221
A4	193±1	12.2±0.3	30.1±0.3	725±12	940±6	183±2	4094±18	71.8±0.4	1984±37
A5	406±3	284±8	69.0±0.8	79.2±1.4	791±5	215±1	796±3	93.6±0.6	3590±66
A7	239±1	44.3±1.2	27.7±0.3	21.7±0.4	286±2	146±1	212±1	10.1±0.1	841±15
A11	575±2	65.2±1.7	64.3±0.8	311±5	1853±12	437±3	1093±5	135±1	9914±182
E1	223±1	66.3±1.8	35.4±0.7	191±4	1585±17	136±2	2678±12	142±3	1901±23
E2	122±1	46.9±1.2	ND	230±5	2174±23	137±1	905±4	43.5±0.8	6864±80
E3	354±3	110±3	52.9±1.1	261±4	2145±23	200±2	3208±14	177±3	2479±29
E4	208±2	13.8±0.4	23.7±0.5	827±17	2766±30	382±4	6094±26	190±4	3317±39
E5	402±4	148±4	77.1±1.6	158±3	1324±14	186±2	1605±7	88.5±1.6	7842±92
E7	616±5	128±3	74.6±1.6	168±4	1371±15	196±2	1805±8	73.2±1.3	6675±78

**Nota:** compuestos volátiles analizados (2) guayacol; (3) 4-metilguayacol; (4) 4-etilguayacol; (5) trans-whiskey lactona; (6) cis- whiskey lactona; (7) eugenol; (8) vanilina; (9) apocinina y (10) siringaldehído.

De acuerdo con los resultados obtenidos para las diferentes muestras de tequila, se aprecia los cambios en las concentraciones de los compuestos volátiles seleccionados como indicadores de maduración respecto al tiempo de añejamiento, lo que sugiere que para la mayoría de ellos podría existir una correlación entre la concentración y el tiempo que permanecen en las barricas de madera durante el añejamiento.

De acuerdo con la descripción presentada en la parte de introducción, entre los procesos que influyen en la composición de los compuestos volátiles y semi-volátiles en el tequila durante la maduración se pueden mencionar: extracción y solubilización de componentes de la madera, su interacción con los componentes propios del licor y la microoxigenación recibida durante esta etapa que da como resultado mayores concentraciones de los componentes volátiles indicadores de la maduración en el tequila tal como se observa en los resultados obtenidos.

En el caso de cis- whiskey lactona, este compuesto se encontró en altas concentraciones en tequilas maduros (> 1.0 mg/l) mientras que en los tequilas blancos no fue detectado, en concordancia con los datos de bibliografía donde se presenta a whiskey lactona como un compuesto típico encontrado en la madera de roble tanto francés como americano. Ha sido reportado que dicho compuesto es adquirido durante la maduración del tequila y también de otros tipos de bebidas alcohólicas tales como vinos, whiskey, coñac etc.; su presencia es de suma importancia ya que su concentración equilibrada favorece las propiedades sensoriales confirmando a la bebida un sabor dulce con ligero sabor a coco [10-12].

Con el procedimiento propuesto, en el tequila blanco, prácticamente no se detectó whiskey lactona, vanilina, apocinina y siringaldehído, mientras que estos compuestos presentaron relativamente a altas concentraciones en el tequila añejo, confirmando su posible utilidad como indicadores de la maduración.

Para observar mejor los cambios de concentración de cada uno de los compuestos entre los cuatro tipos de tequila se obtuvieron valores promedio por cada uno de los grupos, los cuales se presentan en la *Tabla 18* junto con las respectivas desviaciones estándar. De esta Tabla queda claro que la selección de los compuestos fue adecuada ya que la concentración de cada uno de ellos aumenta paulatinamente con el aumento del tiempo de maduración.

**Tabla 18.** Resultados obtenidos en el análisis de compuestos volátiles, representados como valores promedios por cada categoría de tequila: blanco, reposado, añejo y extra añejo, con sus respectivas DE

analito	promedio $\pm$ DE, $\mu\text{g/l}$			
	blanco	reposado	añejo	extra-añejo
guayacol	86.0 $\pm$ 1.6	327 $\pm$ 4	259. $\pm$ 1	301 $\pm$ 2
4-metilguayacol	38.2 $\pm$ 0.6	45.9 $\pm$ 3.4	88.3 $\pm$ 2.4	96.4 $\pm$ 2.0
4-etilguayacol	18.4 $\pm$ 0.2	40.6 $\pm$ 0.6	41.3 $\pm$ 0.5	50.4 $\pm$ 0.4
trans-whiskey lactona	ND	166 $\pm$ 2	292 $\pm$ 5	238 $\pm$ 5
cis-whiskey lactona	ND	807 $\pm$ 3	1378 $\pm$ 9	1663 $\pm$ 18
eugenol	180 $\pm$ 4	214 $\pm$ 4	229 $\pm$ 1	197 $\pm$ 2
vanilina	ND	644 $\pm$ 6	1835 $\pm$ 2	2070 $\pm$ 8
apocinina	ND	58.4 $\pm$ 1.5	83.5 $\pm$ 0.5	86.8 $\pm$ 1.6
siringaldehído	ND	5586 $\pm$ 12	3590 $\pm$ 67	4349 $\pm$ 51

Específicamente, cis-whiskey lactona y vanilina presentaron los cambios de concentración más marcados y concentraciones más altas en el tequila añejo. El tercer compuesto de interés es siringaldehído, el cual aparentemente se forma al inicio del proceso de maduración, pero después, su concentración disminuye probablemente debido a procesos de oxidación. Siringaldehído podría proponerse como un indicador distintivo del tequila reposado.

## **4.5 Procedimientos alternativos de análisis en tequilas mediante FIA-ESI-QTOF-MS y cap-LC-ESI-QTOF-MS.**

El procedimiento GC-TQMS desarrollado en la primera parte del trabajo permitió realizar la cuantificación de nueve compuestos volátiles seleccionados en el tequila, de manera rápida y con un bajo costo comparando con otros métodos existentes. Por otro lado, parecía interesante explorar la posibilidad de determinar los mismos compuestos mediante sistema de espectrometría de masas de alta resolución con ionización por electro nebulización (ESI-QTOFMS), sin previa separación cromatográfica, logrando un procedimiento aún más atractivo en términos del desempeño analítico, simplicidad y corto tiempo de adquisición de datos.

### **4.5.1 Análisis de muestras por ESI-QTOF usando FIA para la cuantificación de muestras reales de tequila.**

La introducción directa de la muestra a un espectrómetro de masas de alta resolución, por ejemplo, con el sistema de separación de cuadrupolo y tiempo de vuelo y dispositivo de ionización por electro nebulización (ESI-QTOF-MS), permite la identificación/confirmación y cuantificación de compuestos específicos incluso cuando la muestra es químicamente compleja. Es por ello por lo que la infusión directa es utilizada comúnmente, a pesar de sus limitaciones tales como efectos de memoria, supresión de señales por interferencias de ionización y falta de control de frecuencia de inyecciones sucesivas. La factibilidad de la introducción directa de la muestra por un lado y las limitaciones del típico sistema de difusión directa, han motivado a los investigadores utilizar el concepto de análisis por inyección en flujo (FIA) para introducir la muestra a la fuente de ionización en espectrometría de masas. En FIA, se mantiene el flujo constante de una solución portadora, realizando inyecciones de un pequeño y constante volumen de muestra con una frecuencia controlada. De esta manera, al sistema ESI-QTOF-MS entran segmentos de muestra, produciendo diagramas que pueden ser extraídos para cada uno de los valores  $m/z$  de interés. En un diagrama, se obtiene una serie de picos agudos y de anchura pequeña que representan abundancia del ion en sucesivas soluciones inyectadas al flujo del portador; en estas gráficas el eje X corresponde al tiempo y en eje Y corresponde a la intensidad de la señal (cuentas por segundo). En esta parte de trabajo, se propone llevar a cabo la determinación de los compuestos seleccionados

anteriormente como indicadores de la maduración usando FIA como introducción de muestra al sistema ESI-QTOF-MS.

#### **4.5.1.1 Reactivos y muestras.**

Todos los reactivos utilizados fueron grado analítico ya descritos en sección “3.1 Reactivos y disolventes”; se utilizó acetonitrilo e isopropanol grado HPLC y agua desionizada (18.2 MΩ cm, Labconco Water PRO-PS.). Se preparó un mix de estándares que contenía guayacol, 4-metilguayacol, 4-etilguayacol, *Z/E* whiskey lactona, eugenol, vanilina, apocinina y siringaldehído a 1000 µg/l de cada uno de ellos en 40% v/v etanol. A partir de esta solución, se prepararon las soluciones de calibración. Se utilizó también formiato de sodio para la calibración del equipo y ácido fórmico para acidificar la solución portadora. Se analizaron las mismas muestras que en la parte anterior (GC-TQMS), comparado los resultados obtenidos mediante los dos procedimientos.

#### **4.5.1.2 Pretratamiento de muestra y procedimiento por FIA-ESI-QTOF-MS**

En primer lugar, es necesario resaltar que no se hizo ningún tratamiento previo del tequila, antes de su introducción al sistema FIA, sin embargo, las soluciones de calibración fueron preparadas en 40 % de etanol, para simular la composición de las muestras.

Como se muestra en la *Fig. 17*, el montaje del sistema FIA consistió en una válvula de inyección Rheodyne con loop de inyección de 20 µl, conectada a una bomba del cromatógrafo de líquidos (Ultimate 3000 RLSC system, Thermo Scientific Dionex) de un lado y a la fuente ESI por otro lado, mediante tubos PEEK (9 cm, 1/16'', 0.005'' di., Agilent Life Science Part N° 5042-6461). El espectrómetro de masas fue maXis impact ESI-QTOF-MS (Bruker Daltonics). La solución portadora fue compuesta por ácido fórmico 0.1 % y acetonitrilo (25: 75 v/v), se mantuvo el flujo de 200 µl/min y las muestras se introdujeron en intervalos de 0.6 min. ESI fue operado en modo positivo con voltaje en el capilar de electro nebulización de 4500 V, voltaje de desplazamiento en la placa de 550 V, el gas de secado fue N<sub>2</sub> con flujo 4 l/min y temperatura de secado 180 °C, con una presión en el gas nebulizador de 0.4 bar. Los datos fueron adquiridos con frecuencia de 0.5 Hz cubriendo el intervalo de *m/z* 50- 400 (véase *Tabla 19*). Estas condiciones fueron establecidas como las mejores para la adecuada integración de los picos (con base en aprox. 15 puntos).

Los parámetros que tuvieron ser considerados fueron: (i) composición de la solución portadora, (ii) velocidad de flujo, (iii) tamaño del loop y (iv) frecuencia de muestreo.

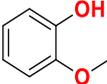
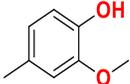
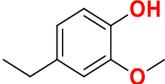
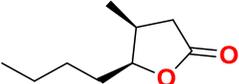
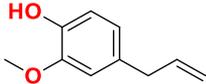
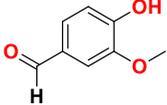
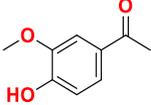
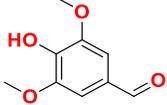
En cuanto a la solución portadora, se realizaron pruebas con diferentes solventes y sus mezclas, seleccionando finalmente 0.1% ácido fórmico con acetonitrilo (25:75), ya que, con esta composición, se aseguraba la solubilidad de los solutos, adecuadas condiciones de ionización en ESI (+) y eficiente lavado del sistema entre inyecciones sucesivas con un corto tiempo de regreso a la línea base después de cada segmento de muestra. El tamaño del loop y la velocidad del flujo fueron establecidos con base en experimentos sistemáticos, bajo el criterio de lograr una buena sensibilidad y adecuada integración de los picos en fiagramas para cada uno de los analitos.

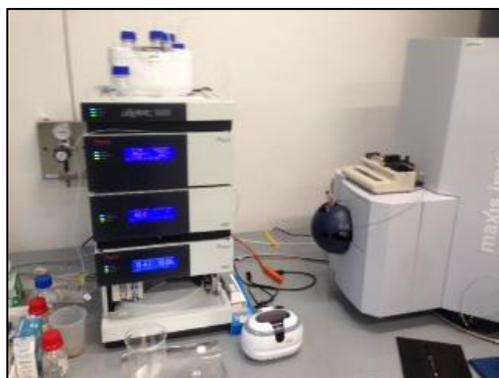
**Tabla 19.** Condiciones instrumentales establecidos para el análisis de indicadores de añejamiento por FIA-ESI-QTOF-MS

Parámetro	Valor del parámetro
Solución portadora	75 % ACN: 25 % Agua Ac. F. 0.1 %
Velocidad de flujo	200 $\mu$ l/min
Loop de inyección	20 $\mu$ l
Fuente de ionización	ESI (+)
Voltaje “offset”	550 V
Voltaje en capilar de electro-nebulización	4500 V
Presión de gas nebulizador	0.6 bar
Gas de secado N <sub>2</sub>	4 ml/min
Temperatura de secado	180 °C
Modo de escaneo	MS
Intervalo de $m/z$	50-400
Frecuencia de adquisición	0.5 Hz

Los fiagramas fueron obtenidos extrayendo el ion de molécula protonada  $[M+H]^+$  para cada compuesto seleccionado con la anchura de la ventana de  $m/z \pm 0.005$ , tal como se muestra en la *Tabla 20* con sus respectivas estructuras químicas.

**Tabla 20.** Iones monitoreados de compuestos seleccionados como indicadores de añejamiento por FIA-ESI-QTOF-MS.

Compuesto	Estructura Química	[M+H] <sup>+</sup>
guayacol		125.0597
4-metilguayacol		139.0507
4-etilguayacol		153.0910
Z/E whiskey lactona		157.1229
eugenol		165.0910
vanilina		153.0546
apocinina		167.07003
siringaldehído		183.0657



**Figura 17.** Ilustración del sistema FIA-ESI-QTOF-MS montado en el laboratorio, con válvula de inyección Rheodyne y flujo del portador controlado por la bomba de carga de sistema HPLC.

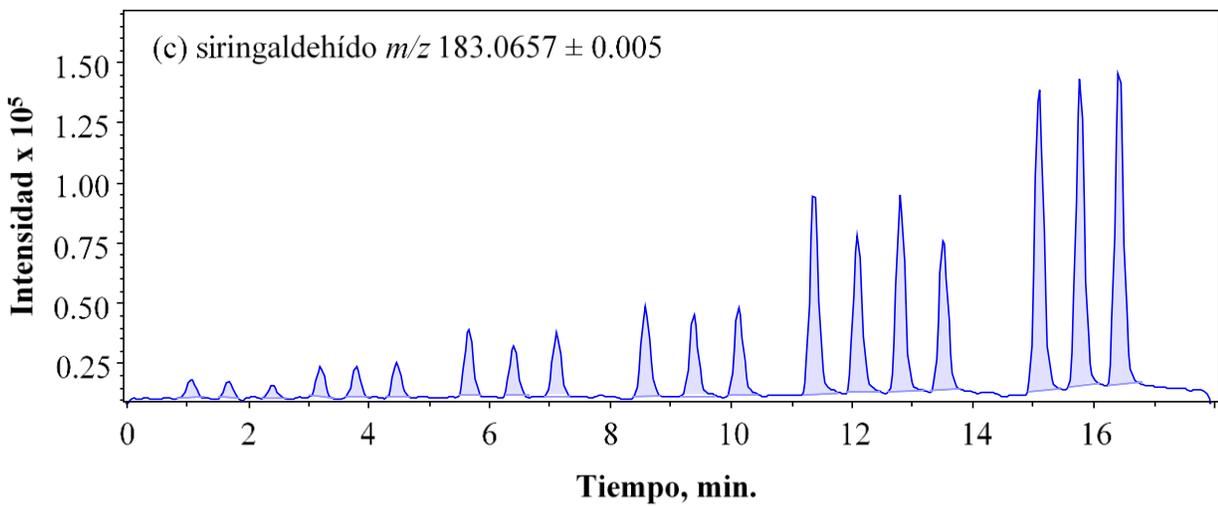
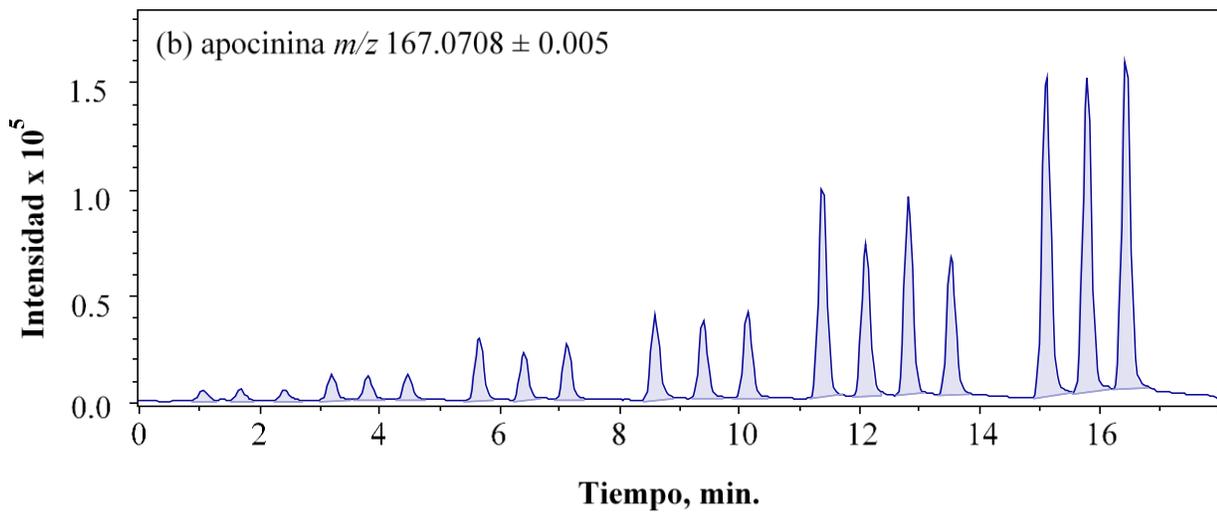
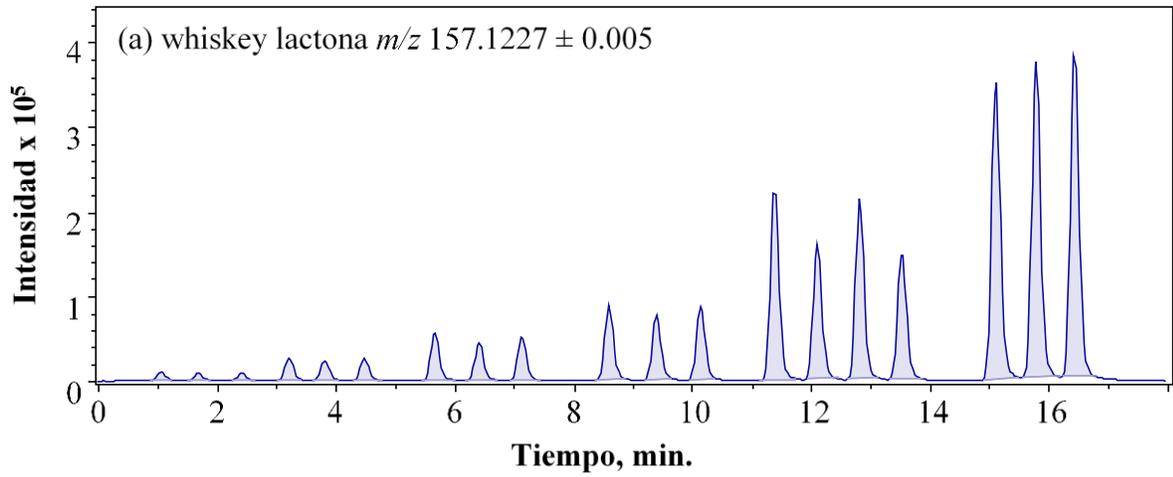
Es preciso aclarar que también se realizó el análisis en modo negativo, ya que al ser los analitos en su gran mayoría compuestos fenólicos se esperaba tener una buena ionización en este modo; sin embargo, cuando el mix de estándares se introdujo a la fuente de ionización operando en modo negativo, la abundancia de los iones fue baja y no todos los compuestos fueron detectados. Finalmente, se consideró que la presencia de formiato de sodio (como calibrador de masas) podría favorecer la formación de un único ion mayoritario para cada compuesto correspondiente a  $[M+Na]^+$  por lo que se ajustó la concentración final a 1 mM de este compuesto en las soluciones de calibración. De manera inesperada, con este ajuste se observó la supresión de las señales monitoreadas, por lo que se decidió llevar a cabo el análisis solamente en presencia de etanol al 40 % v/v y sin ningún aditivo.

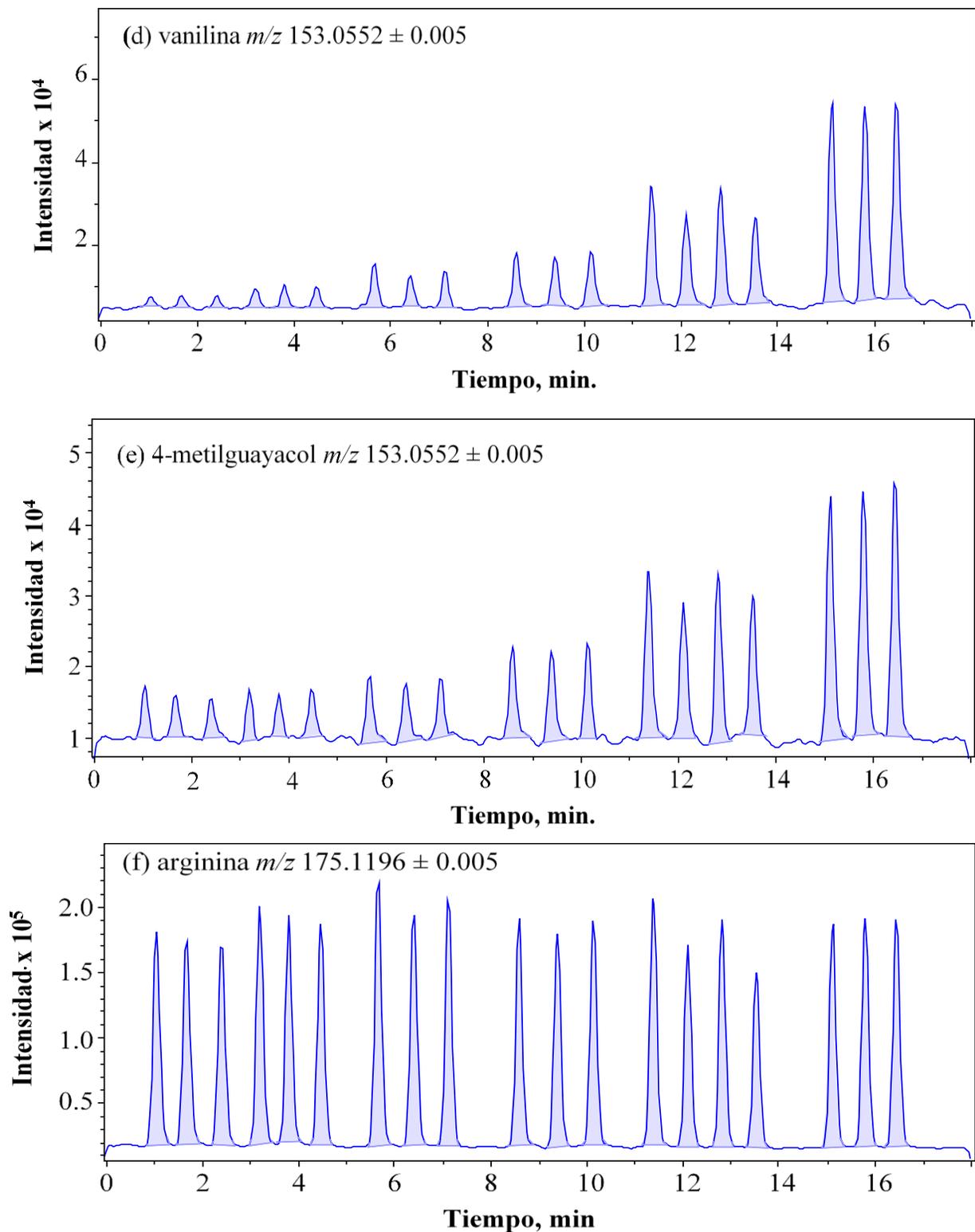
#### 4.5.1.3 Proceso de calibración y evaluación de los parámetros analíticos de la metodología FIA-ESI-QTOF-MS.

Una vez establecidas las condiciones FIA y las condiciones instrumentales ESI-QTOF-MS, se llevó a cabo el proceso de calibración. Primeramente, a partir de la solución stock, se preparó una solución mixta de trabajo con concentración 20 µg/ml de cada uno de los analitos y ajustado de la misma manera a 40 % de etanol, a partir de esta solución se realizaron diluciones consecutivas para obtener los puntos de calibración con concentraciones finales para la curva de calibración de 2000, 1000, 500, 250, 100, 40 y 0 µg/l; se utilizó a la arginina como estándar interno de tal manera que su concentración fuese de 500 µg/l en cada punto de calibración. Un blanco siempre fue corrido en paralelo con el análisis de tres replicas en cada inyección. La arginina fue seleccionada como estándar interno debido a que 2- acetil tiazol usado en procedimiento por GC-TQMS, no fue detectado en las condiciones seleccionadas de ESI positivo, y con la característica de que la arginina es un aminoácido que no está presente en el tequila.

Los fiagramas típicos obtenidos para la inyección por triplicado de los seis puntos de calibración es presentado en la *Fig. 18*, tal como ya se mencionó antes, las fiagramas fueron obtenidos extrayendo de espectros de masas los iones aductos  $[M+H]^+$  de los indicadores de añejamiento como se muestra en la *Tabla 20*.

De los 9 compuestos volátiles que fueron determinados por GC-TQMS, con el procedimiento FIA-ESI-QTOF-MS solo se logró la cuantificación de los seis siguientes compuestos: 4-metilguayacol, suma de dos isómeros de whiskey lactona (debido al mismo valor de  $m/z$  de sus iones), apocinina, vanilina y siringaldehído. Esta diferencia no debe ser preocupante ya que los seis compuestos fueron más importantes indicadores de la maduración del tequila de acuerdo con los resultados del GC-TQMS, mientras que, para guayacol, 4-etilguayacol y eugenol, los cambios de concentración entre los diferentes tipos de tequila no fueron muy marcados (*Tabla 18*). En los fiagramas presentados en la *Fig. 18*, se observa el aumento de las señales conforme aumenta la concentración del analito en la solución, observándose sin embargo pequeñas fluctuaciones en la respuesta instrumental para las inyecciones sucesivas del estándar interno. Estos cambios indican fluctuaciones en la eficacia de ionización y por ello, la importancia de utilizar el estándar interno en la realización de análisis por FIA-ESI-QTOF-MS.





**Figura 18.** Diagramas obtenidos para la curva de calibración de los seis compuestos con concentraciones 40, 100, 250, 500, 1000 y 2000  $\mu\text{g/l}$  (estándar interno 500  $\mu\text{g/l}$ ). \* Cada punto fue inyectado por triplicado.

La calibración para cada uno de los compuestos fue realizada con base a tres réplicas de cada punto de la curva. En la *Tabla 21* y *Tabla 22* se presentan las funciones de regresión lineal obtenidas tanto con base en el área como a la altura de la señal normalizados por su respectivo valor de la señal del EI. Para cada uno de los analitos se evaluaron los principales parámetros analíticos: pendiente (S),  $R^2$  y desviación estándar (DER).

**Tabla 21.** Ecuaciones de regresión lineal obtenidas con base en tres réplicas de cada punto. Se presentan los valores promedios de las pendientes e intercepto. “Y” es señal analítica del estándar normalizada por la señal analítica del estándar interno (ambas adquiridas como área de pico); “X” es la concentración del analito/ concentración del estándar interno; “ $R^2$ ” – coeficiente de regresión; “DER” – desviación estándar relativa, calculada con base en los promedios de los factores de calibración individuales %.

Estándar	Ecuación	$R^2$	DER %
4-metilguayacol	$y = 0.0452 X + 0.0399$	0.9960	2.3
whiskey lactona	$y = 0.0545 X + 0.0208$	0.9987	0.5
vanilina	$y = 0.067 X + 0.021$	0.9998	3.3
apocinina	$y = 0.222 X + 0.030$	0.9982	2.9
siringaldehído	$y = 0.189 X + 0.0399$	0.9979	2.7

**Tabla 22.** Ecuaciones de regresión lineal obtenidas con base en tres réplicas de cada punto. Se presentan valores promedios de las pendientes e intercepto. “Y” es señal analítica de estándar normalizada por la señal analítica de estándar interno (ambas adquirida como altura de pico); “X” es la concentración del analito/ concentración de estándar interno; “ $R^2$ ” – coeficiente de regresión; “DER” – desviación estándar relativa, calculada con base en los promedios de los factores de calibración individuales %.

Estándar	Ecuación	$R^2$	DER %
whiskey lactona	$y = 0.0498 X + 0.0675$	0.9985	0.5
vanilina	$y = 0.0622 X + 0.0312$	0.9983	3.3
apocinina	$y = 0.205 X + 0.0517$	0.9990	2.9
siringaldehído	$y = 0.189 X + 0.0399$	0.9969	2.7

\* 4-metilguayacol solo fue posible cuantificar a base de área del pico

Una vez obtenidos los parámetros analíticos, se procedió a calcular los límites de detección y cuantificación con el objetivo de poder realizar una comparación entre los dos sistemas(FIA-ESI-QTOF-MS y GC-TQMS). En la *Tabla 23* se presentan los valores LD y LC calculados para los compuestos que pudieron ser determinados por FIA, en condiciones de calibración como en las muestras reales de tequila, es evidente que los valores de los límites de cuantificación varían de un compuesto a otro como se puede distinguir, encontrando que, para la mayoría de los analitos los valores obtenidos son relativamente igual en magnitud que los obtenidos por GC-MS.

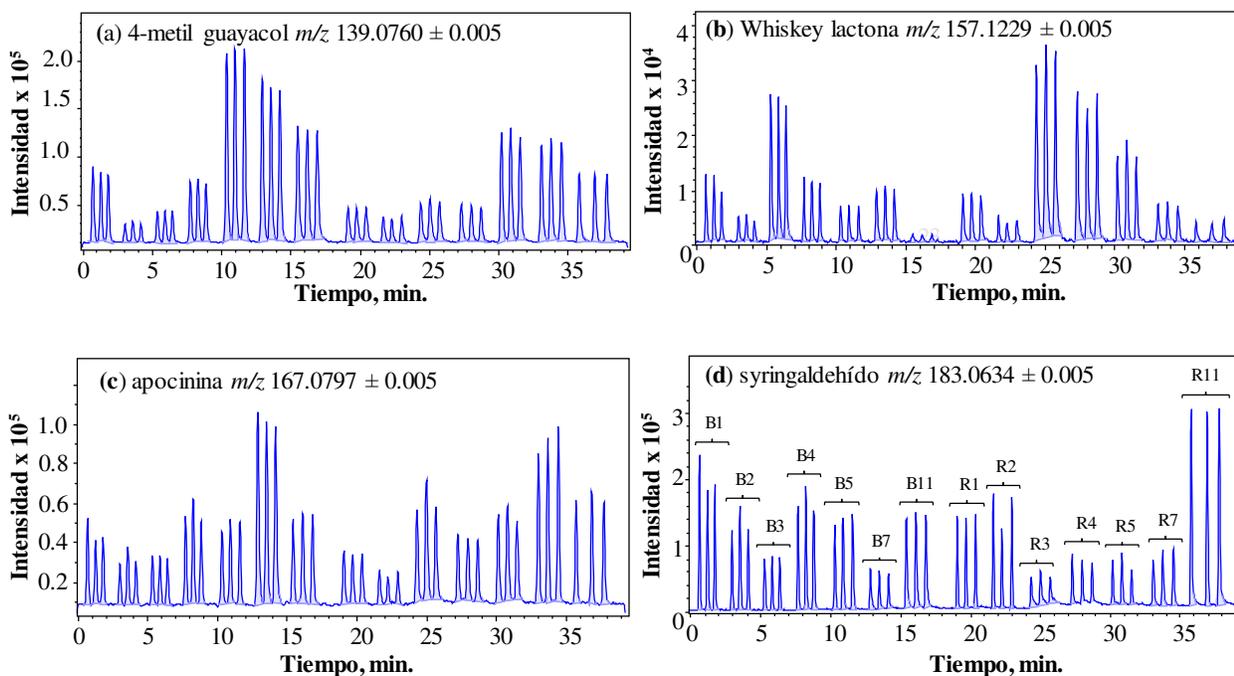
**Tabla 23.** Límites de detección (LD) y de cuantificación (LC) evaluados en el procedimiento de calibración y en el análisis de muestras reales.

<b>Analito</b>	<b>Calibración (µg/l)</b>	
	<b>LD</b>	<b>LC</b>
whiskey lactona	4.2	12.8
4-metilguayacol	4.8	14.6
vanilina	6.1	18.6
apocinina	11.2	34.1
siringaldehído	11.6	35.2

## 4.5.2 Aplicación del procedimiento desarrollado en el análisis de tequilas.

### 4.5.2.1 Determinación de compuestos volátiles indicadores de maduración en tequilas por FIA-ESI-QTOF-MS.

En la *Fig. 19* se presentan los fiagramas obtenidos para algunas de las muestras de tequila, las cuales fueron inyectadas por triplicado, nótese que solamente se presentan resultados para los tequilas blancos y reposados. En la *Tabla 24* se muestran las concentraciones encontradas usando para el cálculo el área de los picos; se incluye el valor promedio con su respectivo valor de desviación estándar (con base en tres replicas), todos expresados en microgramo de analito por litro de muestra ( $\mu\text{g/l}$ ). Es preciso mencionar que para todas las muestras analizadas siempre se corrió un blanco entre cada serie de muestras y la curva de calibración.

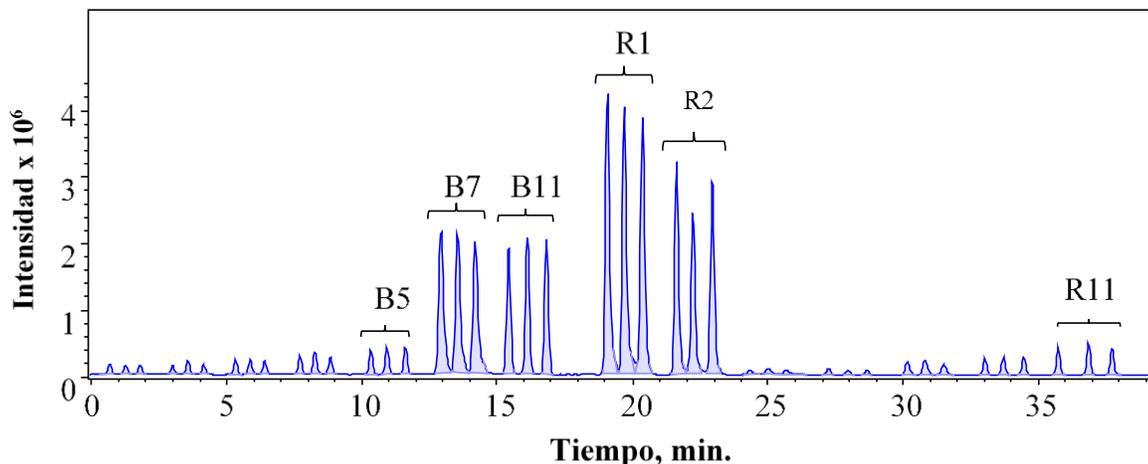


**Figura 19.** Fiagramas típicos obtenido en el análisis muestras de tequila: 7 blancos y 7 reposados, obtenidos bajo las mismas condiciones de operación y con iguales parámetros de corrección (a) 4-metilguayacol, (b) whiskey lactona, (c) apocinina y (d) syringaldehído.

**Tabla 24.** Resultados de la determinación de compuestos volátiles en tequila blanco y reposado por FIA-ESI-QTOF-MS, se presentan los valores promedio con sus respectivas DE, obtenidos de tres replicas independientes.

analitos	tequila blanco (µg/l)							
	1	2	3	4	5	7	11	
whiskey lactona	128 ± 3	200 ± 4	235 ± 6	160 ± 4	182 ± 5	248 ± 6	909 ± 18	
vanilina	1220 ±21	3125 ±61	2862 ±51	1843 ±24	2942 ±28	5357 ±37	8025 ±85	
apocinina	442 ± 9	457 ± 8	411 ± 7	634 ± 9	806 ±8	2131 ±24	2804 ±29	
siringaldehído	2313 ±23	2576 ±24	2161 ±19	2958 ±40	4001 ±32	2314 ±18	2818 ±21	
	tequila reposado (µg/l)							
	1	2	3	4	5	7	11	
whiskey lactona	220 ± 4	957 ±14	316 ±7	336 ±6	332 ±6	314 ±5	1096 ±19	
vanilina	1261 ±25	2593 ±38	1924 ±42	1877 ±33	2692 ±29	3518 ±38	6934±112	
apocinina	510 ± 10	1112 ±17	1150 ±25	833 ±28	796 ±22	1659 ±41	8886±128	
siringaldehído	30 ± 1	58 ± 2	98 ± 2	46 ± 2	94 ± 3	551 ±12	1724 ±37	

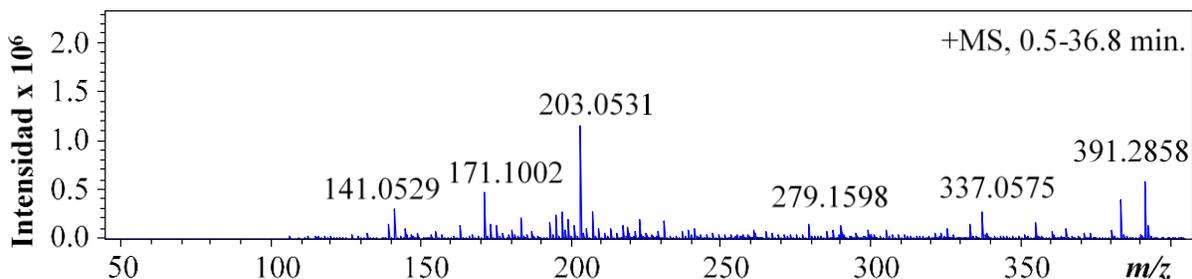
Comparando los resultados presentados en la *Tabla 24* y *Tabla 16*, los resultados obtenidos por los dos procedimientos no son consistentes, indicando interferencias provocadas por la composición del tequila. Efectivamente, en los cromatogramas registrados en el modo “basepeak-pico base”, en la señal más intensa correspondiente a un tiempo dado se observan señales de intensidad muy alta que no corresponden a ninguno de los analitos de la *Fig. 20*, confirmando el problema de interferencias en el análisis de muestras reales (que no se presentaron en las soluciones de calibración). De los picos de mayor intensidad que se obtuvieron en fiagrama de pico base se extrajeron los espectros de masas para identificar al ion causante de las interferencias y decidir cómo lograr su eliminación de las muestras mejorando la exactitud de los resultados.



**Figura 20.** Cromatograma adquirido en modo “basepeak” para los tequilas blanco (B) y reposado (R), se indican los tequilas B5, B7, B11, R1 y R2 como las muestras con mayores intensidades y probables interferentes.

#### 4.5.2.2 Glucosa y fructuosa como interferentes en la determinación de compuestos volátiles en tequila por FIA-ESI-QTOF-MS

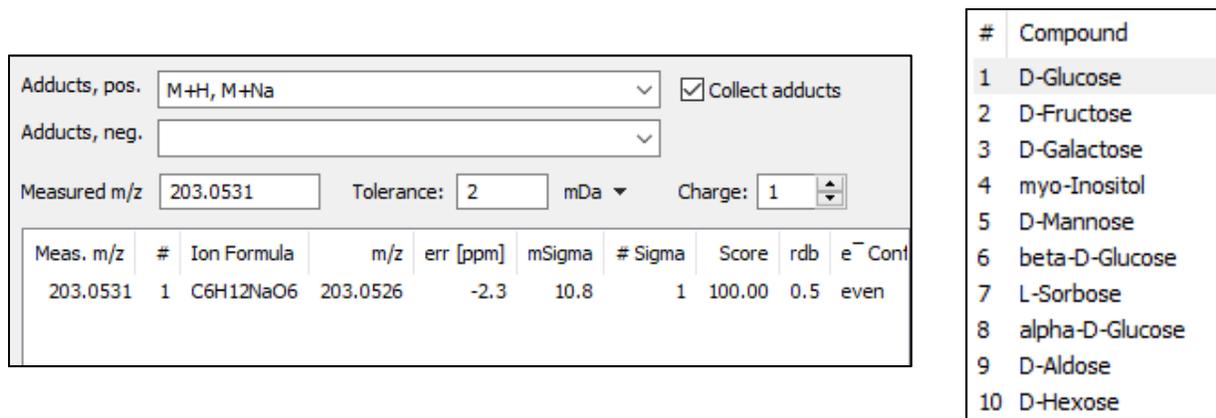
En la *Fig. 21*, se presenta el espectro de masas adquirido para un tequila añejo, donde se observa que el ion más abundante corresponde a  $m/z$  203.0531.



**Figura 21.** Espectro típico de masas MS de las muestras de tequila, se observa el ion  $m/z$  203.0531 como el ion más abundante, seguidos de 171.1002 y 141.0529.

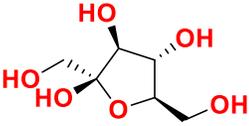
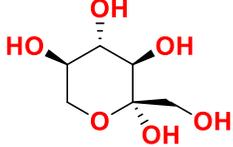
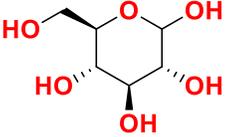
Se procedió a la identificación del compuesto abundante, obteniendo el espectro de masas/masas (MS/MS) del ion 203.0531 y realizando una búsqueda en bibliotecas de bases de datos. En primer lugar, con base en la masa exacta experimental y con ayuda de la herramienta SmartFormula del software Compass DataAnalysis, se predijo la fórmula química condensada  $C_6H_{12}O_6Na$  con la puntuación 100 (tan alto “score” es indicativo de que la fórmula propuesta corresponde a la del compuesto analizado).

Posteriormente, a través del complemento CompoundCrawler se obtuvieron las más probables estructuras de los compuestos que presentan la misma fórmula química condensada, los resultados se presentan en la *Fig. 22* mostrando la presencia de un monosacárido. Finalmente, la anotación del espectro MS/MS obtenido del ion 203.0539 mediante la herramienta MetFrag afirmó que el compuesto podría ser una pentosa o una hexosa (*Tabla 25*). La búsqueda en MetFrag fue realizada con parámetros para  $[M + Na]^+$  del ion  $m/z$  203.0539, usando base de datos KEGG con masa neutra 180.0639, intervalo de desviación 5 ppm,  $Mzppm$  10 y  $Mzabs$  0.001. De esta manera, era posible adjudicar las interferencias observadas en el análisis por FIA-ESI-QTOF-MS a la presencia de azúcares simples ( $C_6H_{12}O_6$ ). Parece probable que algunos fabricantes de tequila adicionan monosacáridos a sus tequilas para mejorar las propiedades sensoriales. Esta práctica no es permitida en la producción del tequila y debe ser clasificada como una adulteración del proceso, además de que es un impedimento para la cuantificación confiable de los compuestos de interés mediante introducción directa del tequila al sistema ESI-QTOF-MS.



**Figura 22.** Resultados obtenidos de SmartFormula y búsqueda de compuestos en CompoundCrawler que explican el ion  $m/z$  203.0539 como posible monosacárido.

**Tabla 25.** Resultados obtenidos en MetFrag de las posibles estructuras moleculares a las cuales corresponde el ion  $m/z$  203.0531 (formula química  $C_6H_{12}O_6$ ).

#	Nombre	Molécula	Identificador	Masa	Formula	Score
1	D- Fructosa		C00095	180.063	$C_6H_{12}O_6$	1.0
2	L-Sorbose		C00247	180.063	$C_6H_{12}O_6$	0.961
3	D-Glucosa		C00031	180.063	$C_6H_{12}O_6$	0.903

Para confirmar la identificación de los compuestos obtenidos con base en sus espectros de masas, es necesario utilizar estándares auténticos de estos compuestos para fines comparativos. En este sentido, se realizó el análisis por GC-FID de una mezcla de estándares de glucosa, fructosa y etil maltol (ion 141.0549). Para ello, se llevó a cabo una típica reacción de sililación de grupos hidroxilo presentes en los azúcares con BSTFA o MSTFA, obteniéndose derivados volátiles y térmicamente estables [66]. A continuación, se describe el procedimiento y los resultados obtenidos de este análisis.

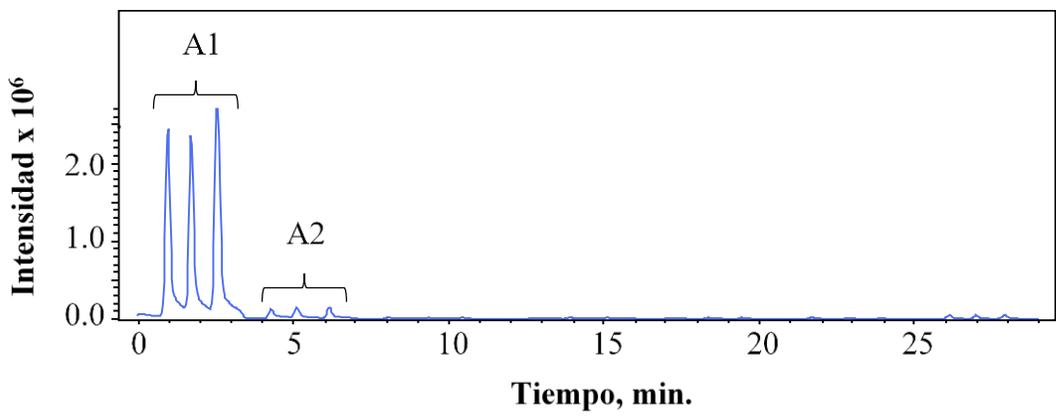
Para la derivatización de azúcares, se tomaron 200  $\mu$ l de tequila y se secaron en SpeedVac (45°C, 2 horas), al residuo obtenido se le agregaron 20  $\mu$ l de piridina y 40  $\mu$ l de BSTFA + TMCS 99:1 (reactivo derivatizante), la mezcla se dejó en condiciones de reacción a 60 °C durante 40 minutos, para finalmente adicionar 200  $\mu$ l de tolueno con el fin de resuspender los derivados formados e inyectar 1  $\mu$ l al sistema GC-FID.

Las condiciones instrumentales utilizadas en el análisis se resumen en la *Tabla 26*, los flujos de gases en el detector fueron: aire 450 ml/min e hidrogeno 45 ml/min, Split 5:1, el programa de temperatura en la columna se inició en 80 °C y se mantuvo durante dos minutos, en ese momento se incrementó a razón de 16 °C / min hasta llegar a 240 °C, donde se mantuvo durante un minuto para concluir la cromatografía con un tiempo total de 13 minutos. La temperatura del inyector fue 250 °C y la del detector de 300 °C. La columna capilar empleada fue una PE-XLB de Perkin Elmer (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm).

**Tabla 26.** Condiciones instrumentales empleadas para análisis de azúcares en muestras reales de tequila posiblemente adulterados con glucosa o fructosa.

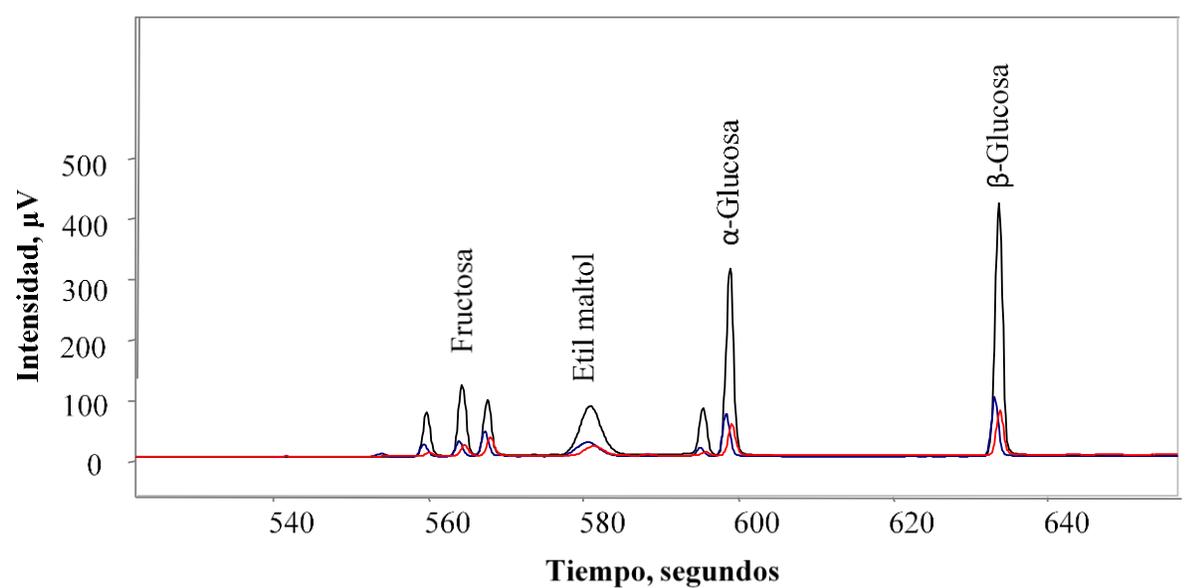
Parámetro	Condiciones seleccionadas			
Inyector	1 µl			
Temp. de inyector	250 °C			
Split	5:1			
Flujo de gas acarreador	Hidrógeno 1 ml/min			
Columna	PE-XLB (30 m x 0.25 mm, 0.25 µm)			
Programa de temperatura del horno	°C/min	Temp. °C	Hold (min)	Total (min)
	-	80.0	2.0	2.0
	16	240	1.0	13.0
Detector	FID			
Temp. de detector	300 °C			

Se prepararon los estándares de glucosa, fructosa y etil maltol, las soluciones mix fueron preparadas en agua desionizada en un rango de concentraciones de 0.1 – 1.0 mg/ml para cada analito y fueron analizadas de manera paralela a las muestras de tequila. Puesto que el objetivo fue confirmar la identidad de azúcares en el tequila y estimar sus concentraciones en el tequila, no fue necesario llevar a cabo el proceso de calibración.



**Figura 23.** Diagrama de cromatograma de ion extraído para el ion  $m/z$  203.0531 de tequila añejo, se observa las muestras A1 y A2 con un mayor contenido de azúcar.

Para el análisis por GC-FID se seleccionaron dos tequilas añejos A1 y A2; en el análisis por FIA-ESI-QTOF-MS se observó que A1 presentaba alta intensidad del ion  $m/z$  203.0531, mientras que el tequila A2 casi no contenía este ion (véase la Fig. 23).



**Figura 24.** Cromatograma típico de análisis de azúcares en GC-FID: Negro- mix de glucosa, fructosa y etil maltol de 0.5 mg/ml de cada uno de ellos. Azul- mix de estándares de 0.1 mg/ml; Rojo- muestra de tequila A2.

En la *Fig. 24* se muestra el cromatograma obtenido del análisis por GC-FID de dos mix de estándares (0.1 y 0.5 mg/ml) y una muestra real de tequila añeja (A2), observamos que la concentración de los analitos en el tequila fluctúa en concentraciones aproximadas de 0.1 mg/ml, con lo que se confirma la presencia de glucosa, fructosa y etil maltol en tequilas. Comparando los fiagramas del ion  $m/z$  203.0531 obtenidos para los tequilas A2 y A1, podemos extrapolar que en el tequila A1 la concentración de glucosa y fructosa podría llegar a valores aproximados de 10 mg/ml. Esto significa que por litro de A1 se encuentran por lo menos 20 gramos de azúcar entre fructosa y glucosa, lo que claramente indica que el tequila añejo A1 es un tequila adulterado con adición de azúcar y por tanto de mala calidad. Desde el punto de vista de utilidad del procedimiento FIA-ESI-QTOF-MS propuesto en esta parte del trabajo, todas aquellos tequilas que son adulteradas con azúcares no pueden ser analizadas debido a interferencias en la ionización que provoca errores en la cuantificación de los analitos.

Para eliminar los interferentes, se propone un pretratamiento de muestra. Para lograr la remoción de los principales interferentes polares tales como azúcares, etil maltol, furfuraldehído y 5-hidroximetil furfuraldehído, se intentó usar el mismo pretratamiento de muestra que demostró su utilidad en el análisis por GCTQMS, sustituyendo en la etapa de extracción el acetato de etilo por acetonitrilo; sin embargo, para algunos tequilas la fase orgánica recuperada presentó turbidez e incluso se formaba un precipitado por lo que no fue una opción viable. Otra alterativa, fue llevar a cabo limpieza de la muestra con ayuda de una trampa C18 para retener los compuestos de interés y eliminar en un primer paso los potenciales interferentes que afectan el análisis. Con esta propuesta, se procedió a realizar un procedimiento modificado de análisis por FIA-ESI-QTOF-MS integrando una trampa C18 en el sistema de flujo, el diseño del sistema y los resultados obtenidos se describen en el siguiente capítulo.

### **4.5.3 Puesta a punto del sistema FIA-ESI-QTOF-MS integrando una trampa C18 para limpieza de la muestra**

En mayoría de las aplicaciones en espectrometría de masas, el sistema FIA ha sido utilizado para el transporte de la muestra. En este trabajo, se propuso la integración de una etapa de limpieza de la muestra mediante sorción de los compuestos de interés en una trampa C18, eliminando los potenciales interferentes de carácter polar (incluyendo azúcares). Se esperaba que con este sistema pudiera lograrse la cuantificación de los seleccionados indicadores de añejamiento del tequila de forma correcta.

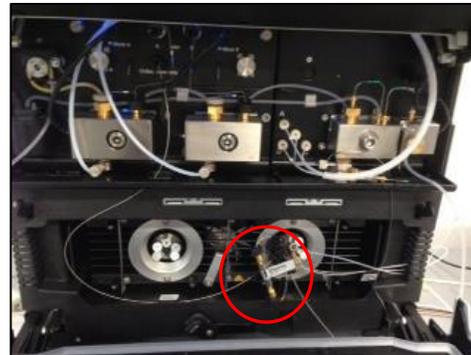
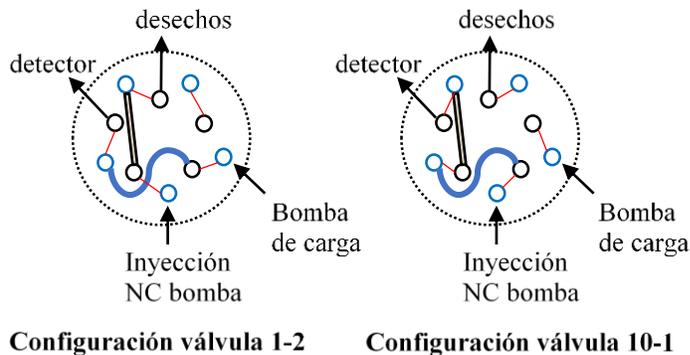
#### **4.5.3.1 Reactivos y muestras**

Se utilizaron los mismos reactivos, solventes, las soluciones de estándares y las muestras de tequilas que en las partes anteriores. Se utilizó una trampa C18 con dimensiones 0.5 mm x 0.3 mm y tamaño de partícula 3  $\mu\text{m}$  (Agilent).

#### **4.5.3.2 Puesta a punto del procedimiento FIA-ESI-QTOF-MS con trampa C18**

Al integrar una trampa C18, es necesaria una dilución de muestra, para lo cual se aplicó la dilución 1:6 con una solución al 0.1 % de TFA tanto para las soluciones de calibración como para las muestras reales, con el fin de obtener aproximadamente una concentración de 5.7 % v/v de etanol, favoreciendo la retención de los compuestos de interés en la trampa.

El montaje se obtuvo modificando el sistema FIA utilizado anteriormente. Específicamente, se eliminó la válvula de inyección Rheodyne, realizando las inyecciones mediante auto muestreador del cromatógrafo de líquidos (Ultimate 3000 RLSC system, Thermo Scientific Dionex) el cual es controlado por el software Hystar y permite la sincronización de las operaciones del sistema cromatográfico (sin columna) y del espectrómetro de masas maXis impact ESI-QTOF-MS (Bruker Daltonics).



**Figura 25.** Sistema de inyección de FIA-ESI-QTOF-MS usando una trampa C18, se presenta la válvula de 10 puertos del cromatógrafo de líquidos Ultimate 3000 con configuración 1-2 y 10-1

En la *Fig. 25* se presenta la configuración utilizada en una válvula de diez puertos para cargar la muestra a la trampa, realizar su posterior elución y transporte a la fuente de ionización. La posición 1-2 se utilizó para cargar la muestra en la trampa (preconcentración de los analitos y eliminación de compuestos polares); el volumen de inyección fue de 10  $\mu\text{l}$  y la solución portadora fue de 0.1% de ácido fórmico con 5% de acetonitrilo, manteniendo el flujo de 10  $\mu\text{l}/\text{min}$  durante 2 minutos (*Tabla 27*). Enseguida se hizo un cambio a la posición 10-1, para eluir solutos retenidos y transportarlos a la fuente de ionización. Esta etapa fue controlada por la bomba nano, utilizando como eluyente la solución de 0.1% de ácido fórmico: acetonitrilo (25:75) y el flujo de 10  $\mu\text{l}/\text{min}$  durante 1 minuto (*Tabla 27*), lo que suma un tiempo total de 3 minutos por muestra.

**Tabla 27.** Condiciones de la solución de flujo para bomba de carga y NC del equipo de HPLC; A- HCOOH 0.1 %; B- ACN

NC bomba		
	Flujo ( $\mu\text{l}/\text{min.}$ )	%B
1	10	75

Bomba de carga		
	Flujo ( $\mu\text{l}/\text{min.}$ )	%B
1	10	5

Las condiciones instrumentales de análisis en el espectrómetro de masas obtenidas del tuning de los analitos se presentan en la *Tabla 28*.

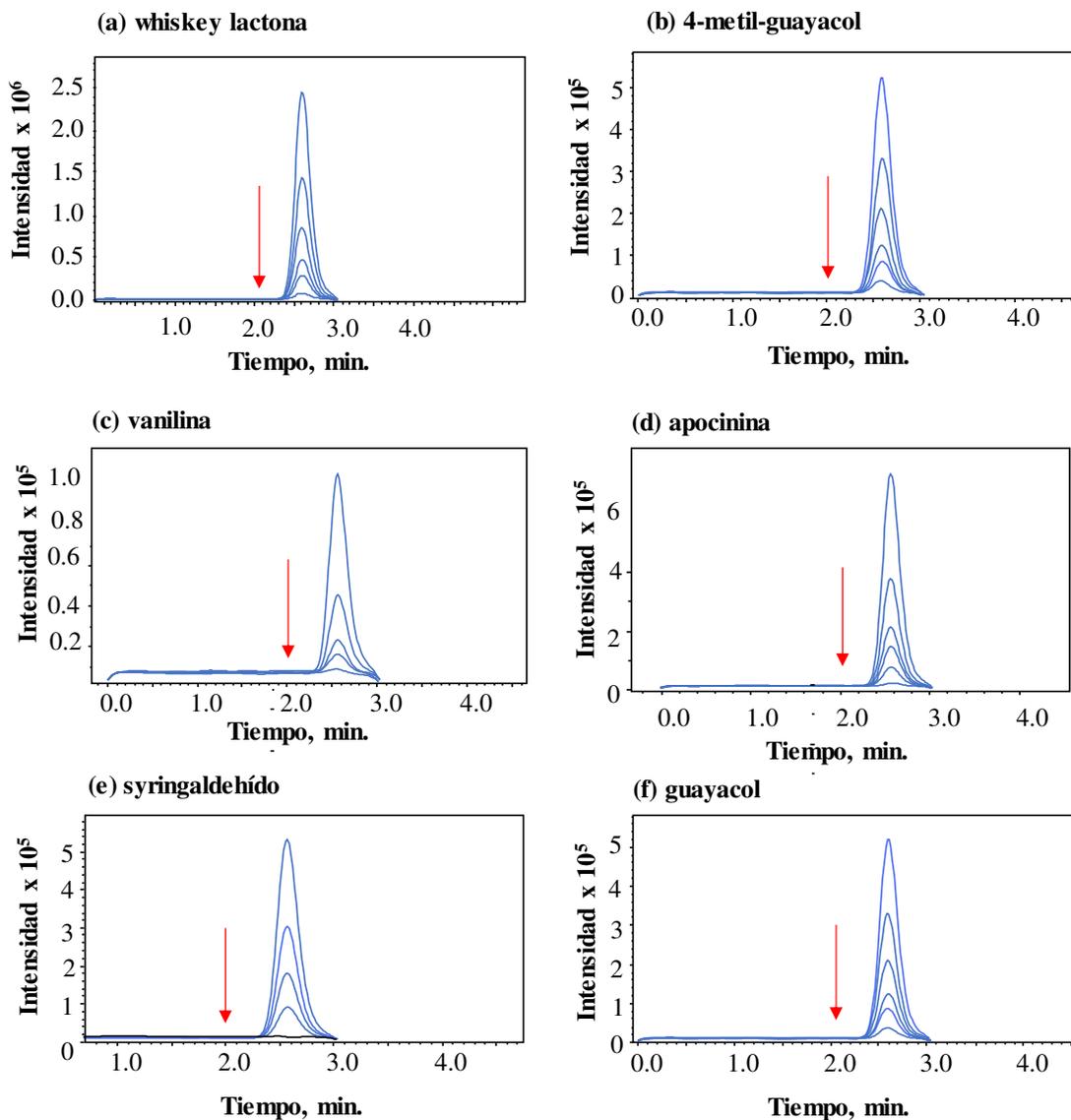
**Tabla 28.** Condiciones instrumentales utilizadas para el análisis de indicadores de añejamiento por FIA-ESI-QTOF-MS con trampa C18

<b>Parámetro</b>	<b>Valor del parámetro</b>
Fuente de ionización	ESI (+)
Voltaje “offset”	500 V
Voltaje en capilar de electro-nebulización	4500 V
Presión de gas nebulizador	0.6 bar
Gas de secado N <sub>2</sub>	4 ml/min
Temperatura de secado	180 °C
Modo de escaneo	MS
Intervalo de <i>m/z</i>	50-400

#### **4.5.3.3 Calibración y evaluación de los parámetros analíticos del procedimiento FIA con trampa C18**

Las soluciones de calibración fueron preparados de manera similar que anteriormente se describió, cubriendo las concentraciones de 1000, 500, 250, 100, 40 y 0 µg/l de cada analito en 40% de etanol. Utilizando una trampa C18, todas soluciones de calibración y las muestras de tequila fueron diluidas 7 veces para bajar la concentración de etanol a 5.7 %. Es preciso mencionar que un blanco siempre fue corrido entre la curva de calibración y el análisis de muestras.

En las *Fig. 26* y *27* se presentan las señales analíticas obtenidas para las soluciones de calibración y para las muestras de tequila, respectivamente.



**Figura 26.** Señales analíticas obtenidas para las soluciones de calibración usando una trampa C18 en el sistema FIA-ESI-QTOF-MS para concentraciones de 0, 62.5, 125, 250, 500 y 1000  $\mu\text{g/l}$  de whiskey lactona, 4-metilguayacol y apocinina; y concentraciones de 0, 125, 250, 500 y 1000  $\mu\text{g/l}$  para syringaldehído, guayacol y vanilina. (La flecha roja indica el cambio de configuración de válvula).

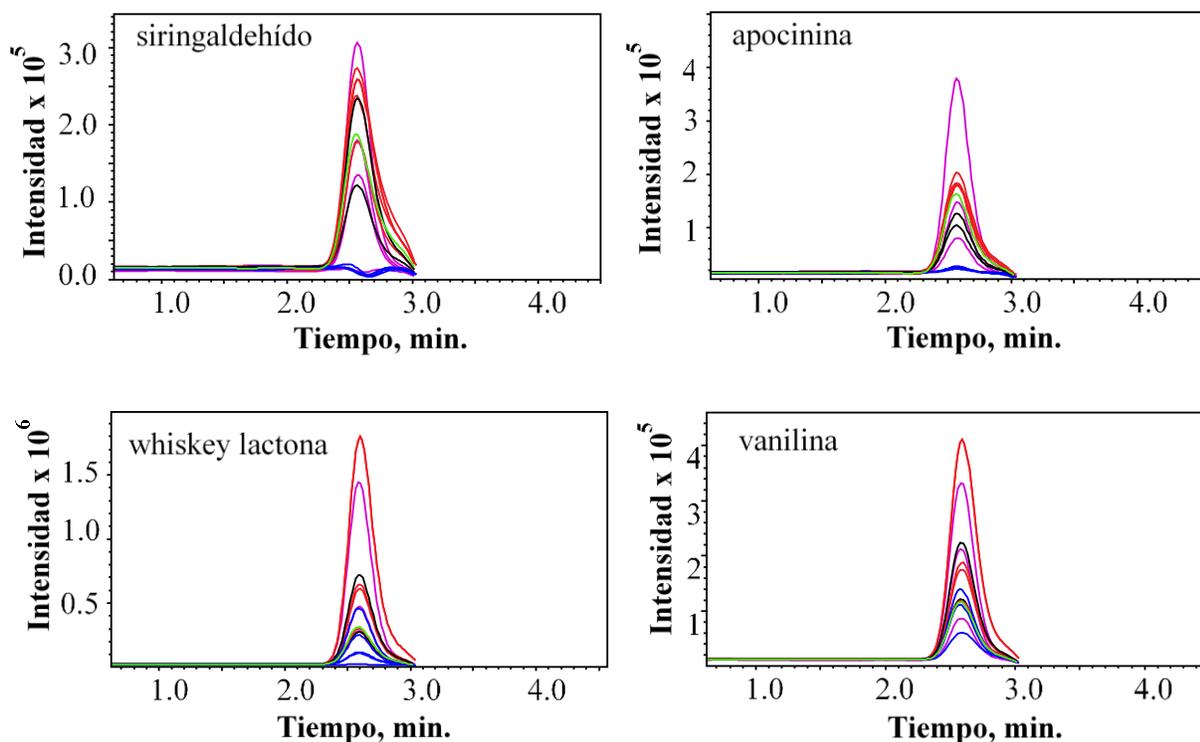
Las funciones de calibración se obtuvieron con base a tres réplicas de cada punto de la curva, utilizando como señal analítica el área del pico del ion extraído. En la *Tabla 29* se presentan las funciones de regresión lineal y con ajuste cuadrático junto con los principales parámetros analíticos: pendiente (S),  $R^2$  y desviación estándar (DER). Para la cuantificación, se utilizaron las funciones de regresión lineal, excepto 4-metilguayacol para el cual se utilizó la función cuadrática.

**Tabla 29.** Ecuaciones de calibración obtenidas utilizando el procedimiento FIA-QTOF-MS con trampa C18. Se presentan los valores promedios de las pendientes e intercepto con base en tres réplicas. “Y” es señal analítica del estándar definida con área del pico; “X” es la concentración del analito en µg/l; “R<sup>2</sup>” – coeficiente de regresión; “DER” – desviación estándar.

<b>Estándar</b>	<b>Ecuación</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>DER %</b>
4-metilguayacol	$Y = 5.67 \times 10^3 X + 4.53 \times 10^5$	0.9933	1.2
	$Y = -2.74 X^2 + 9.23 \times 10^3 X + 4.14 \times 10^5$	0.9997	0.9
whiskey lactona	$Y = 3.21 \times 10^4 X + 2 \times 10^6$	0.9999	1.7
	$Y = -0.252 X^2 + 783 X + 3.73 \times 10^4$	0.9996	2.4
apocinina	$Y = 9.58 \times 10^3 X + 3.05 \times 10^5$	0.9999	1.5
	$Y = 7.54 X^2 + 3.11 \times 10^3 X - 2.71 \times 10^4$	0.9999	2.1
siringaldehído	$Y = 6.314 \times 10^3 X + 8.72 \times 10^4$	0.9995	3.3
	$Y = -9.99 \times 10^{-3} X^2 + 6.32 \times 10^3 X + 8.71 \times 10^5$	0.9995	2.6

#### 4.5.4 Determinación de compuestos volátiles indicadores de la maduración en tequila por FIA-ESI-QTOF-MS con trampa C18

En la *Fig. 27* se observan las señales analíticas obtenidos para los indicadores de la maduración en los diferentes tipos de tequila y en un mix de calibración.



**Figura 27.** Señales analíticas obtenidas en el análisis de tequila utilizando el procedimiento FIA-ESI-QTOF-MS con trampa C18, se presenta comparación de las muestras reales de tequila y los puntos de calibración. Violeta - mix de analitos de calibración 62.5 y 125  $\mu\text{g/l}$ ; Azul- tequila blanco; Negro- tequila reposado, Rojo-tequila añejo y Verde- tequila extra añejo.

Al comparar la intensidad de las señales con las obtenidos por FIA-ESI-QTOF-MS sin trampa en *Fig. 19* se pueden observar importantes diferencias, confirmando eficacia de la trampa en la eliminación de interferentes polares y esperando una buena concordancia de los resultados con los obtenidos por GC-TQMS. Nótese en la *Fig. 27* que para los tequilas blancos (color azul) la señal obtenida en la mayoría de los analitos de interés es casi nula, mientras que para los tequilas añejos (color rojo) se ve un incremento de la concentración en los indicadores de añejamiento.

Los resultados de la determinación de whiskey lactona (suma de dos isómeros), 4-metilguayacol, apocinina y vanilina se presentan en la *Tabla 30, 31 y 32* para tequila blanco, reposado y añejo, respectivamente, comparando las concentraciones encontradas mediante dos procedimientos (FIA-ESI-QTOF-MS y GC-TQMS).

**Tabla 30.** Resultados obtenidos en el análisis de tequila blanco por GC-TQMS y mediante FIA-ESI-QTOF-MS con trampa C18; se presentan los valores promedio con sus respectivas desviaciones estándar en base a tres réplicas.

<b>Analito</b>	<b>Metodología</b>	<b>B1</b>	<b>B2</b>	<b>B5</b>	<b>B9</b>	<b>B11</b>
whiskey lactona	GC-MS	ND	ND	ND	ND	ND
	C18	14.3 ±	ND	30.8 ±	18.0 ±	22.6 ±
4-metilguayacol	GC-MS	133 ±	86.0 ±	-	-	163 ±
	C18	215 ±	62.9 ±	-	ND	122 ±
apocinina	GC-MS	26.6 ±	ND	ND	ND	ND
	C18	ND	ND	ND	ND	ND
vanilina	GC-MS	ND	ND	ND	ND	ND
	C18	132 ±	116 ±	111 ±	-	269 ±

**Tabla 31.** Resultados obtenidos en el análisis de tequila reposado por GC-TQMS y mediante FIA-ESI-QTOF-MS con trampa C18; se presentan los valores promedio con sus respectivas desviaciones estándar en base a tres réplicas.

<b>Analito</b>	<b>Metodología</b>	<b>R8</b>	<b>R10</b>	<b>E10</b>
whiskey lactona	GC-MS	264 ±	220 ±	158 ±
	C18	320 ±	134±	121 ±
4-metilguayacol	GC-MS	75.7 ±	78.9±	88.4 ±
	C18	79.0 ±	74.3±	138 ±
apocinina	GC-MS	-	49.1 ±	142 ±
	C18	88.8 ±	63.4 ±	133 ±
vanilina	GC-MS	-	338 ±	1073 ±
	C18	316 ±	339 ±	-

**Tabla 32.** Resultados obtenidos en el análisis de tequila añejo por GC-TQMS y mediante FIA-ESI-QTOF-MS con trampa C18; se presentan los valores promedio con sus respectivas desviaciones estándar en base a tres réplicas.

<b>Analito</b>	<b>Metodología</b>	<b>A2</b>	<b>A4</b>	<b>A6</b>	<b>A8</b>	<b>A10</b>
whiskey lactona	GC-MS	1323 ±	309 ±	287 ±	-	114 ±
	C18	874 ±	234 ±	301 ±	250 ±	131 ±
4-metilguayacol	GC-MS	122 ±	152 ±	264 ±	65 ±	284 ±
	C18	162 ±	139 ±	229 ±	84 ±	213 ±
apocinina	GC-MS	115 ±	72 ±	94 ±	-	136 ±
	C18	178 ±	150 ±	102 ±	183 ±	165 ±

De manera general, se observa una mejor congruencia entre los resultados de GC-TQMS y FIA-ESI-QTOF-MS con trampa C18 respecto la comparación que se hizo anteriormente para el sistema FIA sin trampa. Se concluye que la integración de la trampa permitió mejorar el desempeño del procedimiento FIA-ESI-QTOF-MS; sin embargo, la eliminación de interferentes y/o la retención/elución de los solutos en la trampa no fue eficiente por lo que el procedimiento no puede recomendarse para fines cuantitativos en su versión actual. En un trabajo futuro, es necesario afinar las condiciones de retención y elución de los componentes de la muestra en la trampa. Si se logra una buena concordancia de los resultados con los obtenidos por GC-TQMS, el procedimiento sería atractivo en términos de mínimo pretratamiento de muestra, posibilidad de preconcentración, automatización y corto tiempo de corrida (4 min), especialmente comparando con tiempo de separación cromatografía de 15.6 min. Una ventaja adicional es el simple y rápido manejo de datos para cuantificación, usando el software QuantAnalysis de Bruker.

## **4.6 Estudio exploratorio: análisis de tequila enfocado en su discriminación dependiendo del grado de añejamiento e identificación de compuestos atípicos.**

Como última parte del presente trabajo, se realizó un estudio exploratorio de los diferentes tipos de tequilas utilizando el espectrómetro de alta resolución con ionización suave (ESI-QTOF-MS) con previa separación por cromatografía de líquidos en escala capilar (capHPLC) – una típica herramienta en estudios metabolómicos. Con base en los espectros de masas adquiridos durante la corrida cromatográfica, se hizo el análisis estadístico enfocado a la discriminación de tequilas de acuerdo con el grado de añejamiento. Es necesario señalar que para este fin no es necesaria ni identificación ni cuantificación de compuestos individuales, debido a que las herramientas multivariantes solamente consideran y comparan los perfiles de elución y los datos espectrales adquiridos para los tequilas anotadas como blancos, reposados, añejos y extra añejos. En este trabajo, se utilizó en primera instancia el método PCA para observar la estructura de los datos y evaluar la factibilidad del análisis discriminatorio. En la segunda etapa, se obtuvo el modelo de discriminación con ayuda del método de mínimos cuadrados parciales (PLS). Finalmente, se procedió también a la identificación de compuestos clave, obteniéndose para ello los espectros de fragmentación de una serie de iones seleccionados a partir de los cromatogramas.

### **4.6.1 Análisis de tequilas por cap-HPLC-ESI-QTOF-MS**

La preparación de la muestra consistió en una dilución 1:4, para ello se tomaron 200 µl de tequila y se le agregaron 600 µl ácido trifluoroacético (TFA) al 0.1 % v/v. El sistema capHPLC- ESI-QTOF-MS consistió en el modelo Ultimate 3000 RLSC (Thermo Scientific Dionex) y del modelo maXis impact ESI-QTOF-MS (Bruker Daltonics) - la foto del montaje se presenta en la *Fig. 28* se utilizó la misma trampa C18 que en la sección anterior (5 cm x 0.3 mm, 5 µm) y una columna capilar Halo C18 (15 cm x 0.3 mm, 2.7 µm, Agilent Technologies).

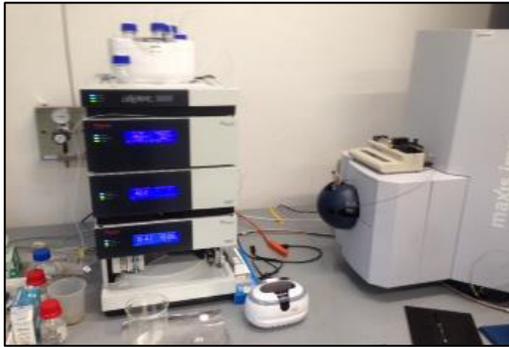
La composición de las soluciones de arrastre y gradientes empleados para las etapas de retención de metabolitos en la trampa y para su posterior separación en la columna, se especifican en la *Tabla 33.*, mientras que en la *Tabla 34*, se presentan las condiciones de operación del espectrómetro de masas durante el análisis.

**Tabla 33.** Condiciones de retención de los compuestos en trampa (etapa controlado por la bomba de carga) y de separación cromatográfica (etapa controlado por la bomba nano). Soluciones: A - A- ácido acético 0.1 % y B – acetonitrilo.

<b>Bomba NC</b>				<b>Bomba de carga</b>			
	Tiempo (min)	Flujo ( $\mu\text{g/l}$ )	%B		Tiempo (min)	Flujo ( $\mu\text{g/l}$ )	%B
<b>1</b>	-0.5	3	15	<b>1</b>	-0.5	15	8
<b>2</b>	0	3	15	<b>2</b>	0	15	8
<b>3</b>	17.5	3	95	<b>3</b>	4.0	0	8
<b>4</b>	18.0	3	95	<b>4</b>	18.0	0	8
<b>5</b>	20.0	3	15	<b>5</b>	20.0	15	8

**Tabla 34.** Condiciones instrumentales utilizadas para el análisis de tequilas utilizando cap-HPLC-ESI (+)-QTOF-MS.

<b>Parámetro</b>	<b>Valor del parámetro</b>
Velocidad de flujo	3 $\mu\text{l/min}$
Fuente de ionización	ESI (+)
Voltaje “offset”	550 V
Voltaje en capilar de electro-nebulización	4500 V
Presión de gas nebulizador	0.4 bar
Gas de secado $\text{N}_2$	4 ml/min
Temperatura de secado	180 $^{\circ}\text{C}$
Modo de escaneo	MS
Intervalo de $m/z$	50-400
Frecuencia de adquisición	0.5 Hz



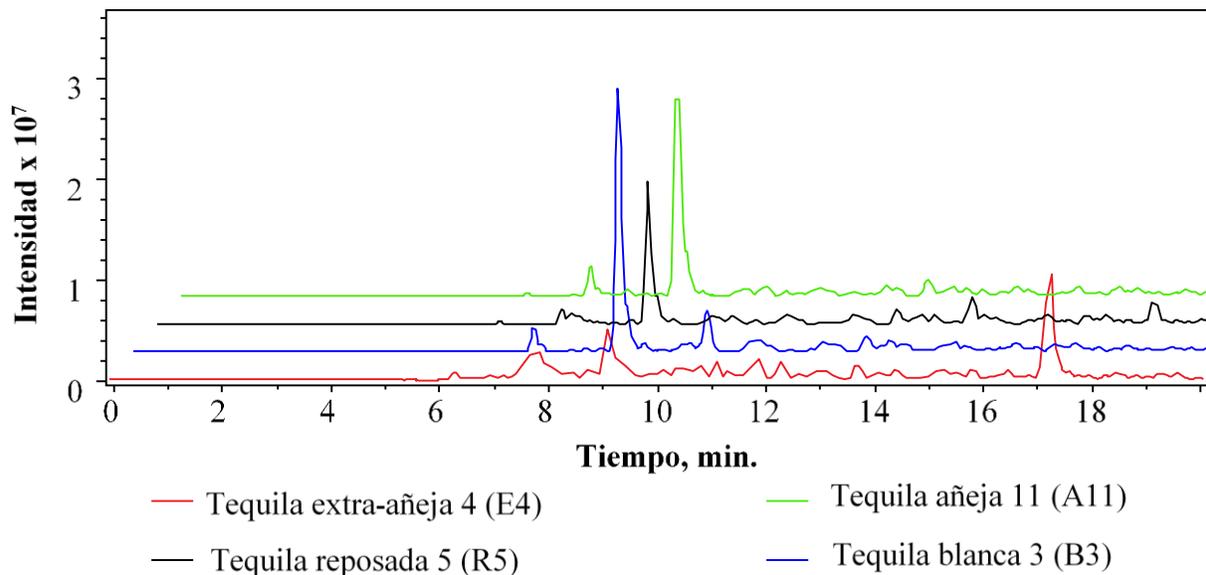
### cap-HPLC-ESI (+)-QTOF-MS

Flujo 3  $\mu\text{l}/\text{min}$  columna  
15 cm x 0.3 mm x 2.7  $\mu\text{m}$



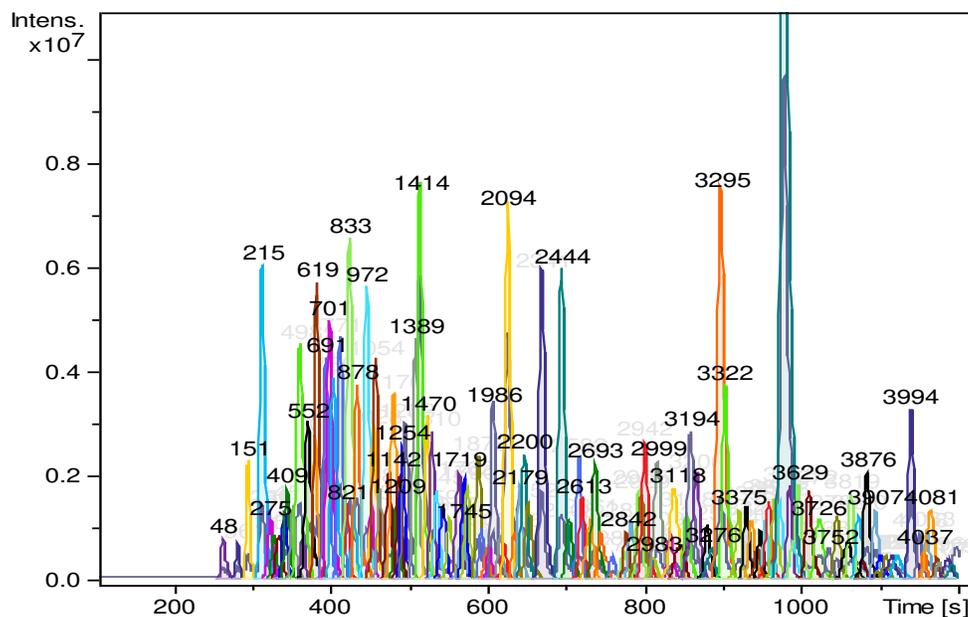
**Figura 28.** Ilustración del sistema instalado para análisis de tequilas por capHPLC-ESI (+)-QTOF-MS.

La separación cromatográfica de los compuestos se realizó utilizando un tiempo total de 20 minutos, en el cual se adquirieron los espectros de masas en el intervalo de  $m/z$  de 50 - 400. Los datos adquiridos pudieron utilizarse para la cuantificación de nueve compuestos seleccionados como indicadores de añejamiento del tequila, para el análisis de discriminación de tequilas y también para la identificación de compuestos individuales. A continuación, en la *Fig. 29*, se presentan algunos ejemplos de cromatogramas de pico base, obtenidos para los diferentes tipos de tequilas incluyendo un blanco, un reposado, un añejo y un extra-añejo.



**Figura 29.** Cromatogramas de pico base obtenidos para diferentes tipos de tequilas mediante cap-HPLC-ESI (+)-QTOF-MS. (Rojo- E4; Negro- R5; Verde- A11 y Azul- B3.)

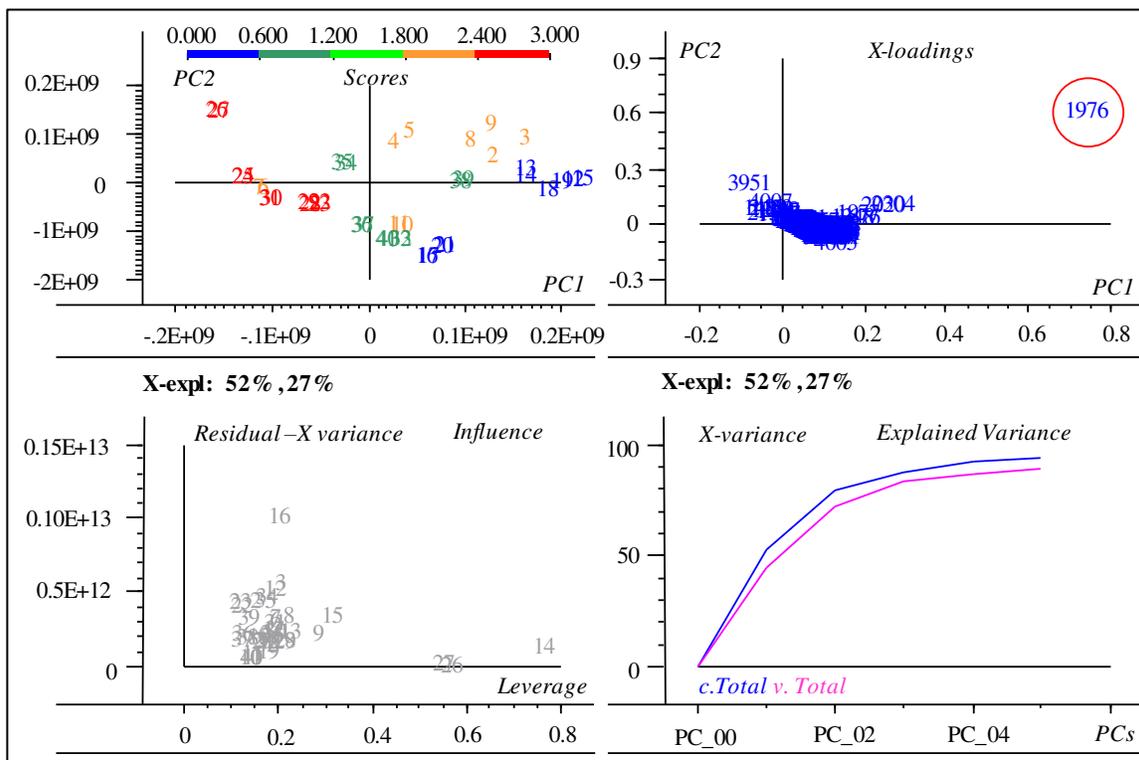
En esta *Fig. 29* se observan claramente diferencias entre los perfiles de elución de los iones más intensos entre los diferentes tipos de tequilas. En particular, el cromatograma del tequila extra añejo pone de manifiesto su composición química más compleja comparando con los otros tres tipos. Por otro lado, en la modalidad de pico base, el cromatograma representa la elución del ion más intenso correspondiente a cada tiempo de retención y estos datos son de poca utilidad para el análisis discriminatorio. A partir de los cromatogramas de iones totales y con ayuda de software DataAnalysis (Bruker), se obtuvieron los cromatogramas desconvolucionados en los cuales se reconocen compuestos individuales. El reconocimiento de señales se realiza con base en los tiempos de retención y los datos MS y MS/MS, de manera de ejemplo, en la *Fig. 30*, se presenta el cromatograma “dissect” obtenido para el tequila A2.



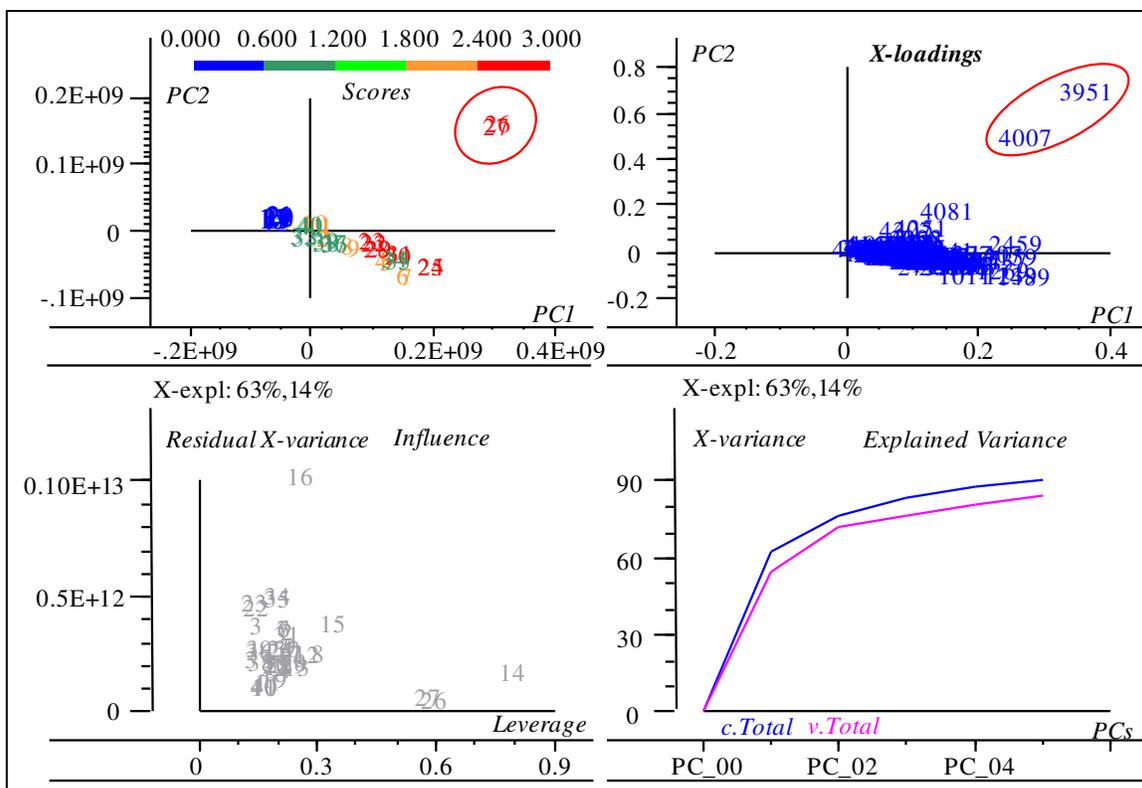
**Figura 30.** Cromatograma “dissect” obtenido en el análisis del tequila A2 por capHPLC-ESI- (+)-QTOF-MS

## 4.6.2 Análisis de datos capHPLC-ESI-QTOFMS por el método multivariante PCA

Para el análisis PCA, se tomaron en cuenta los valores del tiempo de retención y las respectivas intensidades de las características moleculares obtenidas en el análisis de cinco muestras para cada categoría de tequila, cada una de ellas con dos réplicas técnicas (un total de 20 muestras y 40 cromatogramas). Con el fin de reducir la cantidad de datos (sin modificar su estructura), en la primera instancia se construyó la tabla de “buckets” donde todos los datos son condensados y ordenados definiendo los intervalos de  $m/z$  y del tiempo de cromatograma, esta operación se realizó con ayuda del programa ProfileAnalysis de Bruker. Posteriormente, las tablas fueron transferidas al software The Unscrambler® v7.5 para realizar el análisis de PCA. El primer modelo PCA obtenido se presenta en la Fig. 31, donde podemos notar que los dos primeros componentes abarcan 79% de la variabilidad total de los datos, pero en la gráfica de scores no se observa una buena separación de las muestras de acuerdo con su grado de añejamiento. Además, en la gráfica de X-loadings hay una variable que afecta fuertemente el modelo por lo que se decidió eliminar esta variable y repetir la construcción del modelo.

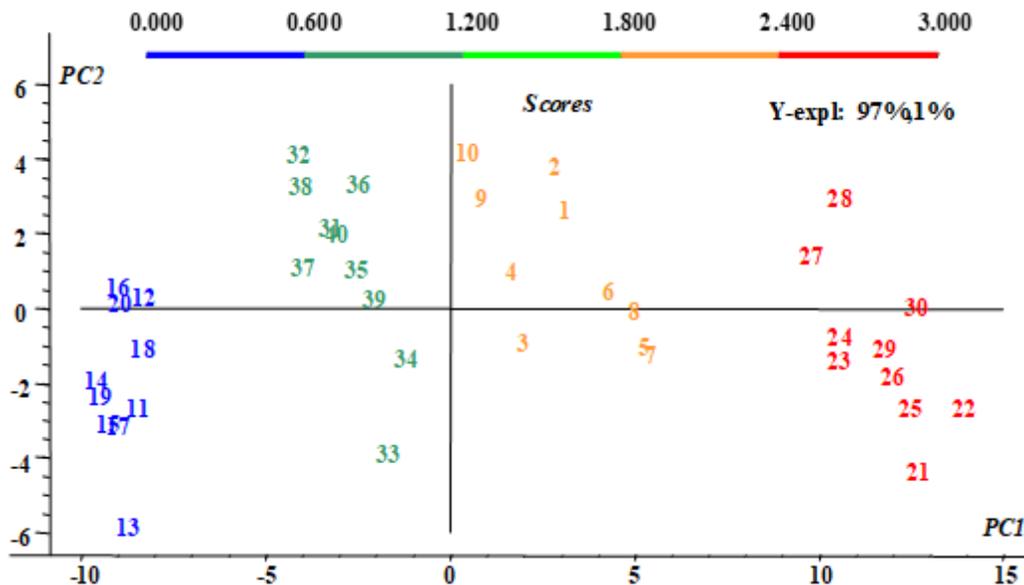


**Figura 31.** Modelo PCA obtenido con base de las tablas buckets de 20 muestras con dos replicas técnicas para cada uno de ellos, si eliminar ningún dato. Azul-tequilas blancos; verde-reposados; naranja- añejos; rojo-extra añejos



**Figura 32.** Modelo PCA obtenido para las mismas **muestras de tequila** eliminando buckets con valores excesivamente altos, pero que no se presentaron en todas las tequilas. Azul- tequilas blancos; verde-reposados; naranja- añejos; rojo-extra añejos

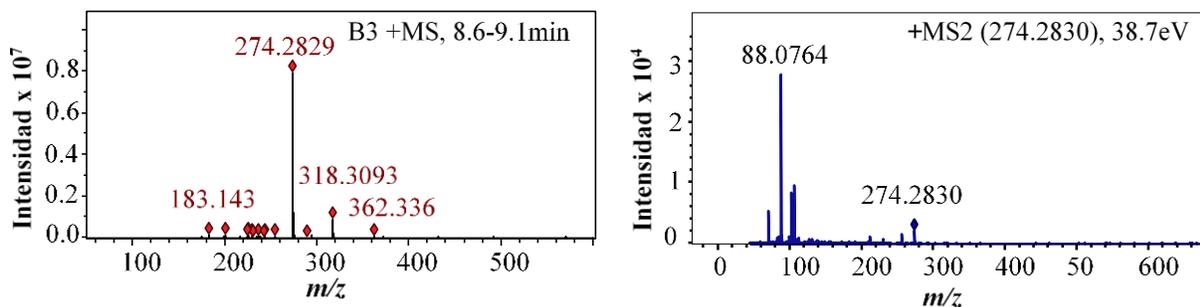
En el segundo modelo PCA obtenido (*Fig. 32*), los PC1 y PC2 abarcaron 77% de la variabilidad total de los datos y se observa una mejor separación de las muestras, aunque en este análisis se detectaron otras dos variables que afectaron la distribución de todas variables en la gráfica de X-loadings. Finalmente, después de eliminar estas variables presentes solamente en algunas muestras de tequilas y con intensidades altas, se obtuvo el tercer modelo PCA, el cual se presenta en la *Fig. 33*. En este modelo, los PC1 y PC2 describen 98% de la variabilidad total de datos, confirmando la factibilidad de discriminación de tequilas dependiendo del grado de su maduración, con base en los datos LC-MS.



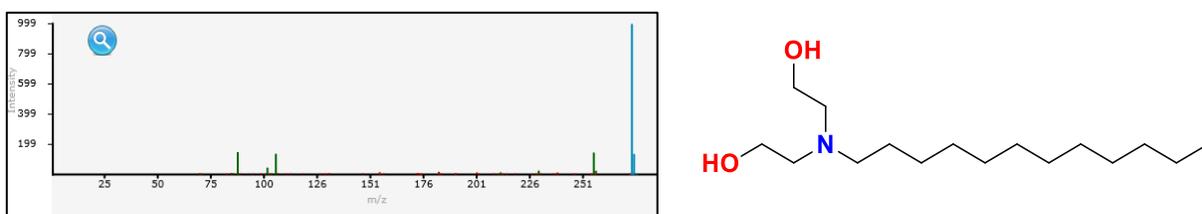
**Figura 33.** Resultado del PCA final obtenido después de eliminar todas las señales atípicas características de solo algunos cuantos tequilas, se observa la correcta agrupación de los tequilas de acuerdo con el tipo de categoría al cual corresponden. Azul- tequilas blancos; verde-reposados; naranja- añejos; rojo-extra añejos.

#### 4.6.3 Identificación de compuestos “atípicos” detectados en tequilas por PCA

Con base en los resultados descritos en la sección anterior, parecía interesante identificar aquellos compuestos que afectaron fuertemente a los dos primeros modelos PCA, por estar presentes solamente en algunos de los tequilas analizadas en altas concentraciones... El primero de estos compuestos fue la variable 1975 detectada en tabla de bucket (*Fig. 31*). La inspección manual de los cromatogramas arrojó que esta variable corresponde al compuesto que se eluye con un tiempo de retención de 540 s (9.0 min) y forma en ESI el ion con  $m/z$  274.5, de hecho, el mismo ion está presente en el cromatograma de pico base de la muestra B3 indicando buena congruencia entre los diferentes tipos de análisis de datos (*Fig. 29*). Para la identificación, se utilizó la herramienta MetFrag, de la misma manera como se hizo para la identificación de azúcares.



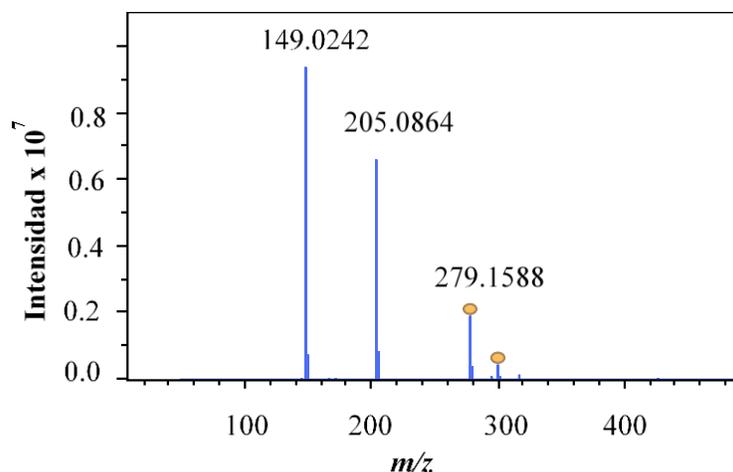
**Figura 34.** Espectro de masas (MS) adquirido en tiempo de elución del compuesto “atípico” en el tequila B3 y el espectro de fragmentación del ion  $m/z$  274.2829



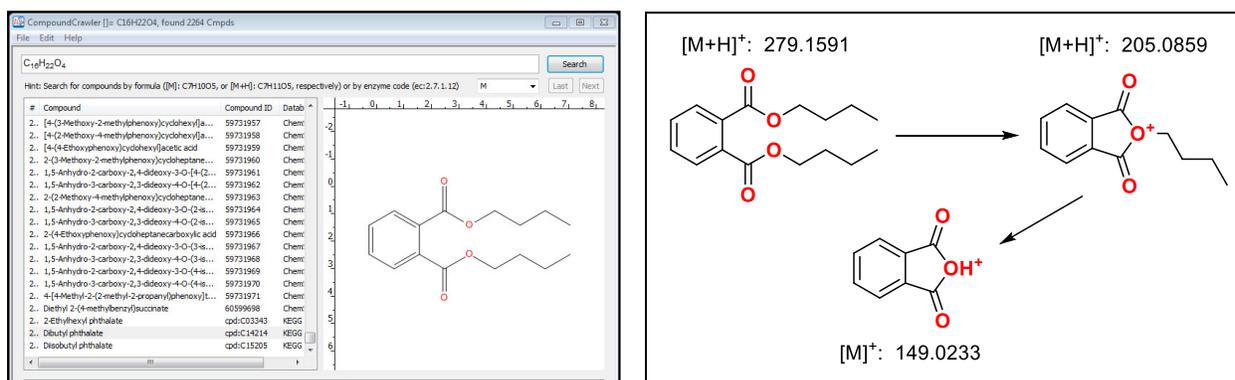
**Figura 35.** Identificación de N-lauril etanodiamina como compuesto “atípico” en el tequila B3 con base en la búsqueda en MetFrag (fragmentación del ion  $m/z$  274.2829)

Mediante el análisis en la base de datos de MetFrag de los espectros de MS y MS/MS (*Fig. 34*) se descubrió que el compuesto al que corresponde el ion  $m/z$  274.2829 es N-lauril etanodiamina (*Fig. 35*). Se concluye que el compuesto “atípico” encontrado en el tequila blanco B3 fue un contaminante proveniente del proceso de lavado de las instalaciones debido a que es un típico componente de los champús y jabones. En la inspección de los cromatogramas de otras tequilas producidas por el mismo fabricante, se detectó la presencia de trazas del mismo compuesto, confirmando la inadecuada practica de lavado utilizada por esta empresa.

En el segundo modelo PCA (*Fig. 32*), las dos “atípicas” variables fueron 3951 y 4007; correspondientes a los iones  $m/z$  149.0242 y 205.0864 adquiridos en el minuto 17 del cromatograma, la respectiva señal se observa en el cromatograma “basepeak” presentado en la *Fig. 29* para el tequila E4. El espectro de masa adquirido en el minuto 17 del cromatograma se presenta en la *Fig. 36*, donde aparecen cuatro iones aparentemente pertenecientes al mismo compuesto, entre ellos los de  $m/z$  149.0242 y 205.0864.



**Figura 36.** Espectro de masas (MS) adquirido en el minuto 17 del cromatograma del tequila E4.

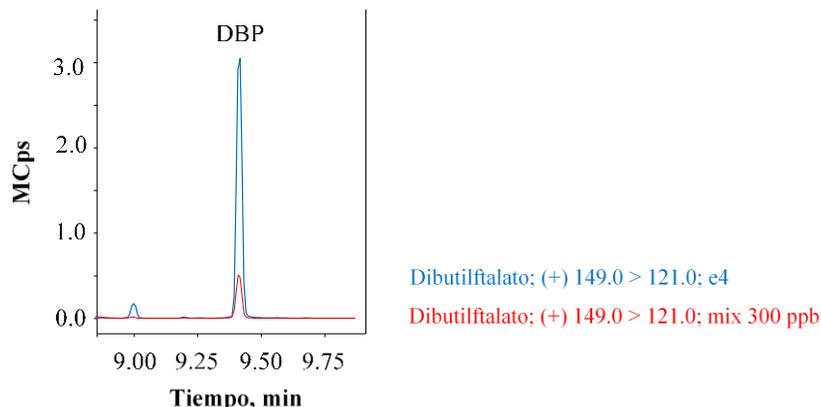


**Figura 37.** (a) Identificación del compuesto detectado en el tequila E4 con un tiempo de retención de 17 min. (a) búsqueda mediante CompoundCrawler (DataAnalysis); (b) mecanismo de fragmentación del ion 279.1591.

Para la identificación del compuesto presente en la muestra E4 se hizo uso de la herramienta Smart Formula del software DataAnalysis la cual nos permitió asignar al ion  $m/z$  279.1591 la fórmula química condensada  $C_{16}H_{23}O_4$  con muy alto puntaje de coincidencia (“score” 100), dicha fórmula junto con los iones de fragmentación se envió a CompoundCrawler (incluido en DataAnalysis) encontrándose al di-butyl ftalato como compuesto con mayor coincidencia en el padrón de fragmentación con el observado experimentalmente (Fig. 37).

Los ftalatos son compuestos contaminantes omnipresentes en el medio ambiente y en los alimentos, debido a su amplio uso como plastificantes. De manera general, los ftalatos han sido catalogados por la Organización Mundial de la Salud como disruptores endocrinos y diferentes organismos legislativos a nivel mundial han establecido normas para evitar excesiva exposición de la población a estos contaminantes.

Para confirmar la presencia de ftalatos, en este trabajo se llevó a cabo el análisis de tequilas utilizando el procedimiento desarrollado en un trabajo de maestría previamente realizado en el grupo de investigación titulado: “Uso de Cromatografía de gases con detector másico para la determinación de ftalatos en muestras medioambientales y en alimentos” [65]. Dicho procedimiento consiste en la separación de ftalatos este por cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas en tándem y cuantificación por monitoreo de reacciones múltiples (GC-TQMS/MS, MRM). En la *Fig. 38* se presenta el segmento de cromatograma MRM obtenido para la muestra E4, correspondiente a la elución del di-butil ftalato junto con la señal del estándar de este compuesto con concentración de 300 µg/l; este resultado confirma de manera contundente la presencia de di-butil ftalato en el tequila E4. Cabe señalar que algunas compañías tequileras aplican la aireación del tequila durante su añejamiento en las barricas de roble, para lo cual utilizan probablemente mangueras de plástico y esta podría ser una fuente de ftalatos en los tequilas. Es importante mencionar que dibutilftalato fue detectado en los tequilas extra añejos provenientes del mismo fabricante, pero no en los tequilas con menor grado de añejamiento.



**Figura 38.** Cromatograma MRM por GC-TQMS que confirma la presencia de di-butil ftalato en el tequila E4. Cromatogramas: azul- muestra E4; rojo- mix de estándares 300 ppb

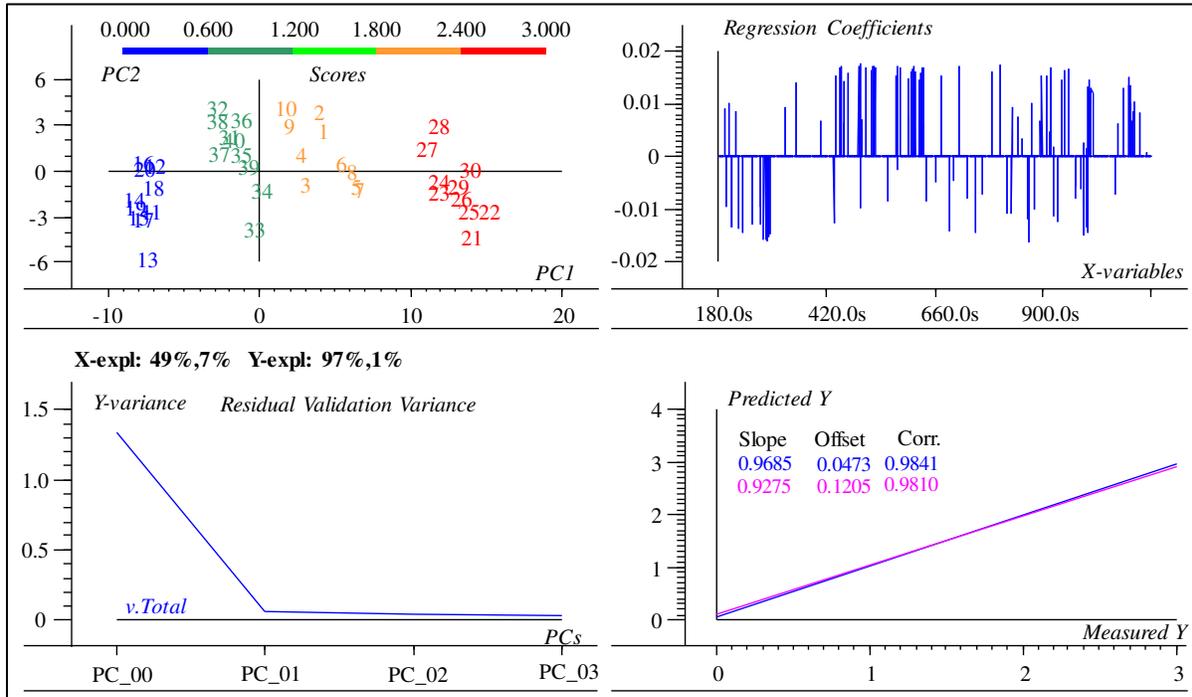
## 4.6.4 Modelo PLS para predicción de tequilas

### 4.6.4.1 Aplicación del método de mínimos cuadrados parciales (PLS1) para la discriminación de cuatro categorías de tequilas

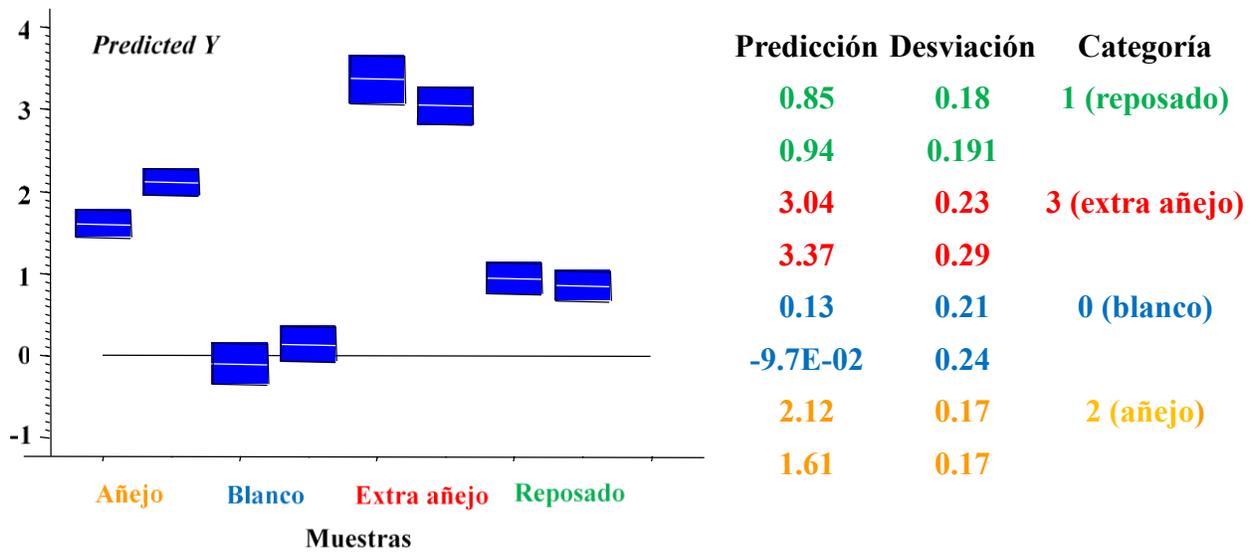
Para el algoritmo PLS1 se utilizaron datos LC-MS obtenidos para diferentes categorías de tequila que fueron anotados de la siguiente manera: (0) blancos; (1) reposados; (2) añejos y (3) extra añejos. En la construcción del modelo, se generan variables latentes (componentes) que permiten reducir la dimensionalidad de los datos LC-MS de tal manera que se colectan y usan datos de mayor relevancia en la predicción del tipo de tequila. La matriz X de variables independientes ha sido conformada por los datos LC-MS adquiridos para 20 tequilas (5 de cada una de las categorías), mientras que los valores Y correspondieron a las cuatro categorías de tequila. La predicción se realizó para 8 tequilas, sometiendo al modelo sus respectivos datos LC-MS. Cabe señalar que para construir el modelo PLS1 que permitiera la predicción adecuada, era necesaria la eliminación del ruido (eliminado las señales que presentaban bajos coeficientes de regresión, *Fig. 39*) y también se eliminaron las señales de compuestos “atípicos” (descritos en la sección anterior). El modelo PLS1 final se presenta en la *Fig. 39*, en la gráfica de scores, se observa muy buena separación de las muestras de acuerdo con el grado de su añejamiento (categoría). Para los dos primeros componentes, el modelo cubre un 56% de variabilidad de los datos en la matriz X y un 98% de la predicción de los valores Y (categorías 0 - 4 de tequila). En la gráfica de coeficientes de regresión aparecen las señales de mayor contribución - mismos que fueron tomadas para construir el modelo, la cantidad de estas señales es relativamente pequeña comparado con un total de los datos crudos adquiridos en una corrida de capHPLC-ESI-QTOF-MS.

Finalmente, en la gráfica de calibración/predicción se demuestra el buen desempeño del modelo, ya que se obtuvieron valores muy similares de las pendientes y de los coeficientes de correlación en las dos etapas. El modelo PLS1 obtenido, se utilizó en la predicción de la categoría para 8 tequilas, con base en datos LC-MS adquiridos para cada una de las muestras en dos réplicas técnica. En la *Fig. 40* se presentan los resultados de este análisis donde podemos inferir la correcta clasificación de las muestras de tequila de acuerdo con la categoría a la que correspondieron.

Cabe agregar que el mismo modelo podría utilizarse en la detección de muestras adulteradas con composición química diferente a las cuatro categorías incluidas en el modelo.



**Figura 39.** Modelos PLS1 obtenido para la predicción de categorías de tequila, con variabilidad 56 % de variabilidad de los datos en matriz X y 98 % de la predicción de valores Y (categorías 0-4 tequilas).



**Figura 40.** Análisis de discriminación por PLS, modelo construido con base a 20 muestras de tequilas (dos replicas técnicas de cada una), se presenta la predicción de ocho muestras desconocidas reportando valores de las predicciones, así como sus respectivas desviaciones

## 5. Conclusiones

El presente trabajo de tesis ha sido enfocado en el desarrollo y aplicación de procedimientos analíticos que permitan evaluar el grado de añejamiento del tequila. De acuerdo con el objetivo, el intento fue identificar compuestos volátiles indicativos de la maduración del tequila y desarrollar procedimientos analíticos para su cuantificación, así como buscar un modelo de discriminación entre tequilas blancos, reposados, añejos y extra añejos.

El trabajo se realizó en cuatro etapas, llegando en cada una de ellas a las siguientes conclusiones:

Parte 1: Selección de compuestos volátiles asociados con el proceso de maduración del tequila.

Con base en un análisis comparativo de los perfiles de elución de compuestos volátiles/semi-volátiles obtenidos mediante cromatografía de gases con detector másico en modo TIC, se seleccionaron y posteriormente identificaron los siguientes compuestos asociados con el proceso de añejamiento: guayacol, 4-metilguayacol, 4-etilguayacol, cis-, trans- whiskey lactona, eugenol, apocinina, vanilina y siringaldehído.

Parte 2: Puesta a punto de un procedimiento por GC-TQMS para la determinación de los compuestos asignados como indicadores del proceso de maduración y su aplicación en el análisis de tequila disponible en el mercado mexicano.

La novedad consistió en simplificación de la etapa de tratamiento de muestra respecto estudios anteriores, mediante extracción y mejorada separación de fases agregando cloruro de sodio al sistema de tres solventes (agua y etanol contenidos en la muestra y acetato de etilo como extractante). Para eliminar por completo el agua, a la fase orgánica se agregó sulfato de sodio y carburo de calcio. En la adquisición de la señal se utilizó el monitoreo de iones selectivos (SIM), logrando límites de cuantificación para nueve compuestos en el intervalo 2.4 – 35.2 µg/l. Se llevaron a cabo los experimentos de recuperación, agregando a las muestras de tequila 100 µg/l y 1000 µg/l de cada uno de los analitos. Los porcentajes de recuperación evaluados fueron indicativos de una buena exactitud: 94.2 - 115 % y 89.7 – 118% excepto 135 % y 150% para eugenol, respectivamente. Los resultados obtenidos en el análisis de tequilas en cada una de las categorías confirmaron la utilidad de los nueve compuestos seleccionados como indicadores de proceso de añejamiento del tequila.

Los compuestos de mayor importancia fueron cis-whiskey lactona y vanilina ya que presentaron cambios de concentración más marcados y concentraciones más altas en los tequilas añejos. El tercer compuesto de interés es siringaldehído, el cual podría proponerse como un indicador distintivo de los tequilas reposados.

Parte 3: Estudio de factibilidad del análisis por inyección al flujo continuo como sistema de introducción de muestra para la determinación de nueve indicadores de añejamiento por ESI-QTOF-MS.

Se montó un sistema FIA-ESI-QTOFMS obteniéndose una buena linealidad y sensibilidad de calibración para seis compuestos: 4-metilguayacol, suma de dos isómeros de whiskey lactona, apocinina, vanilina y siringaldehído (0 – 2000 µg/l cada uno), con arginina como estándar interno; sin embargo, el procedimiento no pudo ser utilizado en análisis de muestras reales debido a interferencias de matriz. Mediante análisis por GC-FID, los principales interferentes fueron identificados como azúcares simples. Como estrategia de eliminación de interferencias, en el sistema FIA se integró una trampa C18 para retención/preconcentración de los solutos contenidos en el tequila. Aunque esta estrategia era adecuada y se obtuvo un mejor grado de concordancia de los resultados entre FIA-ESI-QTOF-MS con trampa y GC-TQMS respecto FIA sin trampa, el procedimiento aun no puede ser recomendado para los fines cuantitativos en su versión actual.

Parte 4: Análisis de discriminación de tequilas en función del grado de su añejamiento, utilizando datos crudos capHPLC-ESI-QTOFMS y herramientas de análisis multivariante.

Se obtuvieron cromatogramas capHPLC-ESI-QTOFMS y espectros MS/MS para cinco muestras de cada categoría de tequila, cada una de ellas con dos réplicas técnicas (un total de 20 muestras y 40 cromatogramas). En primer lugar, los valores del tiempo de retención y las respectivas intensidades de “buckets” fueron utilizados para construir el modelo PCA. Este análisis permitió detectar algunos compuestos atípicos presentes solamente en algunas muestras. Su identificación con base en el análisis de datos espectrales y búsqueda en la base de datos reveló la presencia de ftalatos y de N-lauril etanodiamina. Una vez eliminados estos compuestos atípicos, así como otras señales de baja significancia en la estructura del totalidad de datos, se obtuvo un modelo PLS de discriminación. Este modelo fue validado, dejando fuera una muestra de calibración a la vez, obteniéndose los valores de las pendientes y de  $R^2$  congruentes entre la etapa de calibración y validación.

En la predicción de ocho muestras de tequilas, se obtuvo correcta asignación de la categoría de cada una de ellas. De manera importante, para el análisis de discriminación no era necesaria ni la identificación ni la cuantificación de los compuestos individuales, debido a que la herramienta PLS solamente utiliza los datos instrumentales adquiridos para los tequilas anotadas como blancos, reposados, añejos y extra añejos.

En resumen, los resultados obtenidos en el desarrollo de la tesis demuestran importancia de las técnicas de espectrometría de masas en el análisis del tequila en el contexto de su grado de añejamiento. Cuando el objetivo es conocer las concentraciones de los compuestos volátiles de importancia en el proceso de añejamiento, se recomienda el uso del procedimiento GC-TQMS en modo SIM, señalando como una ventaja importante el novedoso y simple procedimiento de tratamiento de muestra. Por otro lado, para el análisis discriminatorio, una opción viable es el modelo PLS obtenido en base del análisis de una serie de tequilas por capHPLC-ESI-QTOF-MS. Cabe también mencionar que, algunos fabricantes de tequilas emplean aditivos o procedimientos que afectan de manera importante la composición y deterioran la calidad de los productos; en este trabajo se detectaron algunos compuestos atípicos y se sugirieron posibles fuentes de estos. Finalmente, la integración de la trampa C18 para la limpieza de la muestra y preconcentración de los analitos en un sistema FIA acoplado al ESI-QTOF-MS, podría ser una opción atractiva para la cuantificaciones de compuestos volátiles en el tequila con ventajas de simplicidad, rapidez, fácil adquisición y manejo de datos, sin tratamiento de muestra; sin embargo, es necesario afinar las condiciones experimentales para que este procedimiento proporcione resultados congruentes con GC-TQMS en modo SIM.

## Bibliografía

1. González-Robles, I.W. and D.J. Cook, *The impact of maturation on concentrations of key odour active compounds which determine the aroma of tequila*. Journal of the Institute of Brewing, 2016. **122**(3): p. 369-380.
2. Prado-Jaramillo, N., et al., *Volatile compounds generation during different stages of the Tequila production process. A preliminary study*. LWT-Food Science and Technology, 2015. **61**(2): p. 471-483.
3. Roldán, C.T., *NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-006-SCFI-2012, BEBIDAS ALCOHOLICAS-TEQUILA-ESPECIFICACIONES PREFACIO*.
4. Rodríguez, D.M. and K. Wrobel, *Spectrophotometric micro assay for determination of 2-furaldehyde in transformer oils*. Chemia analityczna, 2005. **50**(1): p. 315-326.
5. Cedeño Cruz, M. and J. Alvarez-Jacobs, *Production of tequila from agave: historical influences and contemporary processes*. Jaques KA, Lyons TP, Kelsall DR. The Alcohol Textbook. 3rd edition. University of Nottingham Press, Nottingham, 1999.
6. Santos-Zea, L., et al., *Agave (Agave spp.) and its traditional products as a source of bioactive compounds*. Current Bioactive Compounds, 2012. **8**(3): p. 218-231.
7. Berry, D., *Physiology and microbiology of the malt whisky fermentation*. 1984, Elsevier, Amsterdam.
8. Arellano, M., A. Gschaedler, and M. Alcazar, *Major Volatile Compounds Analysis Produced from Mezcal Fermentation Using Gas Chromatography Equipped Headspace (GC-HS)*. InTech, 2012: p. 73-88.
9. Escalona, H., et al., *Calidad del tequila como producto terminado: normatividad. Composición volátil y la imagen sensorial*. Ciencia y Tecnología del Tequila, avances y perspectivas, 2004: p. 174-256.
10. Poisson, L. and P. Schieberle, *Characterization of the most odor-active compounds in an American Bourbon whisky by application of the aroma extract dilution analysis*. Journal of agricultural and food chemistry, 2008. **56**(14): p. 5813-5819.
11. Pérez-Prieto, L.J., et al., *Extraction and formation dynamic of oak-related volatile compounds from different volume barrels to wine and their behavior during bottle storage*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003. **51**(18): p. 5444-5449.
12. Mosedale, J. and J.-L. Puech, *Wood maturation of distilled beverages*. Trends in Food Science & Technology, 1998. **9**(3): p. 95-101.
13. Tao, Y., J.F. García, and D.-W. Sun, *Advances in wine aging technologies for enhancing wine quality and accelerating wine aging process*. Critical reviews in food science and nutrition, 2014. **54**(6): p. 817-835.
14. Polášková, P., J. Herszage, and S.E. Ebeler, *Wine flavor: chemistry in a glass*. Chemical Society Reviews, 2008. **37**(11): p. 2478-2489.
15. Aoshima, H., et al., *Why Is an Aged Whiskey Highly Valued?* Current Nutrition & Food Science, 2009. **5**(3): p. 204-208.
16. Van Jaarsveld, F., et al., *Rapid induction of ageing character in brandy products. Part I. Effects of extraction media and preparation conditions*. 2009.
17. Nonato, E.A., et al., *A headspace solid-phase microextraction method for the determination of some secondary compounds of Brazilian sugar cane spirits by gas chromatography*. Journal of agricultural and food chemistry, 2001. **49**(8): p. 3533-3539.

18. Arrizon, J., et al., *Purification and substrate specificities of a fructanase from Kluyveromyces marxianus isolated from the fermentation process of Mezcal*. Bioresource technology, 2011. **102**(3): p. 3298-3303.
19. Berry, D. and D. Watson, *Production of organoleptic compounds*, in *Yeast biotechnology*. 1987, Springer. p. 345-368.
20. Ng, L.-K., *Analysis by gas chromatography/mass spectrometry of fatty acids and esters in alcoholic beverages and tobaccos*. Analytica Chimica Acta, 2002. **465**(1): p. 309-318.
21. Peña-Alvarez, A., et al., *Characterization of three Agave species by gas chromatography and solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2004. **1027**(1): p. 131-136.
22. King, A. and J. Richard Dickinson, *Biotransformation of monoterpene alcohols by Saccharomyces cerevisiae, Torulaspora delbrueckii and Kluyveromyces lactis*. Yeast, 2000. **16**(6): p. 499-506.
23. Peña-Alvarez, A., et al., *Determination of terpenes in tequila by solid phase microextraction-gas chromatography–mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2006. **1134**(1): p. 291-297.
24. De León-Rodríguez, A., et al., *Characterization of volatile compounds from ethnic Agave alcoholic beverages by gas chromatography-mass spectrometry*. Food Technol Biotechnol, 2008. **46**(4): p. 448-455.
25. Magana, A.A., et al., *Determination of small phenolic compounds in tequila by liquid chromatography with ion trap mass spectrometry detection*. Food Analytical Methods, 2015. **8**(4): p. 864-872.
26. Ávila-Reyes, J.A., et al., *Phenol profile and antioxidant capacity of mescal aged in oak wood barrels*. Food research international, 2010. **43**(1): p. 296-300.
27. Cerezo, A.B., et al., *Effect of wood on the phenolic profile and sensory properties of wine vinegars during ageing*. Journal of food composition and analysis, 2010. **23**(2): p. 175-184.
28. Vallejo-Cordoba, B., A.F. González-Córdova, and M. del Carmen Estrada-Montoya, *Tequila volatile characterization and ethyl ester determination by solid phase microextraction gas chromatography/mass spectrometry analysis*. Journal of agricultural and food chemistry, 2004. **52**(18): p. 5567-5571.
29. Rodríguez, D.M., K. Wrobel, and K. Wrobel, *Determination of aldehydes in tequila by high-performance liquid chromatography with 2, 4-dinitrophenylhydrazine derivatization*. European Food Research and Technology, 2005. **221**(6): p. 798-802.
30. Lachenmeier, D.W., et al., *Quantification of selected volatile constituents and anions in Mexican Agave spirits (Tequila, Mezcal, Sotol, Bacanora)*. Journal of Agricultural and Food chemistry, 2006. **54**(11): p. 3911-3915.
31. Benn, S.M. and T.L. Peppard, *Characterization of tequila flavor by instrumental and sensory analysis*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1996. **44**(2): p. 557-566.
32. Flores, C.R., et al., *ICP-MS multi-element profiles and HPLC determination of furanic compounds in commercial tequila*. European Food Research and Technology, 2009. **228**(6): p. 951-958.
33. Muñoz-Muñoz, A.C., et al., *Development and validation of a High Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detection method for the determination of aging markers in tequila*. Journal of Chromatography A, 2008. **1213**(2): p. 218-223.
34. Ceballos-Magaña, S.G., et al., *Geographical authentication of tequila according to its mineral content by means of support vector machines*. Food Analytical Methods, 2012. **5**(2): p. 260-265.

35. Aguilar-Cisneros, B.O., et al., *Tequila authenticity assessment by headspace SPME-HRGC-IRMS analysis of  $^{13}C/^{12}C$  and  $^{18}O/^{16}O$  ratios of ethanol*. Journal of agricultural and food chemistry, 2002. **50**(26): p. 7520-7523.
36. López, M.G. and J.P. Dufour, *Tequilas: charm analysis of blanco, reposado, and añejo tequilas*. 2001, ACS Publications.
37. Caldeira, M., et al., *Comparison of two extraction methods for evaluation of volatile constituents patterns in commercial whiskeys: Elucidation of the main odour-active compounds*. Talanta, 2007. **74**(1): p. 78-90.
38. Zhang, B., et al., *A review of polyphenolics in oak woods*. International journal of molecular sciences, 2015. **16**(4): p. 6978-7014.
39. da Silva, A.A., et al., *Coumarins and phenolic fingerprints of oak and Brazilian woods extracted by sugarcane spirit*. Journal of separation science, 2009. **32**(21): p. 3681-3691.
40. Caldeira, I., et al., *Sensory and chemical modifications of wine-brandy aged with chestnut and oak wood fragments in comparison to wooden barrels*. Analytica chimica acta, 2010. **660**(1): p. 43-52.
41. Zhao, Y., et al., *Comparison of volatile compounds in two brandies using HS-SPME coupled with GC-O, GC-MS and sensory evaluation*. S. Afr. J. Enol. Vitic, 2011. **32**(1): p. 9-20.
42. Aznar, M., et al., *Identification and quantification of impact odorants of aged red wines from Rioja. GC- Olfactometry, quantitative GC-MS, and odor evaluation of HPLC fractions*. Journal of agricultural and food chemistry, 2001. **49**(6): p. 2924-2929.
43. Watanabe, T., et al., *Micellar electrokinetic chromatography as an alternative to high-performance liquid chromatography for separation and determination of phenolic compounds in Japanese spirituous liquor*. Journal of Chromatography A, 1998. **793**(2): p. 409-413.
44. Martí, M.P., et al., *Solid-phase microextraction and gas chromatography olfactometry analysis of successively diluted samples. A new approach of the aroma extract dilution analysis applied to the characterization of wine aroma*. Journal of agricultural and food chemistry, 2003. **51**(27): p. 7861-7865.
45. Moreira, N., et al., *Influence of packaging and aging on the red wine volatile composition and sensory attributes*. Food Packaging and Shelf Life, 2016. **8**: p. 14-23.
46. Delahunty, C.M., G. Eyres, and J.P. Dufour, *Gas chromatography-olfactometry*. Journal of Separation Science, 2006. **29**(14): p. 2107-2125.
47. Grosch, W., *Determination of potent odourants in foods by aroma extract dilution analysis (AEDA) and calculation of odour activity values (OAVs)*. Flavour and Fragrance Journal, 1994. **9**(4): p. 147-158.
48. Spranger, M.I., et al., *Differentiation of red winemaking technologies by phenolic and volatile composition*. Analytica Chimica Acta, 2004. **513**(1): p. 151-161.
49. Cerdán, T.G. and C. Ancín-Azpilicueta, *Effect of oak barrel type on the volatile composition of wine: Storage time optimization*. LWT-Food Science and Technology, 2006. **39**(3): p. 199-205.
50. Vera Guzmán, A.M., P.A. Santiago García, and M.G. López, *Compuestos volátiles aromáticos generados durante la elaboración de mezcal de Agave angustifolia y Agave potatorum*. Revista fitotecnia mexicana, 2009. **32**(4): p. 273-279.
51. Bortoletto, A.M. and A.R. Alcarde, *Congeners in sugar cane spirits aged in casks of different woods*. Food chemistry, 2013. **139**(1): p. 695-701.

52. Branco de MIRANDA, M., et al., *Perfil físico-químico de aguardente durante envelhecimento em tonéis de carvalho*. Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2008. **28**(1).
53. Parazzi, C., et al., *Avaliação e caracterização dos principais compostos químicos da aguardente de cana-de-açúcar envelhecida em tonéis de carvalho (Quercus sp.)*. Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2008. **28**(1).
54. Cardeal, Z., et al., *Comprehensive two-dimensional gas chromatography for fingerprint pattern recognition in cachaça production*. Talanta, 2008. **74**(4): p. 793-799.
55. López-Vázquez, C., et al., *Fast determination of principal volatile compounds in distilled spirits*. Food Control, 2010. **21**(11): p. 1436-1441.
56. Nikićević, N., et al., *The effects of the cherry variety on the chemical and sensorial characteristics of cherry brandy*. Journal of the Serbian Chemical Society, 2011. **76**(9): p. 1219-1228.
57. López-Ramírez, J., et al., *Physicochemical quality of tequila during barrel maturation. A preliminary study*. CyTA-Journal of Food, 2013. **11**(3): p. 223-233.
58. Chilla, C., et al., *Automated on-line-solid-phase extraction—high-performance liquid chromatography-diode array detection of phenolic compounds in sherry wine*. Journal of Chromatography A, 1996. **750**(1-2): p. 209-214.
59. Vanbeneden, N., F. Delvaux, and F.R. Delvaux, *Determination of hydroxycinnamic acids and volatile phenols in wort and beer by isocratic high-performance liquid chromatography using electrochemical detection*. Journal of Chromatography A, 2006. **1136**(2): p. 237-242.
60. Proestos, C., et al., *High performance liquid chromatography analysis of phenolic substances in Greek wines*. Food Control, 2005. **16**(4): p. 319-323.
61. Pozo-Bayón, M.Á., et al., *Study of low molecular weight phenolic compounds during the aging of sparkling wines manufactured with red and white grape varieties*. Journal of agricultural and food chemistry, 2003. **51**(7): p. 2089-2095.
62. Arroyo, Y.R.R., et al., *Natural Decrease of Dissolved Arsenic in a Small Stream Receiving Drainages of Abandoned Silver Mines in Guanajuato, Mexico*. Bulletin of environmental contamination and toxicology, 2013. **91**(5): p. 539-544.
63. *METHOD 8000C DETERMINATIVE CHROMATOGRAPHIC SEPARATIONS*. 2003.
64. Benn, S. M., & Peppard, T. L. (1996). Characterization of tequila flavor by instrumental and sensory analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **44**(2), 557-566.
65. García, B., *Uso de cromatografía de gases con detector másico para la determinación de ftalatos en muestras medioambientales y en alimentos*. Master's thesis, Universidad de Guanajuato, 2016.
66. A.I. Ruiz-Matute, O. Herandez-Hernandez, S. Rodriguez-Sanchez, M.L. Sanz, I. Martinez-Castro, "Derivatization of carbohydrates for Gc ad GC-MS analysis", *J. Chromatogr. B*, 2011, 879, 1226-124