



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA

EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS DEL MEZCAL DE DURANGO PARA EL DESARROLLO DE UN ÍNDICE DE CALIDAD

TESIS

Que como requisito parcial para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS

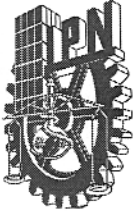
Presenta

José Antonio Ávila Reyes

Directores de tesis

Dra. Norma Almaraz Abarca

Dr. Gustavo Valencia del Toro



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México, D.F. siendo las 14:00 horas del día 27 del mes de Abril del 2010 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de UPIBI-IPN para examinar la tesis titulada:

EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS DEL MEZCAL DE DURANGO
PARA EL DESARROLLO DE UN ÍNDICE DE CALIDAD

Presentada por el alumno:

ÁVILA

Apellido paterno

REYES

Apellido materno

JOSÉ ANTONIO

Nombre(s)

Con registro:

B	0	7	2	0	6	2
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de: DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

DR. GISTAVO VALENCIA DEL TORO

DRA. NORMA ALMARAZ ABARCA

DR. ENRIQUE DURÁN PÁRAMO

DR. FABIÁN ROBLES MARTÍNEZ

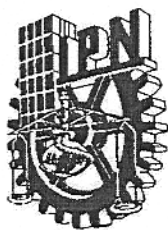
DR. RAMÓN VILLANUEVA ARCOS

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES



DR. EDGAR SALGADO MANABREZ

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD PROFESIONAL
DISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACION



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D. F., el día 17 del mes de mayo del año 2010, el (la) que suscribe José Antonio Ávila Reyes, alumno (a) del Programa de Doctorado en Bioprocesos, con número de registro B072062, adscrito a la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dra. Norma Almaraz Abarca y el Dr. Gustavo Valencia Del Toro y cede los derechos del trabajo intitulado "Desarrollo de un Índice de Calidad para el Mezcal de Durango", al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: jaavre@yahoo.com.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.



José Antonio Ávila Reyes
Nombre y firma

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Durango (CIIDIR-IPN-Durango) y en el Laboratorio de Cultivos Celulares de la Sección de Estudios de Posgrado de la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología del Instituto Politécnico Nacional (UPIBI), con la dirección de la Dra. Norma Almaraz Abarca y el Dr. Gustavo Valencia del Toro, y con apoyo brindado por el CONACYT a través de los proyectos CB-2006-60664 y CB-2008-105683, cuyos responsables son la Dra. Norma Almaraz Abarca y el Dr. Gustavo Valencia del Toro, respectivamente. Asimismo, se agradece el apoyo brindado por la SIP del IPN a través del proyecto 20100740 que dirige el Dr. Gustavo Valencia del Toro.

CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS	IV
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
ÍNDICE DE ANEXOS	IX
RESUMEN	X
ABSTRACT	XI
PRESENTACIÓN	XII
1. ANTECEDENTES	1
1.1 Aspectos botánicos del género <i>Agave</i>	1
1.2 La industria del mezcal en México	3
1.3 Regulación de la calidad de bebidas alcohólicas	15
1.4 Parámetros de control de calidad para la elaboración de mezcal	16
1.4.1 Comportamiento espectral del mezcal	16
1.4.2 Compuestos orgánicos: aldehídos y cetonas	17
1.4.3 Composición de metales	18
1.4.4 Compuestos fenólicos	19
1.4.5 Los fenoles de la madera	24
1.4.6 Relación estructura-actividad antioxidante de los fenoles	25
2. JUSTIFICACIÓN	27
3. OBJETIVO GENERAL	28
4. MATERIALES Y MÉTODOS	29
4.1 Muestras de mezcal	29
4.2 Determinación de los espectros de absorción UV-Vis	29
4.3 Determinación de la composición de aldehídos y cetonas	30
4.4 Determinación de metales	31
4.5 Composición fenólica	32
4.5.1 Fenoles totales	32
4.5.2 Perfiles fenólicos	32
4.6 Capacidad antioxidante	33
4.7 Análisis estadístico	33

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
5.1 Comportamiento espectral UV/Vis	34
5.2 Compuestos orgánicos: aldehídos y cetonas	39
5.3 Presencia de metales	48
5.4 Composición fenólica	51
5.4.1 Contenido de fenoles totales	51
5.4.2 Análisis de HPLC/DAD	55
5.5 Capacidad antioxidante	59
5.6 Tipificación química del mezcal de Durango	63
6. CONCLUSIONES	65
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
8. ANEXOS	81

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Precisión del análisis espectral para el mezcal de <i>A. durangensis</i>	37
Tabla 2. Aldehídos y cetonas detectados en el mezcal de Durango	40
Tabla 3. Concentración (mg/L) de derivados cetónicos y aldehídicos del mezcal de la Barrica 1 a diferentes tiempos de reposo	41
Tabla 4. Concentración (mg/L) de derivados cetónicos y aldehídicos del mezcal de la Barrica 4 a diferentes tiempos de reposo	42
Tabla 5. Concentración (mg/L) de derivados cetónicos y aldehídicos del mezcal de la Barrica 7 a diferentes tiempos de reposo	42
Tabla 6. Comparación de las concentraciones de derivados cetónicos y aldehídicos del mezcal de Durango almacenado en tres diferentes barricas	47
Tabla 7. Concentraciones de As, Pb, Cd, Cu, Fe y Zn presentes en las diferentes muestras de mezcal	49
Tabla 8. Concentración de fenoles totales en mezcal reposado en tres diferentes barriles	51
Tabla 9. Análisis de varianza de dos factores de los resultados de los contenidos de fenoles totales de muestras de mezcal reposados en diferentes barricas durante intervalos variables de tiempo	52
Tabla 10. Análisis de Duncan de discriminación de medias para los valores de las concentraciones de fenoles totales de las muestras de mezcal reposadas en diferentes barricas	52
Tabla 11. Prueba <i>a posteriori</i> de Duncan para la discriminación de medias del contenido de fenoles entre las barricas de reposo	53

Tabla 12. Análisis de Duncan de discriminación de medias para los valores de las concentraciones de fenoles totales de las muestras de mezcal reposadas en diferentes barricas durante intervalos variables de tiempo	54
Tabla 13. Principales compuestos fenólicos encontrados en el mezcal de Durango reposado en barriles de madera de encino	55
Tabla 14. Actividad bloqueadora de radicales libres de los compuestos de referencia	59
Tabla 15. Actividad bloqueadora de radicales libres del mezcal de Durango, a diferentes tiempos de reposo	61
Tabla 16. Análisis de varianza de dos factores de la actividad antioxidante (CE_{50}) de las muestras de mezcal almacenadas en diferentes barricas durante intervalos variables de tiempo	62
Tabla 17. Análisis de Duncan de discriminación entre medias para los valores de actividad antioxidante (CE_{50}) de las muestras de mezcal almacenados en diferentes barricas	62
Tabla 18. Tipificación química del mezcal de Durango	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Agave durangensis</i> de Sierra de Registro, Durango	3
Figura 2. Planta procesadora de mezcal de Nombre de Dios, Durango, México (Fotografía: Vicente Hernández Vargas)	7
Figura 3. Inflorescencia joven en planta de maguey (izquierda), que es desprendida (derecha) como preparación de la planta antes del jimado (tomado de Valenzuela-Ruíz y col., 2003)	8
Figura 4. Dos etapas del proceso de jimado de plantas de <i>Agave durangensis</i> en el Estado de Durango (Fotografía: Vicente Hernández Vargas)	8
Figura 5. Piñas de <i>Agave durangensis</i> listas para transportarse a la planta destiladora (Fotografía: Vicente Hernández Vargas)	9
Figura 6. Piñas de <i>Agave durangensis</i> partidas y listas para cocerse en autoclaves de acero inoxidable (Fotografía: Vicente Hernández-Vargas)	10
Figura 7. Molinos utilizados en Tamazula, Durango para la molienda de piñas de agave (tomado de Valenzuela-Ruiz y col., 2003)	11
Figura 8. Prensa para triturar las piñas cocidas de agave de la planta destiladora de Nombre de Dios, Durango (Fotografía: Vicente Hernández Vargas)	11
Figura 9. Tanque fermentador de acero inoxidable de la planta procesadora de Nombre de Dios (Fotografía: Vicente Hernández Vargas)	12
Figura 10. Alambiques rústicos utilizados en Tamazula (izquierda) y Nombre de Dios (derecha), Durango (tomado de Valenzuela-Ruíz y col., 2003)	13
Figura 11. Alambique de serpentín (tomado de Valenzuela-Ruíz y col., 2003)	13
Figura 12. Destiladores de acero inoxidable de la planta procesadora de Nombre de Dios (Fotografía: Vicente Hernández Vargas)	14

Figura 13. Estructura básica de los flavonoides	20
Figura 14. Estructura básica de a) flavonas y b) flavonoles	21
Figura 15. Estructuras básicas de a) flavanonas, b) dihidroflavonoles, c) dihidrochalconas, d) flavanos y e) flavanoles	22
Figura 16. Estructura básica de las antocianinas	23
Figura 17. Estructura básica de los isoflavonoides	24
Figura 18. Espectros de absorción de muestras de mezcal de <i>A. durangensis</i> , a diferentes tiempos de almacenamiento en la barrica 1	34
Figura 19. Espectros de absorción de muestras de mezcal de <i>A. durangensis</i> , a diferentes tiempos de reposo en la barrica 4	34
Figura 20. Espectros de absorción de muestras de mezcal de <i>A. durangensis</i> , a diferentes tiempos de reposo en la barrica 7	35
Figura 21. Espectros de absorción de muestras de mezcal joven elaborado a partir de <i>A. durangensis</i> , en La Constancia, Durango	35
Figura 22. Espectros de absorción de muestras de mezcal joven elaborado a partir de <i>A. durangensis</i> , en la Planta Destiladora de Nombre de Dios, Durango	36
Figura 23. Correlación entre el tiempo de reposo y los valores de $A_{277\text{ nm}}$ del mezcal de la barrica 1	38
Figura 24. Correlación entre el tiempo de reposo y los valores de $A_{277\text{ nm}}$ del mezcal de la barrica 4	38
Figura 25. Correlación entre el tiempo de reposo y los valores de $A_{277\text{ nm}}$ del mezcal de la barrica 7	39
Figura 26. Correlación entre la edad de reposo del mezcal de la barrica 1 y la concentración del compuesto 4	43
Figura 27. Correlación entre la edad de reposo del mezcal de la barrica 4 y la concentración del compuesto 4	44
Figura 28. Correlación entre la edad de reposo del mezcal de la barrica 7 y la concentración del compuesto 4	44
Figura 29. Comportamiento de la concentración	

de derivados aldehídicos y cetónicos a lo largo del tiempo de reposo de la barrica 1	45
Figura 30. Comportamiento de la concentración de derivados aldehídicos y cetónicos a lo largo del tiempo de reposo de la barrica 4	46
Figura 31. Comportamiento de la concentración de derivados aldehídicos y cetónicos a lo largo del tiempo de reposo de la barrica 7	47
Figura 32. Comportamiento independiente de la concentración de fenoles totales en cada barrica, mostrando una tendencia similar en cada una	53
Figura 33. Flavonoides detectados en el mezcal de Durango	57
Figura 34. Ácidos fenólicos encontrados en el mezcal de Durango	58
Figura 35. Desaparición del radical libre DPPH* en la presencia de concentraciones incrementadas de fenoles en alícuotas del mezcal del barril 1, a los 131 días de reposo	61

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Valores de absorbancia de 10 repeticiones a 10 longitudes de onda elegidas	81
Anexo 2. Espectros UV/Vis de los estándares y de cada uno de los derivados cetónicos y aldehídicos encontrados en las muestras del mezcal de Durango	82
Anexo 3. Cromatogramas de las muestras de mezcal analizadas por sus derivados cetónicos y aldehídicos a diferentes tiempos de reposo	90
Anexo 4. Concentraciones de fenoles (mg/L) en el mezcal de Durango a diferentes tiempos de reposo en barricas de madera de encino blanco	99

RESUMEN

La elaboración de mezcal a partir de *Agave durangensis* es una actividad con un importante potencial de desarrollo económico para Durango. Este estado cuenta con una denominación de origen para esa bebida desde 1994, y la regulación de elaboración y almacenamiento de ese destilado está regida por Norma Oficial Mexicana NOM-070-SCFI-1994-Bebidas Alcohólicas-Mezcal. La regulación de las propiedades del mezcal, contempladas en esa norma, se refiere a la cantidad de etanol y metanol presentes en sus diferentes formas comerciales. Sin embargo, existen otras propiedades químicas que contribuyen a definir el aroma y el sabor, que también pueden ser reguladas y que en conjunto caracterizan un estándar de calidad para el mezcal de Durango, además esas propiedades pueden servir como referencia para la detección de adulteraciones y para confirmaciones de autenticidad. Definiciones de los valores de diferentes propiedades químicas de otras bebidas alcohólicas destiladas o no, como el vino, el whisky, el coñac y el tequila, han sido desarrolladas con el fin de mantener un estricto control de calidad, que influye en mantener la preferencia de los consumidores y por lo tanto, en el bienestar económico de los productores. En este estudio se determinaron las siguientes propiedades químicas del mezcal joven y reposado, elaborado en la planta destiladora del municipio de Nombre de Dios, Durango, México: comportamiento espectral, composición de aldehídos y cetonas, composición de metales, composición de compuestos fenólicos, y propiedad antioxidante. La toma de muestras se realizó de acuerdo a la NOM-070-SCFI-1994-Bebidas Alcohólicas-Mezcal. Para definir el comportamiento espectral, las muestras de mezcal se sometieron a análisis de barridos espectrofotométricos en el intervalo UV-Visible. La composición de aldehídos y cetonas se realizó por un método de HPLC/DAD, previa derivatización de esos compuestos a sus formas de 2,4-dinitrofenilhidrazinas. La determinación de la composición de metales se realizó por un método de espectrometría de absorción atómica por horno de grafito o por flama. La determinación de los compuestos fenólicos presentes en los destilados se realizó también por HPLC/DAD, empleando un método en gradiente, y los niveles de potencial antioxidante se estimaron por el método de bloqueo del radical libre DPPH*. Los resultados obtenidos permiten definir un perfil químico para el mezcal de Durango que puede ser empleado para tipificar esta bebida, determinar la autenticidad de muestras comerciales y como parámetros de referencia para la detección de adulteraciones.

ABSTRACT

The manufacture of mescal from *Agave durangensis* is an activity with an important potential of development for Durango. This State has an origin denomination statement for mescal since 1994, and the regulation of manufacture and storage are regulated by a Mexican Official Norm. The regulation of mescal properties included in that Norm deal with the ethanol and methanol levels of mescal. However, other chemical properties, contributing to the odor and savor, can be regulated and along together can also define a quality standard for the mescal of Durango. Those properties can be used as reference to detect adulterations and confirmate the authenticity. Definitions of the values of several chemical properties of other alcoholic beverages like wine, whisky, cognac, and tequila have been developed with the aim of maintaining the customer preferences and, then, the economical status of producers. In this study the following chemical properties of young and aged mescal from Nombre de Dios, Durango, were defined: spectral behavior, composition of aldehydes and ketones, metal composition, phenol composition, and antioxidant capacity. The sampling was done according to the NOM-070-SCFI-1994-Bebidas Alcohólicas-Mezcal. The spectral behavior was defined by UV-Vis scanning. The composition of aldehydes and ketones was analyzed by the derivatization of their corresponding 2, 4-dinitrophenylhydrazines and these detected by HPLC/DAD. The metals were detected by atomic absorption spectrometry of graphite oven or flame. The phenol composition was defined by a gradient method of HPLC/DAD, and the antioxidant properties were estimated by the free radical scavenging (DPPH*) method. The results may define the chemical profile for the mescal of Durango, which can be used to typify this beverage, determine the authenticity of commercial samples, and be used as reference to detect adulterations.

PRESENTACIÓN

El hombre es un componente más del conjunto de los seres vivos y, mientras no se demuestre lo contrario, el ser vivo que desempeña el papel más impactante entre los diferentes elementos del ecosistema llamado Tierra.

El proceso de vida de las especies es un condicionamiento constante caracterizado por el medio en el que se desarrollan y, a su vez, condicionantes recíprocos de los componentes bióticos y abióticos que los rodean.

Ejemplo de lo anterior son los rasgos culturales de los diferentes grupos humanos que en su proceso de vida incorporan, como solución a sus necesidades físicas, psicológicas, sociales y estéticas, los elementos materiales vegetales y animales que existen a su alrededor.

La uva, el arroz, la cebada, los frutos de las palmas, la manzana y otros frutos y granos más, fueron fuente de bebidas alcohólicas en todos los continentes, bebidas que se consiguieron a partir de eventos empíricos y que generalmente se usaron en ritos y ceremonias religiosas y místicas en principio, incorporándose después a la dieta normal de los humanos.

En los grupos humanos que poblaron la América prehispánica, la búsqueda o hallazgo de frutos, semillas y plantas con cantidades significativas de azúcares entre sus componentes, fue una labor común. El maíz y la miel de abejas fueron fuente de bebidas alcohólicas, pero más importante en este rubro fueron diferentes especies de magueyes de cuyos jugos se elaboró la bebida hoy llamada “pulque”.

De hecho, los magueyes fueron plantas tan versátiles que pudieron transformarse en útiles tan variados como material de construcción, combustible, instrumentos domésticos, ropas y hasta plantas gestoras de divinidades.

Igual que en otras partes del mundo, el consumo del pulque se limitó solo a los protagonistas de las ceremonias religiosas. Una vez consumada la conquista, desaparecida la estructura sacerdotal autóctona, el pulque se convirtió en bebida popular que, en el siglo XIX y hasta los años 60 y 70 del siglo XX, fue un gran negocio para los estados del centro del país, principalmente Hidalgo, Tlaxcala, Morelos, Puebla, Estado de México y Distrito Federal.

Esta bebida producto de la fermentación de la savia del maguey, ha sido desplazada del papel importante que tenía en la cultura mexicana, por otra que también se origina del mismo tipo de plantas y que ha recibido el nombre de “mezcal”, derivado del nombre de una de las partes del maguey.

En diferentes investigaciones de tipo antropológico se ha discutido cuándo y cómo se conoció el mezcal. Al parecer el proceso de fabricación de esta bebida no es de origen americano ni europeo, pero sí se tienen evidencias de similitudes entre el sistema de fabricación de alcohol a partir del coco, que se conocía en Filipinas, y el que se sigue para producir el mezcal.

Este conocimiento llega a las costas del Pacífico mexicano en la Nao de China, nave que hacía la ruta entre la Nueva España y las Filipinas, por lo que el llamado mezcal surge en el occidente del país y de ahí se extiende al resto del territorio.

En Jalisco la actividad mezcalera se ubica en forma notable en la región de Tequila, población que años después da su nombre al mezcal local y hoy se reconoce en su título de denominación de origen. Cabe decir que a partir del siglo XX el tequila tiene una gran escalada comercial y se internacionaliza su consumo a tal grado que produce un alto impacto económico en los estados que pueden hacer uso de la denominación de origen y por lo tanto se les permite el cultivo del agave azul.

Con menor intensidad pero siempre representando una importante fuente de ingresos, el mezcal se sigue produciendo en varios estados del país. Oaxaca, Guerrero, San Luis Potosí, Zacatecas y Durango, son entidades en donde esta actividad tiene importancia económica potencialmente significativa.

En Durango la fabricación del mezcal ha sido una actividad muy localizada en cuatro municipios: Tamazula, Mezquital, Nombre de Dios y Durango. En ellos la materia prima es el *Agave durangensis* y algunos taxa no determinados, plantas que tradicionalmente han sido colectadas de las poblaciones silvestres, con lo que se ha mantenido una actividad artesanal.

A partir de los años 90 del siglo pasado, la producción de mezcal en Durango ha crecido y ha propiciado tomar medidas tanto en el aspecto ambiental como en el proceso técnico de producción. En lo ambiental se han dictado medidas para proteger las poblaciones silvestres en el estado, regulando su explotación lo que ha motivado que muchos campesinos empiecen a dedicar sus tierras al cultivo de estas plantas.

A la fecha se cuenta ya con plantaciones desde 1 a 9 años de edad, lo que permite la permanencia de poblaciones naturales en buen estado y la aportación de material homogéneo al proceso de fabricación.

En el aspecto de transformación, la producción de mezcal se ha modernizado. La intervención de científicos y técnicos ha logrado escalar la producción mezcalera del Estado, con un ejercicio integral cuyo aspecto característico es la mecanización del proceso productivo para optimizar los recursos y garantizar la calidad del producto.

En este último aspecto se inscribe este trabajo.

Después de la gestión de personal del CIIDIR IPN Durango y de grupos de ejidatarios del Municipio de Nombre de Dios, se logró la construcción de una planta productora de mezcal con un nivel técnico moderno. Los pasos siguientes se han dado en el sentido de garantizar un nivel de calidad constante del producto.

A la fecha se ha estandarizado la calidad de la materia prima y se ha logrado la transformación del producto en forma controlada y constante en cada fase del proceso y ahora se busca que el valor agregado del producto primario también alcance estándares de calidad, siempre con referencia a normas oficiales nacionales y a procesos iguales de productos extranjeros, buscando los elementos particulares de la elaboración que sean constantes y que puedan configurar el sello característico, en este caso del mezcal reposado del Estado de Durango.

Para lo anterior el estudio comprende una búsqueda bibliográfica que encuadra el problema, el objetivo y la metodología. Ésta se implementó de acuerdo a las técnicas usuales para identificar los componentes fenólicos de manera que se pudiera proponer un perfil propio de este mezcal, aunado a la cuantificación de metales en una propuesta de caracterización del mezcal duranguense y su control de calidad.

Al respecto se utilizaron como parámetros dos normas oficiales mexicanas; la NOM-070-SCFI-1994-Bebidas Alcohólicas-Mezcal-Especificaciones y la NOM-117-SSA1-1994-Bienes y Servicios, Método de Prueba para la Determinación de Calcio, Arsénico, Plomo, Estroncio, Cobre, Fierro, Zinc y Magnesio en alimentos, agua potable y agua purificada para consumo humano, dado que el mezcal es la combinación de ambos.

La propuesta principal va en la dirección de iniciar una proposición de modificación de la NOM-070-SCFI-1994-Bebidas Alcohólicas-Mezcal, para ampliar y hacer más específicas las determinantes de esta bebida, lo que constituye el objetivo trascendente. En todo caso los resultados pueden constituir por si mismos una propuesta inicial para una NOM específica para el mezcal de Durango.

Por último, los resultados del trabajo serán referencia en la creación de alternativas económicas necesarias en el aparato productivo de Durango, cumpliendo con la exigencia de sustentabilidad ambiental y calidad del producto.

1. ANTECEDENTES

1.1 Aspectos botánicos del género *Agave*

La relevancia actual de varias especies de *Agave* se ha incrementado debido al aumento en la demanda de bebidas alcohólicas como el tequila y el mezcal (Valenzuela-Ruiz y col., 2003) y en la demanda de fuentes potenciales de prebióticos (López y col., 2003). El mezcal de Durango se elabora fundamentalmente a partir de individuos de *Agave durangensis* recolectados de sus poblaciones naturales. Dada la importancia de esta especie como un recurso natural para el desarrollo de la industria mezcalera en ese Estado, se presenta a continuación información sobre algunos de sus aspectos biológicos.

El género *Agave* pertenece a la familia Agavaceae, la cual es endémica de América. La distribución geográfica de esta familia abarca desde el sur de Canadá hasta el norte de Sudamérica (García-Mendoza y Galván, 1995). La familia Agavaceae alcanza los máximos niveles de riqueza y diversidad en México, por lo que este país se considera su centro de origen (García-Mendoza, 1995).

La delimitación de la familia Agavaceae ha sido tema de debate desde su creación por Endlicher (1836-1840); por un lado, con respecto al número de géneros incluidos en ella, que han variado desde cinco (*Yucca*, *Agave*, *Furcraea*, *Littaea*, *Manfreda* y *Polianthes* (Salisbury, 1866) hasta 19 (Hutchinson, 1934); y por otro, con respecto a la ubicación de los géneros, los de ovario ínfero en la familia Amaryllidaceae, y los de ovario súpero en la familia Liliaceae (Pax y Hoffman, 1930). Actualmente, con base en caracteres citológicos, morfológicos, químicos, biogeográficos (Dahlgren y col., 1985) y moleculares (Eguiarte y col., 1994; Bogler y Simpson, 1995), se reconoce a la familia Agavaceae como tal y se le divide en dos subfamilias: Yuccoideae y Agavoideae. La subfamilia Yuccoideae incluye dos géneros de ovario súpero: *Yucca* y *Hesperaloë*; y la subfamilia Agavoideae incluye, de acuerdo a García-Mendoza y Galván (1995), ocho géneros de ovario ínfero: *Agave*, *Beschorneria*, *Furcraea*, *Manfreda*, *Polianthes*, y *Prochnyanthes*, pero de acuerdo a Rocha y col. (2006), además de los anteriores, también se incluye al género *Hesperoyucca*.

De las 293, según Good-Ávila y col. (2006) o 300 especies de acuerdo a Rocha y col. (2006) reconocidas para la familia Agavaceae, en México se encuentran 217 y 258 taxa, si se consideran las categorías infraespecíficas (García-Mendoza y Galván, 1995).

Los elementos de la familia Agavaceae crecen, de manera natural, principalmente en las zonas áridas y semiáridas del Continente Americano. Las características que

unifican a los miembros de esta familia son el arreglo de roseta de las estructuras foliares; un número cromosómico básico de 30, con 5 cromosomas grandes y 25 pequeños (Rocha y col., 2006); semillas conteniendo fitomelano, que les da la pigmentación negra; flores grandes bisexuales; y frutos triloculares con más de dos óvulos (García-Mendoza y Galván, 1995).

El género *Agave* es quizá el más conocido de la familia Agavaceae, debido a las importantes relaciones etnobotánicas que se han originado entre sus elementos y las diversas culturas del continente Americano (Gentry, 1982; Granados-Sánchez, 1999). Este género es también el más grande de la familia, incluye aproximadamente 166 especies (Good-Ávila y col., 2006; Rocha y col., 2006), de las cuales 125 se encuentran en México, lo que convierte a este país en el de mayor riqueza y diversidad de especies de *Agave*.

Dentro de México, los estados con mayor diversidad de especies del género *Agave* son Oaxaca con 32 especies, Puebla con 31, Sonora con 30, Durango con 24, y San Luís Potosí con 23 (García-Mendoza y Galván, 1995).

Debido a su importancia económica en la sustentación de una industria regional de elaboración de mezcal, una de las principales especies de *Agave* en el Estado de Durango es *Agave durangensis*. Esta especie pertenece a la sección Ditepalae, la cual se caracteriza por incluir, de acuerdo a Gentry (1982), plantas de pequeñas a grandes, con rosetas glaucas brillantes, productoras de semillas (existen especies de *Agave* que no producen semillas y su reproducción es básicamente vegetativa), con hojas firmes a rígidas, con panículas generalmente abiertas; yemas florales generalmente rojizas, flores maduras amarillas; tépalos dimórficos, los externos más grandes y sobreponiendo los internos, generalmente rojos en la punta.

La descripción que da Gentry (1982) para *Agave durangensis* se presenta a continuación (Figura 1). Plantas medianas a grandes, de 80 a 120 cm de altura y 120 a 180 cm de cobertura; individuales o cespitosas; de color gris glauco; hojas anchas de dimensiones 40 a 90 x 14 a 22 cm, lanceoladas, con dientes prominentes de 1 a 2 cm de largo, separados por 1 a 2 cm, con espina de 4 a 6 cm de largo, acanalada en la parte superior; inflorescencia de 7 a 8 m de altura; flores de 60 a 80 mm de largo, amarillas, los tépalos externos de 10 a 12 mm de longitud, los internos más pequeños; cápsulas de 4.5 a 6 x 1.6 a 1.8 cm, oblongas; semillas pequeñas. Gentry (1982) describió esta especie a partir de un ejemplar colectado en la Sierra de Registro, aproximadamente 20 Km al SE de la Ciudad de Durango, por lo que esa es la localidad tipo. Dentro de sus poblaciones naturales y por sus características morfológicas vegetativas, *A. durangensis* puede confundirse con otras especies de

secciones diferentes de *Agave*, como con *A. scabra*, de la sección *Americanae*, que crece en la misma región.



Figura 1. *Agave durangensis* de Sierra de Registro, Durango

A. durangensis es una especie muy variable en tamaño, color de la hoja, tamaño de los dientes. Esta variabilidad puede ser explicada por su sistema de reproducción, fundamentalmente sexual, en el que la hibridización interespecífica juega un papel importante (Gentry, 1982).

1.2 La industria del mezcal en México

Antes de que el maíz se constituyera como el alimento esencial, los agaves fueron la principal fuente de carbohidratos para las culturas nativas americanas (Zizumbo-Villareal y Colunga-GarcíaMarín, 2008). Evidencias de su consumo han sido encontradas en las cuevas de Guilá Naquitz, en Oaxaca, México, como desechos de

hojas cocidas masticadas, con una antigüedad de 9000 años antes de Cristo (Smith Jr., 1986). A partir de las diferentes especies de *Agave*, esas culturas comenzaron a elaborar diversas bebidas alcohólicas. Su elaboración se llevó a cabo por procesos diferentes en el oeste y en el centro de México. En el oeste, los tallos y pedúnculos florales eran cocidos previamente a la fermentación, mientras que en el centro se elaboraban a partir de savia fresca obtenida del pedúnculo floral (Parson y Darling, 2000).

Las bebidas alcohólicas destiladas elaboradas a partir de alguna especie de *Agave* recibieron el nombre genérico de mezcal. Algunos autores como Bourke (1983) y Lumholtz (1986) sugirieron que el proceso de destilación había sido desarrollado y utilizado por las culturas precolombinas de México. Sin embargo, de acuerdo a Zizumbo-Villareal y Colunga-GarcíaMarín (2008), no existe evidencia ni arqueológica ni histórica que apoye esa afirmación. Varios autores consideran que el uso de la destilación para la elaboración de bebidas alcohólicas fue posterior a la llegada de los europeos a México. Algunos de ellos, como Bruman (1944), propone que el proceso de destilación en México tiene su origen en la técnica filipina de elaboración de bebidas alcohólicas a partir de coco (*Cocos nucifera*), que se introdujo en México a finales del siglo XVI, en el Estado de Colima. Otros, como Valenzuela-Zapata y Nabhan (2003) proponen un origen distinto, a principios del siglo XVII, en el Valle de Tequila, Jalisco, basado en la tecnología árabe de destilación usada para elaborar ron a partir de caña de azúcar.

Zizumbo-Villareal y Colunga-GarcíaMarín (2008) realizaron un trabajo en el que consideraron evidencias botánicas, arqueológicas, etnohistóricas, y lingüísticas, para proponer que la elaboración de mezcal en México comenzó con la utilización de *Agave angustifolia*, con una técnica basada en la destilación de fermentado de coco, después de 1580, que utilizaba gente filipina asentada en Colima y que fue aprendida y aplicada por los indígenas a bebidas fermentadas previamente conocidas por ellos, tales como las hechas de *Agave*.

La producción de mezcal se convirtió en una actividad económicamente importante en México a partir del siglo XVII, de tal manera que en el centro y occidente numerosas haciendas se dedicaron como actividad principal a su producción (Almaraz, 1984). Sin embargo, como esta bebida competía en preferencia con los vinos importados de España, el gobierno colonial de la Nueva España prohibió la producción y venta de mezcal, lo que llevó a su elaboración clandestina. A mediados del siglo XIX se legalizó su producción y comenzó un incremento en la demanda internacional, principalmente por el mezcal elaborado en la región de Tequila, Jalisco, conocido como tequila, lo que

estimuló la actividad económica asociada a su producción (Valenzuela-Zapata y Nabhan, 2003).

Los diferentes mezcales que se producen en México se diferencian en esencia por la especie de *Agave* empleada en su elaboración y por las características tradicionales que en diferentes regiones del país utilizan para su manufactura. De las diferentes especies de *Agave* que crecen en nuestro país sobresale por su importancia actual en la producción de bebidas alcohólicas *Agave tequilana*. Otras especies de *Agave* son también materia prima adecuada para la producción de ese tipo de bebidas y representan un uso potencial para el desarrollo económico regional, como son los casos de *Agave angustifolia* en Oaxaca (Gentry, 1982), *Agave crassispina* en el Altiplano Potosino (Almaraz, 1984) y *Agave durangensis* en el estado de Durango (Valenzuela-Ruiz y col., 2003).

Oaxaca es la principal entidad productora de mezcal, le siguen en importancia San Luis Potosí, Zacatecas y Durango. En todos esos estados, la producción es en mayor o menor grado irregular, porque a diferencia de lo que ocurre con la industria de la producción del tequila, la materia prima se recolecta a partir de poblaciones silvestres, se carece de infraestructura suficiente y solo constituye una actividad temporal.

Valenzuela-Ruiz y col. (2003) mencionan que de acuerdo con los datos publicados por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, Delegación en el estado de Oaxaca, Subdelegación de Planeación y Desarrollo Rural; Oaxaca en el año agrícola 1999-2000 contaba con 12 650 Ha sembradas de maguey mezcalero; 3 300 Ha cosechadas, obteniendo 205 500 toneladas de planta, con un valor de 257 400 pesos. Los volúmenes de producción anual de mezcal en ese estado, en 1996, fueron 5 875 000 litros, de los cuales 2 250 000 se vendieron envasados y el resto a granel, de los cuales se exportaron 1 860 000 litros a 19 países.

El mezcal obtuvo recientemente por parte de la Organización Mundial de la Propiedad Intelectual, con sede en Ginebra Suiza, la Denominación de Origen (región geográfica que por su medio ambiente elabora un producto con características exclusivas del mismo y se le designa como único productor) la cual comprende los estados de Oaxaca, Guerrero, Durango, San Luis Potosí y Zacatecas. Después de la resolución de la denominación de origen, en 1994 (NOM-070-SCFI-1994), la elaboración de mezcal a partir de *Agave durangensis* retomó importancia en el estado de Durango, principalmente en los municipios de Durango, Nombre de Dios y Mezquital (Valenzuela-Ruiz y col., 2003), que son los del área de distribución geográfica natural de esa especie dentro del estado. En el municipio de Nombre de Dios, existen cuatro vinatas que están integradas por ejidatarios y otras cuatro por grupos familiares. Se estima que con la fabricación del mezcal se benefician directamente 100 familias. La

producción de esas vinatas alcanza los 50 000 litros de mezcal, con un costo promedio por litro de \$30. Ese volumen de mezcal los productores la obtienen a partir de la explotación de poblaciones naturales de *A. durangensis* que ocupan una superficie de aproximadamente 17 000 Ha. Las principales vinatas de Nombre de Dios están ubicadas en los siguientes poblados: una en Tuitán, tres en La Constancia, una en Berros, una en El Venado y dos en Nombre de Dios (Valenzuela-Ruiz y col., 2003). Sin embargo, esa especie de *Agave* podría ser establecida, cultivada y aprovechada en otras regiones de México con condiciones ambientales similares a las requeridas por ella, como lo sugieren los resultados de Ocaña y col. (2007) sobre un estudio de modelación de la distribución espacial mediante algoritmos genéticos y sistemas de información geográfica, en el que reportan a *Agave durangensis* como una de las especies con más alta distribución potencial.

La elaboración de mezcal en las destilerías del Estado de Durango sigue un proceso tradicional que en la actualidad se busca industrializar. Como resultado de esa búsqueda, en el mes de octubre de 2007, se inauguró en el Municipio de Nombre de Dios, una planta destiladora (Figura 2) que cuenta con tanques de cocción, de fermentación y sistemas de destilación modernos, con los que se puede tener un mejor control de la calidad del producto. El establecimiento de esa planta destiladora es en parte el resultado de varios años del trabajo de campo realizado por el personal académico del CIIDIR-Durango, del Instituto Politécnico Nacional, el cual ha insistido además en la concientización de los productores para que establezcan plantaciones de *Agave durangensis*, formadas por material certificado, que sustituyan las prácticas de recolección de plantas de sus poblaciones naturales, como en la actualidad se realiza.



Figura 2. Planta procesadora de mezcal de Nombre de Dios, Durango, México.
(Fotografía: Vicente Hernández Vargas)

El proceso de manufactura del mezcal involucra la cosecha de la piña o corazón del agave, que es el tallo de la planta sin hojas; la cocción de ese tallo para convertir los polisacáridos contenidos, derivados de fructanos (Mancilla-Margalli y López, 2006; Pérez (2008), a una mezcla de azúcares más pequeños (principalmente fructosa y glucosa); la fermentación de esos azúcares; y la doble destilación del fermentado y su dilución. El producto final es incoloro, sin embargo, si se permite madurar por periodos variables de tiempo en barricas (reposado y añejo) adquiere una coloración amarillenta.

Cosecha de la piña.

Para poder cosechar las piñas, las plantas adultas de maguey deben ser previamente “castradas” o “capadas”, esto implica remover la inflorescencia o qurote en cuanto es detectado como primordio (Figura 3).



Figura 3. Inflorescencia joven en planta de maguey (izquierda), que es desprendida (derecha) como preparación de la planta antes del jimado (tomado de Valenzuela-Ruiz y col., 2003)

Cuando las plantas están listas para la elaboración de mezcal se les elimina todas las hojas, proceso llamado jimado o despencado (Figura 4). Cuando a las plantas de *Agave* se les elimina el escapo floral, ocurre una concentración de azúcares en el tallo y se acelera su muerte (Granados-Sánchez, 1999). El periodo que transcurre entre captar las plantas y despencarlas es variable, puede durar varios días o varios meses, dependiendo de un criterio empírico que cada productor establece (Valenzuela-Ruiz y col., 2003).

Al tallo y la base de las hojas que quedan unidas a él se le denomina cabeza o piña y de esa manera es como las plantas son recolectadas en campo (Figura 5).



Figura 4. Dos etapas del proceso de jimado de plantas de *Agave durangensis* en el estado de Durango (Fotografía: Vicente Hernández Vargas)



Figura 5. Piñas de *Agave durangensis* listas para transportarse a la planta destiladora
(Fotografía: Vicente Hernández Vargas)

Cocción

Para la elaboración del mezcal, las piñas de agave tienen que ser partidas y cocidas. Ese proceso de cocción se realiza en un horno, que en los métodos tradicionales, está hecho bajo tierra, pero que en la planta destiladora de Nombre de Dios, Durango, se realiza en una autoclave de acero inoxidable. Este proceso puede durar un período de tres días (Figura 6). Durante la cocción los azúcares se hidrolizan y se forman algunos de los compuestos que contribuyen al aroma y al sabor del mezcal, como los aldehídos (Mancilla-Margalli y López, 2002).



Figura 6. Piñas de *Agave durangensis* partidas y listas para cocerse en autoclaves de acero inoxidable (Fotografía: Vicente Hernández Vargas)

Molienda

Las piñas ya cocidas requieren ser trituradas o molidas para recuperar el jugo en el cual los azúcares se encuentran solubilizados. Este proceso es realizado de diferentes formas según la región del estado de que se trate, con tractores en Tuitán, mediante molinos cañeros en Tamazula (Figura 7), machacadas manualmente con hachas en el ejido el Venado y Nombre de Dios, o en prensas como en la planta destiladora de Nombre de Dios (Figura 8).



Figura 7. Molinos utilizados en Tamazula, Durango para la molienda de piñas de agave (Tomado de Valenzuela-Ruiz y col., 2003)



Figura 8. Prensa para triturar las piñas cocidas de agave de la planta destiladora de Nombre de Dios, Durango (Fotografía: Vicente Hernández Vargas)

Fermentación

El jugo extraído de las piñas cocidas y molidas se deja fermentar de manera espontánea y natural (con las cepas propias de levadura) durante 4 a 7 días, lo cual dependerá de las condiciones ambientales. En la planta destiladora de Nombre de Dios, este proceso se realiza en tanques fermentadores de acero inoxidable (Figura 9). En Durango, en la mayoría de las vinatas no se utiliza inóculo, ni alimento para levadura, ni controles en cuanto a la concentración de azúcares en la cuba de fermentación. Durante este proceso, además de etanol, se

forman compuestos que proporcionan sabor y aroma al mezcal, entre esos compuestos se encuentran diferentes aldehídos derivados del etanol (Arrizon y Gschaedler, 2007). Procesos oxidativos en vez de fermentativos han sido reportados en cerveza, después de que la concentración de azúcares disminuye durante la fermentación, provocando el incremento de la formación de aldehídos, principalmente de acetaldehído (Hammond, 1981); aunque para mezcal procesos similares no han sido reportados, éstos quizá puedan ocurrir durante la fermentación del jugo de agave.



Figura 9. Tanque fermentador de acero inoxidable de la planta procesadora de Nombre de Dios (Fotografía: Vicente Hernández Vargas)

Destilación

El material fermentado se calienta, se evapora y se condensa lentamente a través de un alambique de cuchara (en Tamazula, Durango, Figura 10) o con serpentín de cobre (en Nombre de Dios, Durango, Figuras 10 y 11). En la planta procesadora de Nombre de Dios se emplean destiladores de acero inoxidable (Figura 12). El material es destilado dos veces, al producto de la primera destilación se le llama “aguavino”, éste es de baja graduación alcohólica (10 – 12°G.L.). El de la segunda destilación es llamado “mezcal” y puede tener un contenido de alcohol entre 37 y 42°GL). La graduación es estimada de manera empírica por los productores,

tomando en consideración el perlado que forma la bebida al ser agitada, sin utilizar ningún instrumento de prueba.



Figura 10. Alambiques rústicos utilizados en Tamazula (izquierda) y Nombre de Dios (derecha), Durango (tomado de Valenzuela-Ruíz y col., 2003)

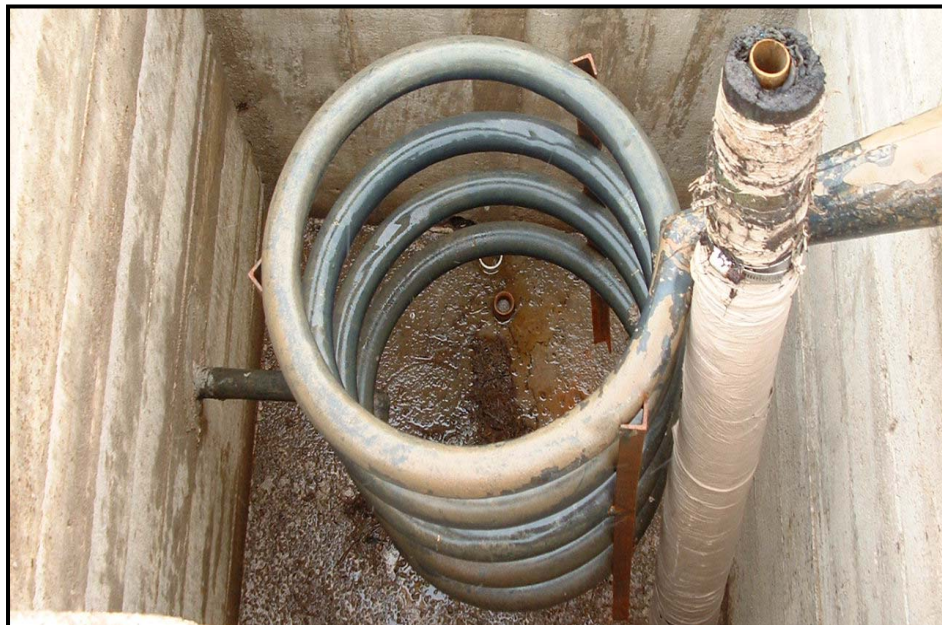


Figura 11. Alambique de serpiente (tomado de Valenzuela-Ruíz y col., 2003)



Figura 12. Destiladores de acero inoxidable de la planta procesadora de Nombre de Dios
(Fotografía: Vicente Hernández Vargas)

Finalmente, el mezcal es almacenado en recipientes o garrafones de vidrio o plástico. El producto obtenido puede ser vendido a granel, con un contenido alcohólico aproximado de 40° GL.

Los tipos de mezcal permitidos por la Norma Oficial Mexicana NOM-070-SCFI-1994, Bebidas Alcohólicas-Mezcal-Especificaciones son el mezcal 100 por ciento de agave, que únicamente contienen mostos y azúcares provenientes de los agaves; y el mezcal con otros azúcares, elaborado con 80 % de mostos de los agaves, a los que se les adiciona un 20 % de otros azúcares. De acuerdo a esa misma Norma, ambos tipos de mezcal pueden clasificarse, según el tiempo de almacenamiento en barricas, en tres categorías:

1. Mezcal joven, embotellado recién destilado.
2. Mezcal reposado, almacenado por lo menos dos meses en recipientes de madera de roble para su estabilización antes de ser embotellado. Este tipo de mezcales pueden ser abocados, es decir adicionados de uno o más productos naturales, saborizantes o colorantes, permitidos en las disposiciones legales correspondientes.

3. Mezcal añejo, almacenado por lo menos un año en recipientes de madera de roble blanco, antes de su embotellamiento. Este tipo de mezcales también puede ser abocado.

Los mezcales reposado y añejado son almacenados en barricas de roble blanco importadas de los Estados Unidos.

1.3 Regulación de la calidad de bebidas alcohólicas

La sistematización de los esfuerzos por regular la calidad de un producto, que se plasman en un documento para condicionar los procedimientos de elaboración, constituyen las Normas Oficiales. En México, el 29 de enero de 1928 se comenzaron a aplicar Normas Oficiales para la regulación de la elaboración, instalación y funcionamiento de destilerías de tequila (Castillo y Coelho, 2007), que es un tipo de mezcal. Ese inicio tiene su culminación actual en las Normas Oficiales Mexicanas que para tequila (NOM-006-SCFI-1993-Bebidas Alcohólicas-Tequila-Especificaciones), luego para mezcal (NOM-070-SCFI-1994-Bebidas Alcohólicas-Mezcal-Especificaciones) y más recientemente para bacanora (otra bebida elaborada a partir de una especie de *Agave*, que en esencia es también un mezcal (NOM-168-SCFI-2004-Bebidas Alcohólicas-Bacanora-Especificaciones), rigen la elaboración de esos productos.

El tequila es la bebida alcohólica destilada obtenida de *Agave* más regulada por el gobierno mexicano, dada su importancia económica, sus alcances de comercialización nacional e internacional, y el interés de mantener un estándar de calidad. Evaluaciones rigurosas para ese producto se llevan a cabo desde el cultivo y la cosecha de la materia prima. Cuando las piñas de *Agave tequilana* son recibidas en las fábricas, también son evaluadas para asegurarse que no lleven daños aparentes provocados por plagas. Además, muestras de las piñas son tomadas para determinar el contenido de azúcares, pH, humedad, y peso seco. Para el caso del mezcal, aparentemente únicamente el producido en Oaxaca, a partir de *Agave potatorum*, está supervisada por el gobierno mexicano,

Todas esas medidas de control de calidad son requeridas para mantener un producto en la preferencia de los consumidores y para que lleven beneficios económicos a los productores, sin embargo, medidas similares no se han desarrollado, por el momento, para la elaboración del mezcal de Durango.

La adulteración es uno de los problemas más graves con que se enfrentan los consumidores de las bebidas alcohólicas, no solo de las obtenidas de destilados de agaváceas, sino de cualquier bebida alcohólica en cualquier parte del mundo, por lo que se han destinado muchos esfuerzos y recursos al desarrollo de parámetros de calidad que tipifiquen y autentifiquen una bebida (Kokkinofta y col., 2003; Bauer-Christoph y col., 2003; MacKenzie y Aylott, 2004). Varios métodos empíricos se utilizan para ello (Gutiérrez y col., 2007), sin embargo para que las industrias involucradas puedan lograr un desarrollo deben de contar con tipificaciones que permitan comparar diversos parámetros entre las bebidas auténticas y las adulteras. De entre las bebidas mexicanas, la única que ha recibido más tención en este sentido ha sido el tequila.

1.4 Parámetros de control de calidad para la elaboración de mezcal

A diferencia del caso del tequila, para el cual se han realizado numerosos estudios químicos enfocados a mantener un estándar en el control de calidad durante todo el proceso de elaboración (Benn y Perrard, 1996; Barbosa-García y col., 2007), la ausencia de ese tipo de estudios es, actualmente, característica del mezcal elaborado a partir de *Agave durangensis*.

Especificaciones sobre el control de calidad para el mezcal están establecidas en la Norma Oficial Mexicana NOM-070-SCFI-1994-Bebidas Alcohólicas-Mezcal. En ella se hace referencia únicamente a la concentración de alcohol, extracto seco, acidez total, alcoholes superiores y metanol, y quedan sin considerar otro tipo de sustancias que pueden ser tóxicas o bien pueden favorecer las características organolépticas del producto destilado, y que serían útiles para la tipificación del mezcal y por lo tanto representarían parámetros de autenticidad, como las que se mencionan a continuación.

1.4.1 Comportamiento espectral del mezcal

El comportamiento espectral en la región UV ha sido reportada como un parámetro para la autenticación de diferentes bebidas alcohólicas destiladas, como vodka, coñac (Savchuk y col., 2001), whisky (MacKenzie y Aylott, 2004), y tequila (Barbosa-García y col., 2007). El registro de los valores de máxima absorbancia en la región UV del espectro de radiación se debe principalmente a compuestos fenólicos que se

extractan de la madera de la barrica de reposo y añejamiento, y que se concentran en el líquido mismo, pero también bien que se pueden incorporar a la bebida durante los procesos de cocción y fermentación, provenientes del combustible y recipientes utilizados, y las concentraciones de esos compuestos pueden ser rápidamente estimadas por espectrofotometría. Desviaciones del comportamiento espectral pueden deberse a adulteraciones de las bebidas por la adición de alcoholes sintéticos que contienen impurezas como acetona, 2-butanol y crotonaldehído, entre otras (Savchuk y col., 2001), por lo que la tipificación del comportamiento espectral podría representar un parámetro de calidad con respecto a la autenticidad de una bebida alcohólica.

El comportamiento espectral también puede ser indicativo del tiempo de reposo de una bebida alcohólica, ya que durante ese periodo compuestos químicos de diferente naturaleza, principalmente aromáticos, son extraídos de la madera de los barriles contenedores y pasan a formar parte de la bebida (Vlassov y Maruzhenko, 1999; Spillman y col., 1997).

En los datos publicados por Savchuk y col. (2001) sobre las concentraciones de siringaldehído y los valores de absorbancia a 280 nm, se observa una correlación positiva entre ambos parámetros, por lo que los registros de los valores de absorbancia a esa longitud de onda podrían ser indicativos de los niveles de aldehídos en las bebidas alcohólicas. Los compuestos aromáticos muestran un máximo de absorción a 280 nm (Mabry y col., 1970), por lo que la absorbancia a esa longitud de onda es el resultado de la contribución total de compuestos que tengan al menos un anillo aromático, y el comportamiento espectral en la región UV de bebidas destiladas reposadas o no, se considera una evaluación preliminar (Pérez-Coello y col., 1998). Sin embargo, algunos autores recomiendan estimar la concentración de marcadores individuales por otras técnicas (Savchuk y col., 2001).

1.4.2 Compuestos orgánicos: aldehídos y cetonas

En el proceso de elaboración de las bebidas alcohólicas, principalmente en las etapas de cocción y fermentación, se producen compuestos orgánicos como aldehídos y cetonas, que son productos de la oxidación del etanol, y que contribuyen a dar sabor y aroma al producto (Ferreira y col., 2003; Vallejo-Córdoba y col., 2004). Esos compuestos también se incorporan a las bebidas alcohólicas a partir de la madera de las barricas donde se reposan y añejan (Pérez-Coello y col., 1998; Rodríguez y col., 2004), por reacción del etanol de las propias bebidas con peróxido de hidrógeno que se produce, a su vez, por la reacción entre fenoles presentes en la madera de las

barricas y el oxígeno que puede difundir a través de ésta y disolverse lentamente en las bebidas (Azevedo y col., 2008). Los perfiles de aldehídos y cetonas han sido propuestos como parámetros de autenticidad y de condiciones de añejamiento empleadas por diferentes marcas que elaboran bebidas destiladas (Canas y col., 2003).

Entre los compuestos orgánicos que se han detectado en bebidas como brandy y vino se encuentran aldehídos fenólicos como vainillina, siringaldehído, coniferaldehído, sinapaldehído (Panossian y col., 2001); y aldehídos furánicos como el 2-furaldehído, 5-metilfurfuraldehído y 5-hidroximetilfurfuraldehído (Quesada y col., 1995). La composición de los compuestos orgánicos en las bebidas destiladas puede llegar a ser muy compleja. En un estudio sobre la composición de compuestos orgánicos en tequila, con el fin de reconstituir el sabor de ese producto, se encontraron más de 175 componentes, de los cuales cinco fueron importantes para determinar el aroma (Benn y Peppard, 1996).

La presencia de compuestos orgánicos también ha sido detectada en otras bebidas alcohólicas destiladas, como el ron y la cachaza. Entre los compuestos orgánicos detectados en esas bebidas se encuentran diferentes tipos de cetonas y aldehídos, que se originan como productos secundarios de la fermentación (Barbosa-García y col., 2007).

Algunos autores (Jenner y col., 1994; Cardoso y col., 2003) han mencionado que aunque las cetonas no han sido consideradas como dañinas ni carcinogénicas por la Organización Internacional de Salud, esos compuestos orgánicos pueden llegar a ser tóxicos si rebasan ciertos límites de concentración en las bebidas alcohólicas, provocando desde irritación de mucosas hasta efectos narcóticos.

La concentración de aldehídos aromáticos (como el siringaldehído) han sido determinados para varios coñacs y brandis europeos, éstas varían entre los valores de < 0.01 a 17.86 mg/L, teniendo mayor concentración las bebidas con mayor tiempo de maduración (Savchuk y col., 2001).

1.4.3 Composición de Metales

Otros componentes que han sido identificados en algunas bebidas alcohólicas destiladas, cuya regulación forma parte de los índices de calidad, son metales tales como Cu, Pb, Ca y Fe (Soufleros y col., 2005), que provienen principalmente de los alambiques utilizados durante el proceso de destilación o del agua utilizada para la dilución del destilado, al cual es necesario adicionar agua para disminuir la

concentración de etanol. En el caso del mezcal elaborado en Durango, que también es diluido con agua potable, la presencia de As y de sales de flúor debería incluirse en las normas regulatorias dado que el agua potable de este Estado puede contener cantidades considerables de esos elementos (Albores y col., 1979; Ortiz y col., 1998; Rosas y col., 1999; Leal y Gelover, 2002).

El contenido de metales ha sido reportado como un parámetro de calidad en relación a la autenticidad de bebidas destiladas y no destiladas. Con base principalmente en la composición de Mg, Ca y Na, ha sido posible discriminar entre los vinos de diferentes Islas Canarias, como el producido en Lanzarote y el producido en La Palma, y entre éstos y el producido en Málaga, España (Frias y col., 2001). Así mismo, Kokkinofta y col. (2003) sugieren que la concentración de Mg, Zn y Cu pueden diferenciar la bebida chipriota llamada zivania de otras bebidas destiladas similares, que llevan otros nombres en diferentes países, como la grapa de Italia.

La determinación de la composición de metales en las bebidas alcohólicas es importante porque esos elementos pueden tener efectos tanto positivos como negativos en esas bebidas que puede afectar la preferencia de los consumidores y su conservación (Ibanez y col., 2008).

1.4.4 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos, también llamados fenoles o polifenoles vegetales, son sustancias que poseen uno o más anillos aromáticos, con un radical hidroxilo sustituyente en su estructura química (grupo fenólico). El fenol mismo se encuentra como un producto natural en el reino vegetal, sin embargo compuestos con dos o más grupos hidroxilo son más comunes.

De todos los metabolitos secundarios los polifenoles son los más ampliamente distribuidos y los más diversos dentro del reino vegetal (Harborne, 1973, Markham, 1982). La diversidad de los fenoles vegetales se puede apreciar en la clasificación que de ellos hace Harborne (1989). De acuerdo a su tamaño molecular, este autor reconoce 13 grupos de polifenoles: los fenoles simples, que son compuestos de seis átomos de carbono en su estructura química (C6); los ácidos fenólicos, con siete átomos de carbono (C6-C1); los ácidos fenilacéticos y acetofenonas, con ocho (C6-C2); los ácidos hidroxicinámicos, fenilpropenos, cumarinas, isocumarinas y cromonas, con nueve (C6-C3); las naftoquinonas, con 10 (C6-C4); las xantonas, con 13 (C6-C1-C6); los estilbenos y antroquinonas, con 14 (C6-C2-C6); los flavonoides, con 15 (C6-C3-C6); los lignanos, con 18 [(C6-C3)₂]; los biflavonoides, con 30 [(C6-C3-C6)₂]; y

polímeros como las ligninas $(C_6-C_3)_n$; las catecolaminas $[(C_6)_n]$; y los flavolanos o taninos $(C_6-C_3-C_6)_n$.

Los compuestos fenólicos se originan a través de la ruta metabólica llamada de los compuestos aromáticos vegetales (Hrazdina, 1992), formada de tres segmentos: el del shikimato, que produce los aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina y triptofano; el de los fenilpropanoides, que produce derivados del ácido cinámico, los cuales a su vez son precursores de los flavonoides y de las ligninas y; por último, el de los flavonoides, que produce toda la diversidad de compuestos de este último grupo.

De entre los compuestos fenólicos vegetales, los flavonoides $(C_6-C_3-C_6)$ son los que tienen la distribución más amplia dentro del reino vegetal y son los más abundantes y diversos (Markham, 1982). De manera natural los flavonoides pueden encontrarse en dos formas, unidos a un glicósido (forma de glicósido) o bien sin un residuo de azúcar en su molécula (forma de aglicona). En su forma de agliconas, los flavonoides poseen un anillo de benceno (anillo A) condensado con un anillo heterocíclico de seis miembros (anillo C), el cual tiene unido un anillo fenil (anillo B) como sustituyente en la posición 2 (Figura 13).

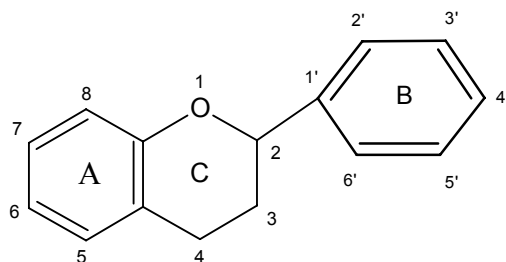


Figura 13. Estructura básica de los flavonoides

La diversidad química de los flavonoides está dada principalmente por diferencias en el nivel de oxidación del anillo heterocíclico. Con base en esta diversidad este grupo se divide en diferentes clases. Un segundo nivel de diversidad está dado por los diferentes patrones de hidroxilación, glicosilación, metilación, metoxilación, y acilación en los anillos A y B. Esos patrones dan la estructura particular de cada compuesto dentro de cada clase. La glicosilación puede ser de la forma C- o bien de la forma O-, es decir el residuo de azúcar puede estar unido directamente a un átomo de carbono perteneciente a alguno de los anillos A o B en el primer caso, o puede estar unido a un átomo de carbono por medio de un oxígeno, en el segundo.

Las principales clases de flavonoides son los siguientes:

a) Las flavonas y los flavonoles, ambos se caracterizan por presentar un doble enlace entre el C2 y el C3 del anillo heterocíclico C y difieren entre sí por la presencia de un grupo hidroxilo en la posición 3 en los segundos, el cual está ausente en las flavonas (Figura 14).

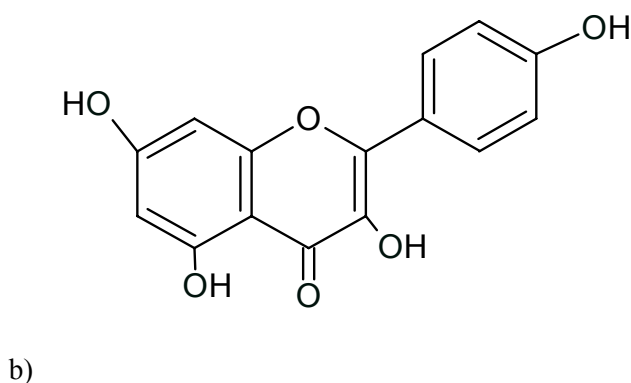
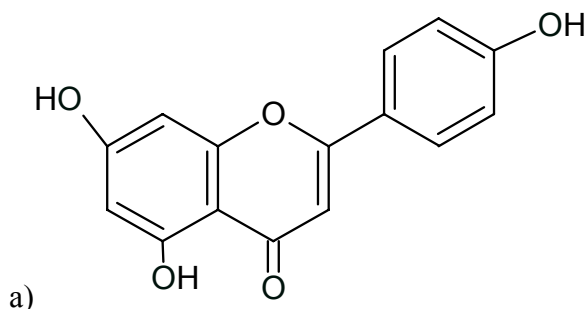


Figura 14. Estructura básica de a) flavonas y b) flavonoles

Las flavonas y los flavonoles son los flavonoides más comunes en el reino vegetal (Imperato, 1996; Manguro y col., 1996; Choi y col., 1996; Fukai y col., 1996; Markham y Campos, 1996).

b) Los flavanoides (Figura 15) incluyen cinco tipos diferentes de compuestos: las flavanonas, también llamadas dihidroflavonas; los dihidroflavonoles, también llamados flavanonoles o 3-hidroxiflavanonas; las dihidrochalconas; los flavanos; y los flavonoles. En conjunto estos cinco tipos de flavanoides también reciben el nombre de dihidroflavonoides, ya que los carbonos 2 y 3 (o alfa y beta en el caso de las

dihidrochalconas) de su estructura química están hidrogenados y no existe un doble enlace entre ellos. Las flavanonas, los dihidroflavonoles y las dihidrochalconas se diferencian de los flavanos y flavonoles por la presencia de un grupo carbonilo en el anillo heterocíclico en los tres primeros y su ausencia en los dos últimos.

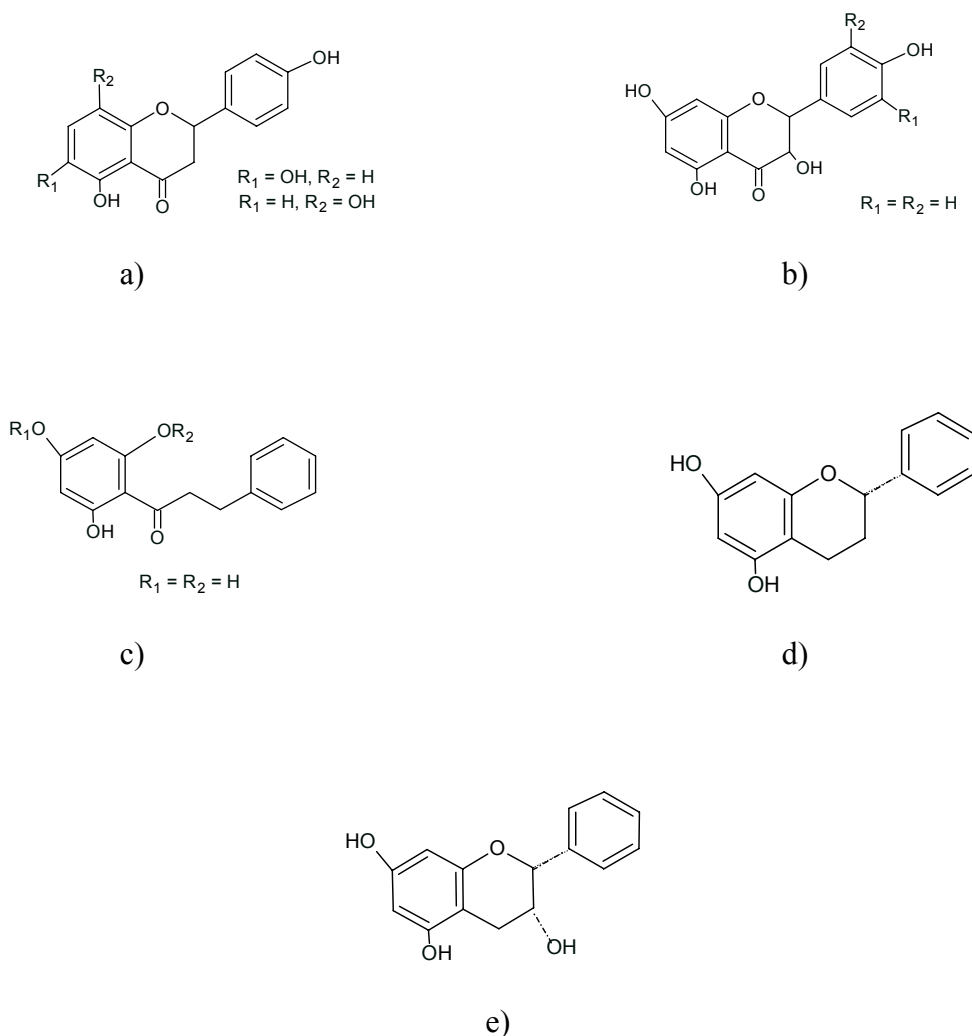


Figura 15. Estructuras básicas de a) flavanonas, b) dihidroflavonoles, c) dihidrochalconas, d) flavanos y e) flavonoles.

Los flavanoides tienen una distribución natural dentro del reino vegetal más reducida que las flavonas y los flavonoles. Han sido reportados en helechos y gimnospermas. Dentro de las angiospermas, Grayer (1989) considera que se encuentran principalmente en dos familias: las leguminosas y las compuestas. Sin embargo, Bohm (1994) presenta una lista de flavanoides identificados desde 1986 hasta 1992 en la

que se aprecia que más de 100 de estos compuestos han sido caracterizados en ese periodo de tiempo en una variedad muy amplia de familias de plantas.

c) Las antocianinas (Figura 16), forman el grupo más conspicuo de la familia de los flavonoides. Son sustancias coloridas que se caracterizan por carecer de un grupo carbonilo en la posición 4, presentar un grupo hidroxilo en la posición 3 y dos dobles enlaces en el anillo heterocíclico. Estos flavonoides se encuentran en todas las familias de plantas, con excepción de algunos géneros de las Caryophyllales del orden Centrospermae, como el betabel, *Beta vulgaris* (Strack y Wray, 1989).

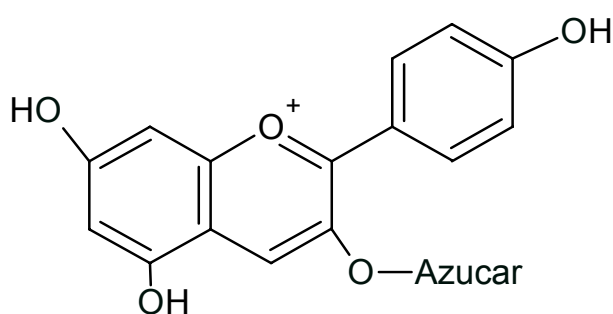


Figura 16. Estructura básica de las antocianinas

Las antocianinas, junto con los carotenoides, estos últimos de origen terpénico, son las que proporcionan los colores rosa, naranja, rojo, escarlata, violeta y azul a los pétalos de las flores y de los frutos. Estas sustancias coloridas se asocian a funciones de atracción visual de polinizadores y de dispersores de semillas (Harborne, 1979).

d) Los isoflavonoides (Figura 17), se caracterizan por presentar una desviación del anillo fenil (B) de la posición 2 a la 3. Éste se considera un grupo heterogéneo, ya que incluye a las isoflavonas, los isoflavanos, los isoflavanoles (todos ellos derivados de los correspondientes flavonas, flavanonas, flavanos y flavanoles), además de otros con estructura más compleja como los rotenoides y los pterocarpanos, los cuales presentan sistemas de anillos heterocíclicos extra. A diferencia de los otros grupos revisados, éste presenta una distribución muy limitada dentro del reino vegetal. Su presencia es casi exclusiva de la subfamilia Papilonoideae de las leguminosas. En otras subfamilias de las leguminosas y en otras familias de plantas se han registrado únicamente pocas especies productoras de algún tipo de isoflavonoide (Dewick, 1994).

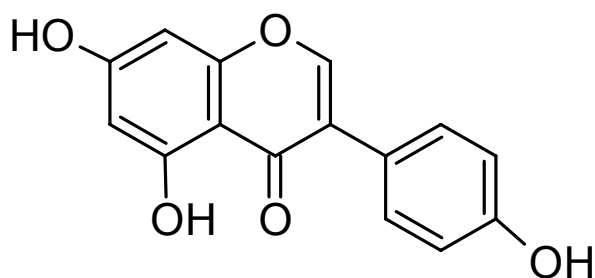


Figura 17. Estructura básica de los isoflavonoides

1.4.5 Los fenoles de la madera

La mayoría de los fenoles aquí citados forman parte de la madera, tejido químicamente muy complejo, que posee compuestos de un intervalo muy amplio de tamaño molecular e igualmente de un espectro muy variado de solubilidad. En ella se encuentran grandes polímeros, prácticamente insolubles, como la lignina y los taninos (Taiz y Zeiger, 1991) y también sustancias de tamaño molecular muy pequeño, como ácidos alifáticos y alcoholes, que son compuestos volátiles (Fernández de Simón y Cadahía, 2007). Para la madera de encino francés (*Quercus robur* y *Quercus petraea*) Pérez-Coello y col. (1998) reportan 96 compuestos.

Las bebidas alcohólicas destiladas o sólo fermentadas, después de someterse a periodos de almacenamiento en barricas, adquieren un color amarillento que es proporcionado por la madera de la cual está hecha la barrica. Esa coloración se debe a la liberación de compuestos fenólicos, principalmente flavonoides y taninos, de la madera del barril a la sustancia alcohólica. Esos compuestos aromáticos contribuyen también a determinar el sabor y el aroma de esas bebidas (Hernández y col., 2007). Se ha encontrado que la composición de esos compuestos aromáticos puede cambiar a lo largo del proceso de reposo y añejamiento (Monagas y col., 2005), por lo que la descripción de los cambios en composición correlacionada a la aceptación organoléptica a través del tiempo podría contribuir al establecimiento de parámetros de calidad e indicadores del tiempo de reposo y añejamiento.

Los compuestos fenólicos, principalmente los flavonoides, han sido propuestos como parámetros de calidad para algunos alimentos, debido a su elevada capacidad antioxidante (Campos y col., 1997; Sánchez-Moreno y col., 1999; Serra y col., 2001; Almaraz-Abarca y col. 2007) y como los perfiles de estos compuestos tienen una tendencia especie-específica (Abdala y Seeligmann, 1995; Van Heerden y col., 2003; Almaraz-Abarca y col., 2004; Almaraz-Abarca y col., 2006) la composición detectada

en los mezcales reposados y añejados podría representar un parámetro de autenticidad del origen botánico de la madera con que se elabora el barril de añejamiento.

Los compuestos fenólicos de las bebidas alcohólicas destiladas además de proporcionarles color y aroma también pueden conferirles propiedades antioxidantes, como ha sido reportado por Canas y col. (2008) para brandis, y otros efectos benéficos potenciales para la salud humana, como la inhibición de bacterias asociadas a infecciones gástricas (Lin y col., 2005).

Existen numerosos trabajos que reportan los efectos benéficos de los flavonoides a la salud humana. De esos compuestos se ha reconocido su capacidad como antioxidantes (Sánchez-Moreno y col., 1999; Almaraz-Abarca y col., 2004; Almaraz-Abarca y col., 2007), como sustancias antibacterianas, antifúngicas, antivirales (Bohm, 1998), antineoplásicas (Campos, 1997), como sustancias que pueden reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Visioli y col., 2000), y como sustancias con un amplio espectro de actividad hormonal (Middleton Jr. y Kandaswami, 1994).

Existen reportes que indican que la oxidación en sistemas biológicos esta asociada a enfermedades como cáncer, arterioesclerosis, diabetes, y artritis, entre otras (Nelson y col., 1998), por lo que la búsqueda de sustancias antioxidantes a partir de productos naturales es un área científica en pleno ascenso. Dentro de esas sustancias, los flavonoides ocupan un lugar importante.

1.4.6 Relación estructura-actividad antioxidante de los fenoles

Los radicales libres son potentes sustancias oxidantes, que se multiplican geométricamente en reacciones en cadena, provocando daño a diversas sustancias orgánicas (Nelson y col., 1998). Esos daños se han asociado a enfermedades tales como cáncer, arterioesclerosis, isquemia cerebral y cardiaca, mal de Parkinson, entre otras (Ames y col., 1993). Esas sustancias oxidantes pueden ser originadas como consecuencia de los procesos metabólicos normales de los organismos y por factores externos como radiación UV.

Los organismos poseen sustancias antioxidantes naturales que participan en sistemas de defensa y reparación, entre ellos se encuentran enzimas como superóxido dismutasa (Sardesai, 1998; Serra y col., 1999), glutatión peroxidasa (Serra y col., 1999), catalasa (Murria y col., 2001); y sustancia como la bilirrubina y ácido úrico (Sardesai, 1998; Serra y col., 1999). Sin embargo, cuando la presencia de sustancia oxidantes rebasa la capacidad de reparación natural, esas sustancias pueden

reaccionar con neurotransmisores, ácidos nucleicos, proteínas, coenzimas, carbohidratos y lípidos, que son componentes químicos celulares importantes. En esa condición se considera importante la ingesta de antioxidantes exógenos.

Las vitaminas C y E, el β -caroteno, y compuestos fenólicos como los ácidos fenólicos y los flavonoides, entre otros, son sustancias capaces de bloquear radicales libres, de quelar metales, de “quenchar” singletes de oxígeno (Clifford y Cuppett, 1997), y de tener efectos sobre la actividad de una gama muy amplia de enzimas involucradas en reacciones de oxidación (Middleton y col., 2000), que les confieren la propiedad de actuar como antioxidantes exógenos cuando son ingeridos por los organismos.

Las propiedades de los ácidos fenólicos y de los flavonoides han sido documentadas en varios reportes (Campos, 1997; Nelson y col., 1998; Almaraz-Abarca y col., 2004; Almaraz-Abarca y col., 2007). Los flavonoides en particular pueden reducir radicales libres de oxígeno y de nitrógeno debido a que tienen bajos potenciales redox (Pietta, 2000), mientras que por su capacidad de quelar iones de metales de transición pueden inhibir la generación de radicales oxígeno y la oxidación en cadena subsecuente (Afanas'ev y col., 1989).

Las propiedades antioxidantes de los flavonoides están asociadas a ciertas condiciones de su estructura química. La capacidad quelante se ha asociada a la parte de catecol del anillo B, y el comportamiento redox a la presencia de grupos 3-hidroxi (Brown y col., 1998).

2. JUSTIFICACIÓN

La elaboración de mezcal es una actividad tradicional en los municipios de Durango, Nombre de Dios, y Mezquital, municipios donde crece de manera natural *Agave durangensis* o agave cenizo, que es la materia prima de esa importante actividad económica. Sin embargo, en Durango la elaboración de la bebida alcohólica se ha llevado a cabo de acuerdo a métodos artesanales y sin control de calidad alguno. A pesar de eso, en 1994 ese Estado logró obtener la denominación de origen para la elaboración de esa bebida alcohólica. Desde entonces ha habido un interés por parte de los ejidatarios productores por mejorar las condiciones de fabricación y de aplicar medidas para tener un control de la calidad de su producto. Ese interés ha sido apoyado por instituciones de investigación, como el CIIDIR-IPN-Durango, que ha brindado orientación técnica a los productores, y por el gobierno del Estado de Durango, que ha proporcionado recursos materiales para la creación de una planta destiladora que ya está en funcionamiento en el municipio de Nombre de Dios, y de dos más, una en el municipio de Durango y otra en el municipio de Mezquital, que entrarán en funcionamiento próximamente.

La realización de este estudio, sobre la determinación de los estándares de calidad del mezcal elaborado en Durango, responde a una demanda concreta de los productores por contar con parámetros que permitan tipificar su producto y que les permita garantizar la autenticidad del mismo.

Dado que el mezcal elaborado en el Estado de Durango pasa por procesos semejantes de elaboración y almacenamiento a los de otras bebidas destiladas y se carece de información que permita establecer la calidad, con respecto a los niveles en los que sustancias importantes para definir el aroma, el sabor, y propiedades adicionales como la capacidad antioxidante, se encuentran en el producto destilado y almacenado, en este trabajo se propone desarrollar un índice de calidad, basado en la caracterización con respecto a la presencia de cetonas, aldehídos, metales, y compuestos fenólicos asociados a la capacidad antioxidante de esta bebida, que permita llevar un control estricto de calidad y cumplir así con las normas y estándares nacionales e internacionales que garanticen su circulación competitiva en el mercado.

3. OBJETIVO GENERAL

Determinar un perfil de la calidad del mezcal producido en el estado de Durango a partir de *Agave durangensis*, con respecto a la composición de cetonas, aldehídos, metales, compuestos fenólicos, y capacidad antioxidante.

Objetivos Específicos

- Definir el comportamiento espectral UV/Vis del mezcal de Durango.
- Determinar la composición de compuestos orgánicos (aldehídos y cetonas) presentes en el mezcal elaborado en el estado de Durango.
- Identificar la presencia de metales que se adicionan durante el proceso de elaboración de ese mezcal.
- Identificar los cambios en los perfiles fenólicos del mezcal durante siete meses de reposo en barricas.
- Determinar la capacidad antioxidante asociada a la presencia de fenoles, para esta bebida alcohólica.
- Proponer un índice de calidad para este producto

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Muestras de mezcal

Las muestras de mezcal fueron proporcionadas por la Cooperativa “Planta Productora de Mezcal”, de Nombre de Dios, Durango, México.

Las muestras se colectaron cada semana desde el 29 de octubre de 2007 (mezcal recién destilado, llamado mezcal joven) al 23 de mayo de 2008 (mezcal de 207 días de reposo), de tres diferentes barricas, elegidas de manera aleatoria, hechas de madera de encino blanco Americano (*Quercus alba* L.), importadas de Estados Unidos; de acuerdo a lo mencionado en la Norma Oficial Mexicana “NOM-070-SCFI-1994-Bebidas Alcohólicas-Mezcal”. Las muestras (alícuotas de 100 mL tomadas de barricas recién abiertas) fueron inmediatamente e individualmente analizadas para determinar el comportamiento espectral, la composición de aldehídos y cetonas, la presencia de metales, el contenido total de fenoles, los perfiles fenólicos, y la capacidad antioxidante.

4.2 Determinación de los espectros de absorción UV-Vis.

Para evaluar si el comportamiento espectral en la región UV-Vis representa una herramienta para determinar la autenticidad y la tipificación del mezcal de Durango, primeramente se definió el intervalo de la variabilidad con respecto a las longitudes de onda de máxima absorción y de los valores de absorbancia, es decir de los espectros de absorción UV-Vis del mezcal genuino para que sirva de referencia y comparación con cualquier posible muestra adulterada o falsificada. La definición de un intervalo de absorbancia para el mezcal puede ayudar a determinar adulteraciones o falsificaciones, como se ha establecido para otras bebidas destiladas, como el whisky (MacKenzie y Aylott, 2004).

Los espectros de absorción UV-Vis de todas las muestras de mezcal se realizaron de acuerdo al método descrito por Barbosa-García y col. (2007), propuesto como un método sencillo y económicamente accesible para identificar diferentes marcas de tequila y para discriminar entre tequilas 100% de agave y tequilas mezclados.

El espectro de absorción de cada muestra se obtuvo con un espectrofotómetro UV-Visible (Spectronic Genesys 2). De manera individual se colocó un mL de muestra en

una celda de cuarzo de 1 cm de grosor. Cada espectro se registró, previa centrifugación (6000 rpm, durante 10 minutos, a temperatura ambiente), entre 200 y 500 nm, por duplicado. Se uso como blanco etanol al 40% en agua.

La precisión analítica se determinó con muestras del mezcal joven elaborado en La Constanza, Durango, con base en el cálculo de los valores promedio y desviación estándar de la absorbancia a 10 longitudes de onda elegidas a intervalos de 20, entre 220 y 400 nm, que es el intervalo de los espectros en los que se localizan los picos y valles. Las longitudes de onda para esta evaluación se eligieron previo análisis del comportamiento espectral de las muestras entre 200 y 500 nm, Las lecturas de absorbancia de cada una de las 10 longitudes de onda se evaluaron por triplicado.

4.3 Determinación de la composición de aldehídos y cetonas

En el apéndice A de la Norma Oficial Mexicana NOM-006-SCFI-1994-Bebidas Alcohólicas-Tequila, se describe un método químico por titulación, para determinar la concentración de ésteres y aldehídos, pero no cetonas. Sin embargo, la NOM-070-SCFI-1994-Bebidas Alcohólicas-Mezcal no hace referencia alguna a determinaciones de estas sustancias. En este trabajo se estimó la concentración de cetonas y aldehídos por las técnicas y métodos que internacionalmente se han propuesto para tal fin. Estas determinaciones se realizaron por HPLC/DAD, de acuerdo al método propuesto por Cardoso y col. (2003), modificado, con el que se pueden detectar cetonas y aldehídos como sus derivatizados 2,4-dinitrofenilhidrazonas, de manera simultánea.

Para la derivatización de aldehídos y cetonas presentes en las muestras de mezcal se preparó una solución de 2,4-dinitrofenilhidrazina (2,4-DNPH) disolviendo 200 mg de esta sustancia en 1 mL de ácido sulfúrico concentrado, 1.5 mL de agua (adicionada gota a gota), y 6 mL de etanol. De la solución de 2,4-DNPH se tomó 0.5 mL y se combinaron con 0.025 mL de ácido fosfórico y 1 mL de cada una de las muestras de mezcal. Después de 2 hrs de incubación en oscuridad y a temperatura ambiente, las soluciones se filtraron para su análisis en HPLC/DAD.

Los análisis de HPLC fueron realizados con un cromatógrafo y un detector de arreglo de diodos Perkin Elmer, modelo Series 200, y una columna Perkin Elmer Brownlee Analytical C18 (4.6x250 mm, 5 μ m). El volumen de inyección fue de 40 μ L, la velocidad de flujo de 1mL/min. Los cromatogramas se registraron a 365 nm, con metanol-acetonitrilo (8:2) como solvente A y agua como solvente B, de acuerdo al siguiente gradiente lineal: 60% de solvente A durante 9 minutos, 95% de solvente A durante 16

minutos, y 60% de solvente A durante 24 minutos. Los espectros de absorción de cada compuesto resuelto se registraron en el intervalo de longitud de onda de 300 a 500 nm. Los estándares 2-butanona, acetona, 2-metilciclohexanona, ciclopentanona, formaldehído, y valeraldehído se analizaron de la misma manera. La identificación de los compuestos orgánicos detectados en las muestras de mezcal se realizó por comparación directa de los tiempos de retención y de los espectros de absorción de los estándares, y por el comportamiento espectral y cromatográfico reportado previamente (Cardoso y col., 2003; Muñoz y col., 2005).

Se emplearon las ecuaciones $Y = 13.6X + 0.31$, $r = 0.999$; y $Y = 10.2X + 0.74$, $r = 0.9997$, obtenidas por análisis de regresión lineal de los datos de las concentraciones contra las áreas respectivas de los picos de los cromatogramas, obtenidos por HPLC/DAD, para acetona y para formaldehído, respectivamente, para estimar las concentraciones relativas de cada uno de los compuestos orgánicos detectados en las muestras de mezcal. Para desarrollar las ecuaciones de ambos compuestos, las concentraciones empleadas fueron 1, 5, 10, 20 y 50 mg/L. Las concentraciones de derivados cetónicos y aldehídicos se expresaron en términos de mg/L de equivalentes de acetona y mg/L de equivalentes de formaldehído.

4.4 Determinación de metales.

La estimación de metales no está señalada ni en la NOM-006-SCFI-1994-Bebidas Alcohólicas-Tequila ni en la NOM-070-SCFI-1994-Bebidas Alcohólicas-Mezcal. Sin embargo, existe otra Norma Oficial Mexicana, la NOM-117-SSA1-1994-Bienes y Servicios, Método de Prueba para la Determinación de Calcio, Arsénico, Plomo, Estroncio, Cobre, Hierro, Zinc y Magnesio en Alimentos, Agua Potable y agua Purificada, por Espectroscopía de Absorción Atómica. En este estudio se evaluaron las concentraciones de los metales señalados por la NOM-117-SSA1-1994, además de As, debido a que este elemento ha sido detectado en el agua del Estado de Durango (Albores y col., 1979; Ortiz y col., 1998; Rosas y col., 1999; Leal y Gelover, 2002).

La presencia de metales en los destilados se realizó por la técnica de espectrometría de absorción atómica por horno de grafito o por flama, de acuerdo a lo delineado en la NOM-117-SSA1-1994. Alícuotas de cada una de las muestras de mezcal se sometieron de manera individual a digestión ácida, de acuerdo a lo señalado en esa misma norma.

Los análisis se hicieron con un equipo Perkin-Elmer EAA Analyst 700. Hierro y Zinc fueron determinados por la técnica de flama (Fe: $Y = 0.0395 + 0.0512X$, $r = 0.9801$; Zn: $Y = 0.2268 + 0.0475X$, $r = 0.9984$), y arsénico, plomo, cadmio y cobre, por horno de grafito (As: $Y = 0.01162 + 0.00416X$, $r = 0.9975$; Pb: $Y = 0.00651X$, $r = 0.9999$; Cd: $Y = -0.01487 + 0.0028X$, $r = 0.9980$; Cu: $Y = 0.11857 + 0.01732X$, $r = 0.9923$).

4.5 Composición fenólica

La presencia de compuestos fenólicos es un parámetro que no está considerado ni en la NOM-006-SCFI-1994-Bebidas Alcohólicas-Tequila ni en la NOM-070-SCFI-1994-Bebidas Alcohólicas-Mezcal, por lo que su determinación se realizó de acuerdo a técnicas y métodos reportados para otros tipos de bebidas. Para estos análisis se emplearon muestras de mezcal colectada a intervalos aproximados de ocho días.

4.5.1 Fenoles totales

El contenido total de cada muestra de de mezcal se determinó por el método de Folin-Ciocalteu, de acuerdo a Lozoya-Saldaña y col. (2007), a partir de una curva estándar de ácido galico (1 a 10 μ g/mL vs. absorbancia): $Abs_{760nm} = 0.08490 [\text{ácido gálico}] + 0.06386$, coeficiente de correlación $r = 0.9963$. Los valores de absorbancia se registraron a 760 nm, después de 120 min de incubación en obscuridad. Los contenidos de fenoles se expresaron en mg de equivalentes ácido gálico (EAG)/L.

4.5.2 Perfiles fenólicos

Las muestras de mezcal se concentraron al 50% de su volumen inicial y después se extractaron dos veces con acetato de etilo. Las fracciones orgánicas combinadas se concentraron a sequedad. Los residuos se resuspendieron en una solución de etanol-agua (1:1, v/v) y se analizaron (alícuotas de 20 μ L) para determinar su composición fenólica, por medio de HPLC/DAD, de acuerdo al método descrito por Campos (1997), en un sistema HPLC marca Perkin Elmer Series 200, y una columna Perkin Elmer Brownlee Analytical C18 (4.6x250 mm, 5 μ m), por medio de un gradiente de

acetonitrilo-agua acidificada. Los cromatogramas se registraron a 260 and 340 nm. Los datos espectrales para todos los picos se acumularon en el intervalo de longitud de onda de 200-400 nm usando un detector de arreglo de diodos (Perkin Elmer Series 200). Las identificaciones estructurales se hicieron por comparación directa de los tiempos de retención y de los espectros UV de estándares, y de acuerdo a las compilaciones publicadas por Mabry y col. (1970) y por Campos y Markham (2007). Los compuestos que no pudieron compararse con un estándar, se identificaron considerando sus parámetros espectrales. Los estándares comerciales empleados fueron ácido gálico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, ácido siríngico, ácido *p*-hidroxibenzoico, quercetina, quercitrina, y miricetina.

4.6 Capacidad antioxidante

Las propiedades antioxidantes del mezcal de Durango a diferentes tiempos de reposo se evaluaron por medio de la determinación de la capacidad bloqueadora del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH*), reportado por Campos (1997). Cuatro concentraciones (0 a 200 µL) de cada muestra fueron individualmente adicionadas a una solución de DPPH* (33 µg/mL en etanol-agua, 50% v/v) de tal manera que se mantuviera un volumen final de 1 mL. La disminución en la absorbancia se determinó a 523 nm después de 30 min. Las concentraciones de DPPH* en el medio de reacción contra las concentraciones de fenoles de las muestras se graficaron para determinar, por regresión lineal, la concentración efectiva al 50%, definida como la cantidad de antioxidante necesitada para disminuir al 50% la concentración inicial de DPPH* (EC₅₀). Estándares para derivados hidroxicinámicos fueron también evaluados. La siguiente curva de calibración, hecha con DPPH* entre 1.0 y 6.6 µg/mL, fue empleada para calcular la concentración de DPPH* (µg mL⁻¹) en el medio de reacción: $A_{523\text{ nm}} = 0.004380 [DPPH^*] + 0.399$, coeficiente de correlación $r = 0.99627$. La actividad bloqueadora de radicales libres se expresó en cada caso en términos de EC₅₀ en µg/mL.

4.7 Análisis estadístico

Las muestras se analizaron por triplicado y de manera independiente. Se utilizó el diseño estadístico de bloques al azar (análisis de varianza ANOVA con $p < 0.05$) y el ANOVA multivariado. Los resultados de los análisis que mostraron diferencias

estadísticas significativas se sometieron, independientemente, a la prueba pos hoc de Duncan. Los datos fueron procesados con los programas de cómputo: COSTAT (1982) y SPSS versión 15.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Comportamiento espectral UV/Vis

Las Figuras 18 a 20 consignan los espectros de las muestras de mezcal de la barrica 1, 4 y 7, respectivamente, a diferentes tiempos de reposo. Con el fin de mostrar las tendencias de una manera clara, se presentaron los espectros de solamente una de las repeticiones en cada caso.

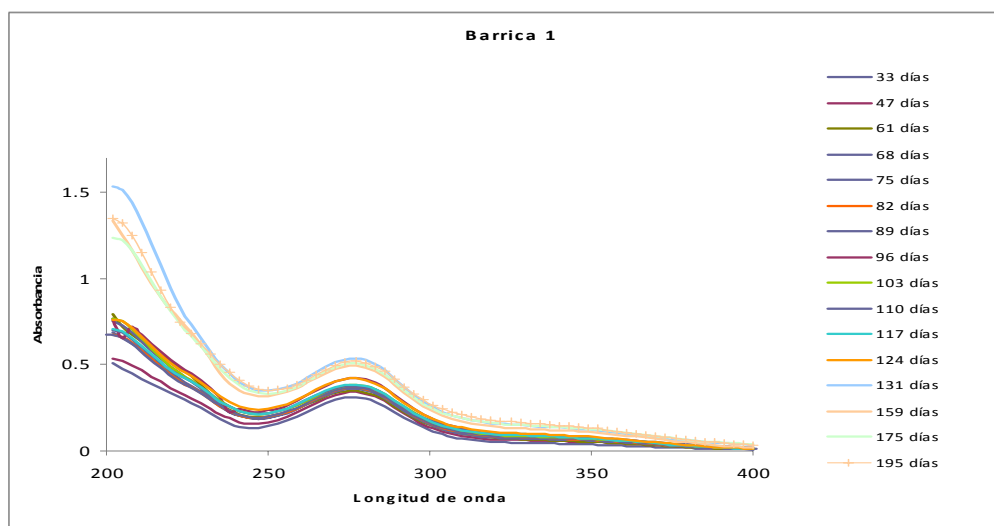


Figura 18. Espectros de absorción de muestras de mezcal de *A. durangensis*, a diferentes tiempos de reposo en la barrica 1.

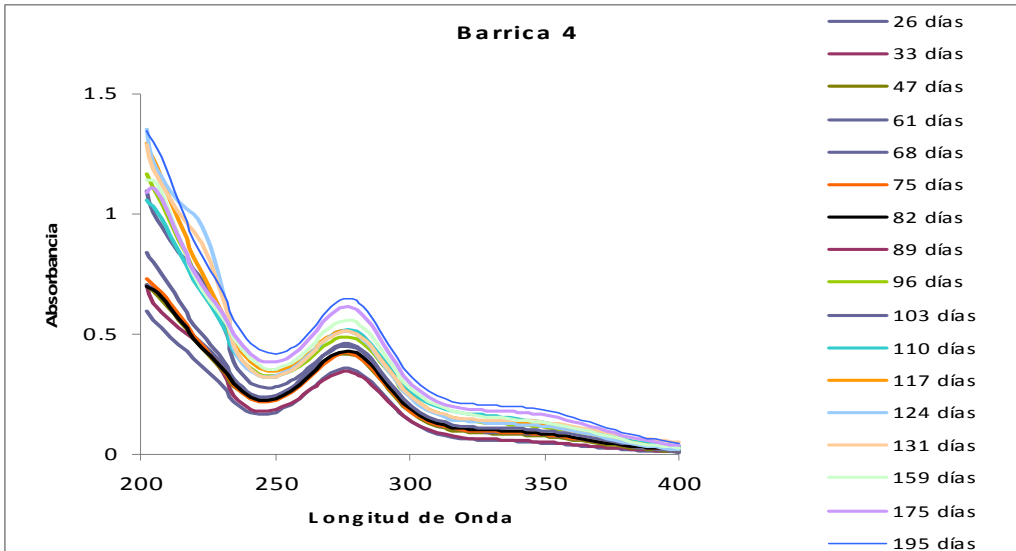


Figura 19. Espectros de absorción de muestras de mezcal de *A. durangensis*, a diferentes tiempos de reposo en la barrica 4.

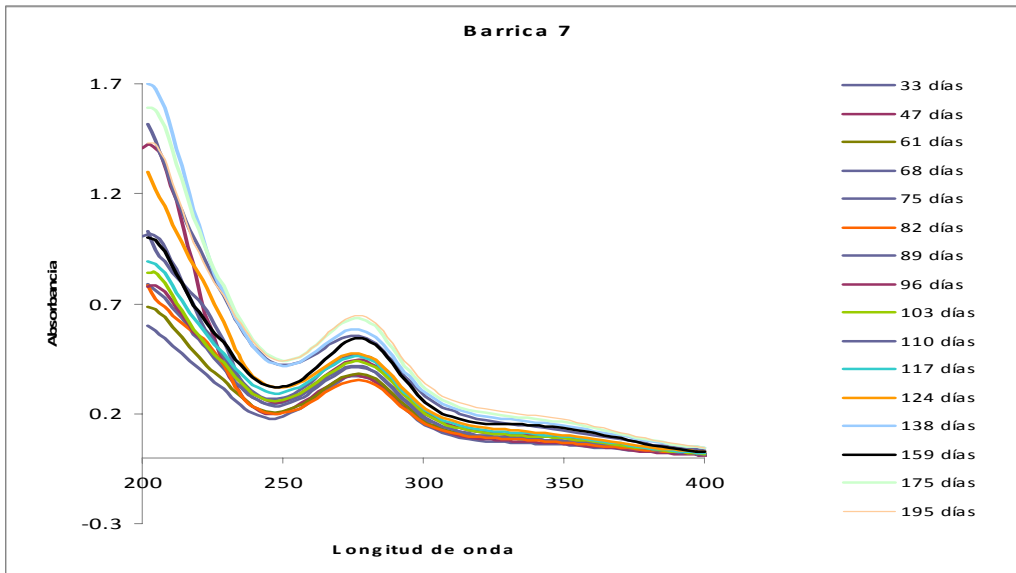


Figura 20. Espectros de absorción de muestras de mezcal de *A. durangensis*, a diferentes tiempos de reposo en la barrica 7.

Las Figuras 21 y 22 muestran respectivamente, los espectros de absorción UV de una muestra de mezcal joven elaborado en el poblado de La Constancia, Durango, y del elaborado en la planta destiladora del poblado de Nombre de Dios, Durango.

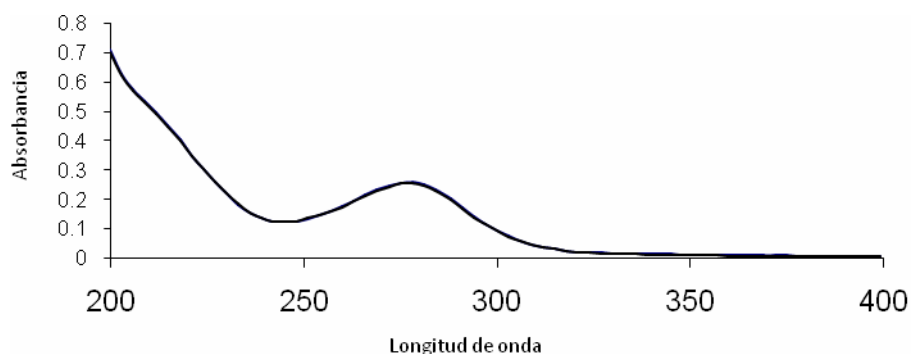


Figura 21. Espectros de absorción de muestras de mezcal joven elaborado a partir de *A. durangensis*, en La Constanca, Durango.

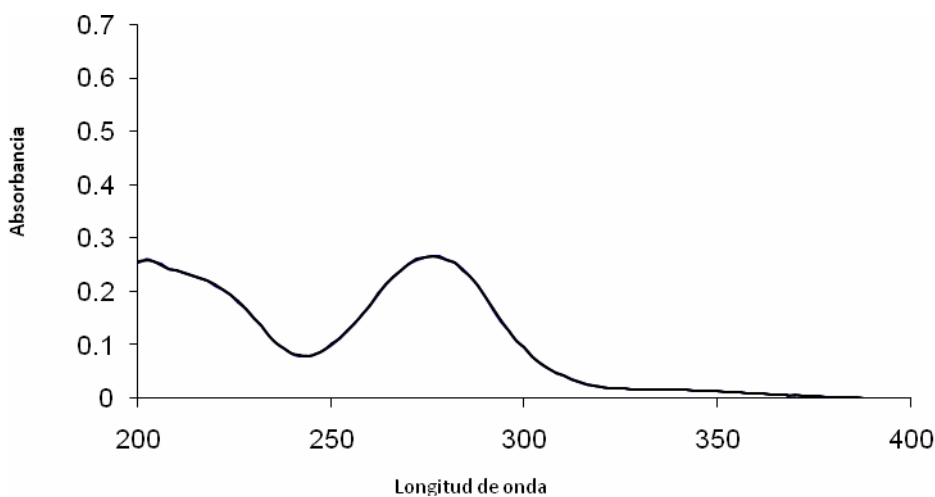


Figura 22. Espectros de absorción de muestras de mezcal joven elaborado a partir de *A. durangensis*, en la Planta Destiladora de Nombre de Dios, Durango.

De acuerdo a las Figuras 18 a 22, los espectros de absorción de las muestras de mezcal joven y reposado de *Agave durangensis* presentan una banda de absorción entre 250 y 330 nm, con un fuerte pico de máxima absorción a 277 nm, y casi nula absorción a longitudes de onda mayores a 400 nm. Este máximo de absorción es muy cercano al reportado para tequila, que es de 278 nm (Barbosa-García y col., 2007). De acuerdo con estos autores, esa banda revela la presencia de compuestos orgánicos volátiles procedentes de la cocción de la piña de agave y de la fermentación de su

jugo. Para las muestras de mezcal almacenado en barricas, los valores de absorbancia a 277 nm aumentaron de 0.311, 0.343 y 0.372 a los 33 días de reposo, hasta 0.520, 0.648, y 0.646 a los 195 días, para la barrica 1, 4 y 7, respectivamente, La precisión analítica del método se estimó de acuerdo a MacKenzie y Aylott (2004). Los cálculos realizados para ello se muestran en la Tabla 1 y en el Anexo 1. De acuerdo a la Tabla 1, los límites de confianza variaron de ± 0.0007 a 400 nm, hasta ± 0.0228 a 200 nm. Los valores estrechos de los límites de confianza sugieren una alta precisión del comportamiento de absorbancia del mezcal a cualquiera de las 10 longitudes de onda evaluadas.

Tabla 1. Precisión del análisis espectral para el mezcal joven de *A. durangensis*, elaborado en La Constanca, Durango

Nm	Intervalo de absorbancia	Media \pm Desviación Estándar	Límite de confianza (1.96 σ)*
200	0.600-0.705	0.6276 \pm 0.0369	± 0.0228
240	0.322-0.342	0.332 \pm 0.0063	± 0.0039
260	0.335-0.354	0.3468 \pm 0.0055	± 0.0034
280	0.471-0.491	0.4822 \pm 0.0075	± 0.0046
300	0.238-0.252	0.2442 \pm 0.0048	± 0.0029
320	0.140-0.148	0.1422 \pm 0.0023	± 0.0014
340	0.116-0.124	0.1192 \pm 0.0023	± 0.0014
360	0.087-0.093	0.0896 \pm 0.0018	± 0.0011
380	0.048-0.053	0.0509 \pm 0.0013	± 0.0008
400	0.024-0.028	0.0258 \pm 0.0012	± 0.0007

Resultados correspondientes a tres muestras independientes

* Calculado como $LC = (x-X)/DE$, donde x =lectura de la absorbancia a una longitud de onda dada, X =media de las lecturas de absorbancia a una longitud de onda, DE =desviación estándar.

Existe una alta correlación entre los valores de máxima absorción a 277 nm y el tiempo de reposo del mezcal de Durango. Las Figuras 23 a 25 muestran la tendencia de estas dos variables para las barricas 1, 4 y 7, respectivamente. Los valores altos de esas correlaciones ($r = 0.993$, $r = 0.990$, y $r = 0.993$, para barrica 1, 4 y 7, respectivamente) sugieren que la caracterización del comportamiento espectral de las muestras de mezcal joven y reposado durante diferentes periodos podría representar un parámetro de calidad y de autenticidad del producto, debido, además, a la precisión

del método y a que bebidas adulteradas tienen comportamientos espectrales que se desvían de los parámetros típicos de las bebidas auténticas, y esa desviación es tal que puede ser posible discriminar entre bebidas auténticas y adulteradas por medio de análisis multivariados como el de componentes principales (Barbosa-García y col., 2007). Esta caracterización espectral es un método rápido y relativamente accesible en términos técnicos, ya que no requiere algún tipo de preparación de las muestras, y económicos que podría ser incluido en la norma de calidad de esa bebida alcohólica.

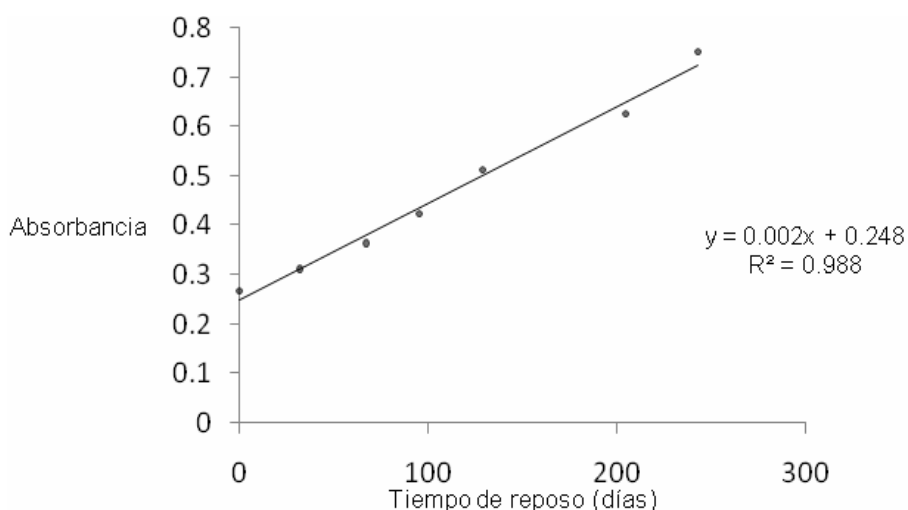


Figura 23. Correlación entre el tiempo de reposo y los valores de $A_{277\text{ nm}}$ del mezcal de la barrica 1

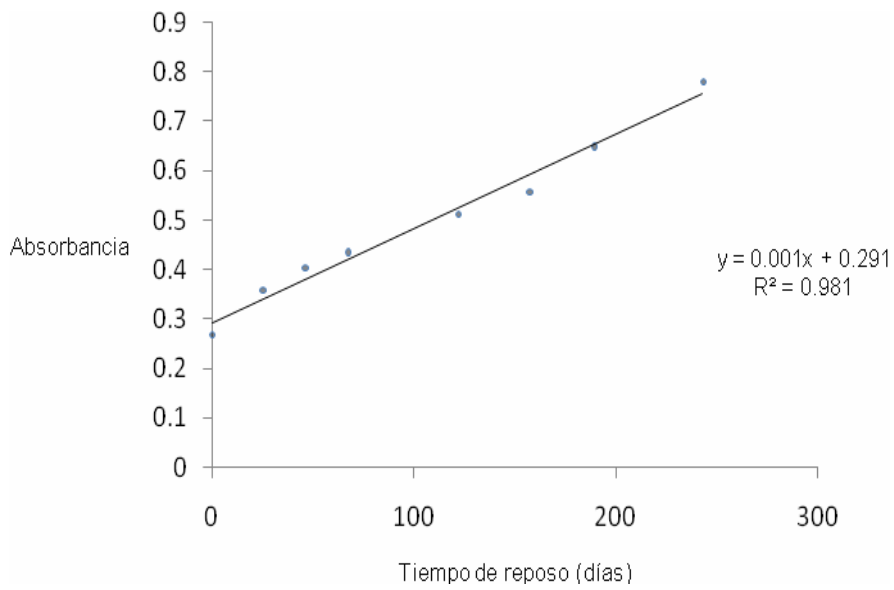


Figura 24. Correlación entre el tiempo de reposo y los valores de $A_{277\text{ nm}}$ del mezcal de la barrica 4

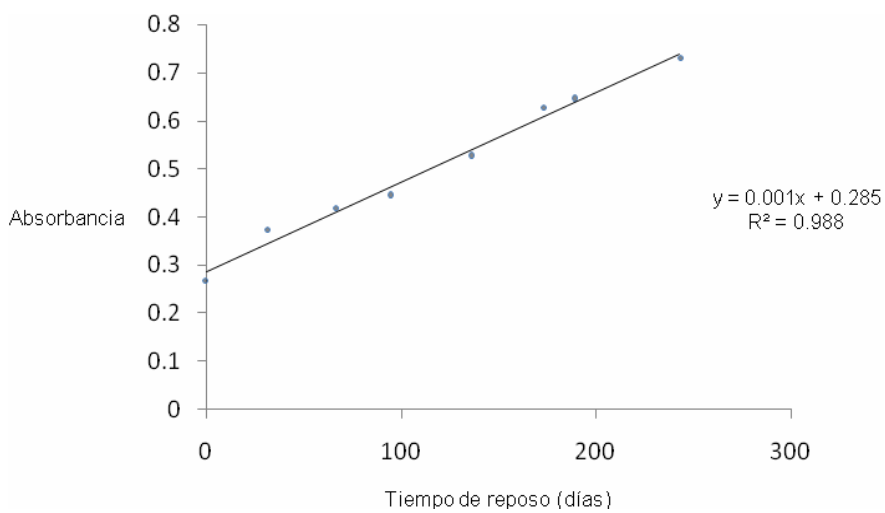


Figura 25. Correlación entre el tiempo de reposo y los valores de $A_{277\text{ nm}}$, del mezcal de la barrica 7

5.2 Compuestos orgánicos: aldehídos y cetonas

Para que los azúcares contenidos en las piñas de agave puedan ser sustrato para las levaduras que realizan la fermentación alcohólica, esas piñas deben ser cocidas. Durante la cocción, que se lleva a cabo a temperaturas elevadas, se generan aldehídos, principalmente aldehídos furánicos, como resultado de la reacción de Maillard; este tipo de compuestos han sido reportados para brandis (Quesada y col., 1995; Canas y col., 2003) y para tequila (Rodríguez y col., 2005).

Para el análisis de las cetonas y aldehídos presentes en las muestras del mezcal de Durango, ambos tipos de compuestos se transformaron en sus derivados 2,4-dinitrofenilhidrazonas (2,4-DNPH) después de la reacción con 2,4-dinitrofenilhidrazina. Diez principales compuestos de derivados cetónicos y aldehídicos fueron detectados en el mezcal de Durango, a diferentes tiempos de reposo. La relación de esos compuestos se presenta en la Tabla 2.

Tabla 2. Aldehídos y cetonas detectados en el mezcal de Durango

NÚMERO DE COMPUESTO	TR (min)	IDENTIFICACIÓN
1	4.468	5-hidroximetilfuraldehído (5-HMF)
2	8.006	2-furaldehído (2-FAL)
3	9.957	5-metilfuraldehído (5-FMA)
4	11.944	Acetona
5	15.833	NI
6	17.377	NI
7	20.457	Valeraldehído
8	21.694	Ciclopentanona
9	24.206	NI
10	24.811	NI

NI: no identificado

La identificación de los compuestos se realizó por comparación directa de los tiempos de retención y los espectros UV/Vis con los de los estándares. En el Anexo 2 se muestran los espectros y tiempos de retención correspondientes a los estándares empleados para la identificación de los derivados cetónicos y aldehídicos presentes en el mezcal de Durango, además los espectros y tiempos de retención de 10 compuestos encontrados en las muestras y de otros cuatro, también detectados en las muestras de mezcal, cuya concentración fue menor a 0.1 mg/L.

Los aldehídos y cetonas identificados en las muestras de mezcal fueron 5-hidroxiacetilfurfuraldehído (compuesto 1, TR=4.4 min), 2-furaldehído (compuesto 2, TR=8.00), 5-metilfurfuraldehído (TR=9.9, compuesto 3), y valeraldehído (compuesto 7, TR=20.4). Las cetonas identificadas fueron acetona (compuesto 4, TR=15.8), y ciclopentanona (compuesto 8, TR=21.6). Otros cuatro compuestos no pudieron ser identificados. A diferencia de lo reportado para tequila (Muñoz y col., 2005) acetaldehído y siringaldehído no fueron encontrados. A diferencia también de lo reportado para tequila por esos mismos autores, en el mezcal de Durango se detectaron por lo menos cinco compuestos de tiempos de retención mayores a 19 minutos, que no se mencionan para el tequila. Las diferencias en los perfiles de aldehídos y cetonas entre el mezcal de Durango y lo reportado para tequila (Muñoz y col., 2005) y para otras bebidas (Cardoso y col., 2003) sugieren que pueden ser utilizados como parámetros de autenticidad, ya que su presencia depende de la composición de fructanos presentes en la materia prima y del método particular de elaboración, principalmente de las condiciones de cocción (Michel-Cuello y col., 2008). Esos perfiles también pueden representar parámetros de no adulteración, ya que la adición de alcohol de caña al mezcal (que es una de las principales formas de adulteración), provocaría una disminución en la concentración de estos componentes. La estimación de la concentración de los derivados cetónicos y aldehídicos identificados en el mezcal de Durango, de las barricas 1, 4, y 7, a diferentes tiempos de reposo, se presentan en las Tablas 3 a 5.

Los compuestos encontrados a mayor concentración en las tres barricas a cualquier tiempo de reposo fueron el 5-HMF (compuesto 1) y la acetona (compuesto 4), con valores entre 26.18 y 37.79 mg/L, y entre 36.30 y 52.90 mg/L, respectivamente (Tablas 3 a 5). Las concentraciones totales de aldehídos en cualquiera de las tres barricas fueron menores a 50 mg/L, estos valores son muy bajos comparados con los reportados para coñac, que llegan a alcanzar hasta 200 mg/L (Savchuk y col., 2001).

Tabla 3. Concentración (mg/L) de derivados cetónicos y aldehídicos del mezcal de la Barrica 1 a diferentes tiempos de reposo.

Comp.	B1 (47 días)	B1 (75 días)	B1 (110 días)	B1 (131 días)	B1 (175 días)	B1 (195 días)	B1 (207 días)
1	37.79±2.47	32.88±4.33	35.02±5.09	26.18±4.36	30.86±3.61	27.19±5.47	29.76±3.18
2	1.22±0.12	1.79±0.51	1.20±0.04	1.55±0.14	1.82±0.88	1.81±0.09	2.19±0.24
3	0.35±0.06	0.33±0.04	0.41±0.02	0.39±0.05	0.48±0.02	0.50±0.05	0.34±0.06
4	48.816±3.30	45.72±3.07	42.18±7.59	45.16±9.88	52.90±12.08	44.88±8.40	50.41±2.37
5	2.59±0.59	4.37±0.63	2.06±0.767	3.76±1.36	3.40±0.18	2.40±0.42	2.99±0.60
6	2.96±0.27	2.04±0.12	2.39±0.01	2.32±0.99	3.53±1.57	2.12±0.24	1.92±0.10
7	1.42±0.15	1.26±0.04	1.28±0.02	1.18±0.09	1.21±0.31	1.28±0.02	1.16±0.05
8	1.19±0.15	1.31±0.06	1.46±0.06	1.53±0.07	1.30±0.21	1.54±0.10	1.12±0.18
9	0.33±0.06	0.26±0.03	0.27±0.06	0.28±0.01	0.36±0.04	0.30±0.03	0.27±0.01
10	0.36±0.05	0.37±0.02	0.29±0.05	0.31±0.04	0.52±0.11	0.32±0.01	0.47±0.08

Los valores representan la media y la desviación estándar de tres repeticiones

Tabla 4. Concentración (mg/L) de derivados cetónicos y aldehídicos del mezcal de la Barrica 4 a diferentes tiempos de reposo.

Comp.	B4 (47 días)	B4 (75 días)	B4 (110 días)	B4 (131 días)	B4 (175 días)	B4 (195 días)	B4 (207 días)
1	31.67±3.06	31.96±2.16	32.71±2.97	33.14±2.46	33.836±2.11	30.17±2.49	29.71±3.12
2	0.99±0.20	0.65±0.04	0.75±0.11	0.87±0.11	2.00±0.19	1.06±0.18	1.09±0.07
3	1.29±0.11	1.25±0.07	2.15±0.06	2.20±0.05	0.71±0.03	0.70±0.17	0.78±0.15
4	42.36±1.13	38.7±9.16	42.48±9.23	45.23±6.78	46.84±4.90	43.05±6.99	43.03±5.18
5	2.24±0.93	2.45±0.36	2.11±0.20	2.45±0.35	2.05±0.09	2.91±0.43	2.35±0.21
6	2.31±0.13	2.51±0.44	2.43±0.36	1.81±0.11	1.99±0.25	1.43±0.22	1.99±0.21
7	1.93±0.64	2.97±0.06	2.72±0.39	3.89±0.21	1.77±0.14	1.55±0.262	3.21±0.39
8	1.61±0.09	0.42±0.08	1.16±0.16	0.913±0.19	1.46±0.10	1.21±0.26	1.08±0.13
9	0.32±0.02	0.32±0.02	0.30±0.02	0.30±0.01	0.29±0.02	0.30±0.02	0.27±0.03
10	0.31±0.00	0.31±0.06	0.43±0.07	0.56±0.08	0.44±0.06	0.35±0.05	0.41±0.06

Los valores representan la media y la desviación estándar de tres repeticiones

Tabla 5. Concentración (mg/L) de derivados cetónicos y aldehídicos del mezcal de la Barrica 7 a diferentes tiempos de reposo.

Comp.	B7 (47 días)	B7 (75 días)	B7 (110 días)	B7 (131 días)	B7 (175 días)	B7 (195 días)	B7 (207 días)
1	34.37±6.89	34.66±5.98	34.70±1.77	33.25±2.85	31.14±2.38	26.79±4.98	31.50±2.19
2	0.93±0.14	1.4±0.08	1.32±0.22	1.62±0.38	1.89±0.15	1.4±0.23	2.72±0.44
3	0.87±0.08	1.02±0.22	0.75±0.09	0.99±0.14	0.47±0.08	0.47±0.11	0.57±0.07
4	44.71±2.041	36.3±4.40	39.78±2.85	44.69±11.96	40.79±6.73	48.28±2.63	45.36±11.12
5	2.19±0.08	2.16±0.14	2.04±0.24	2.41±0.27	2.48±0.36	2.38±0.25	2.65±0.32
6	2.09±0.04	1.92±0.14	1.75±0.22	1.54±0.23	3.26±0.24	2.13±0.13	1.85±0.52
7	2.18±0.10	2.49±0.29	1.67±0.35	1.46±0.31	1.73±0.28	1.30±0.04	1.73±0.52
8	1.17±0.06	0.88±0.22	2.04±0.33	1.43±0.38	1.35±0.26	1.53±0.12	1.14±0.08
9	0.28±0.03	0.32±0.03	0.31±0.03	0.31±0.025	0.29±0.01	0.29±0.01	0.28±0.01
10	0.29±0.03	0.32±0.03	0.35±0.06	0.41±0.13	0.43±0.11	0.36±0.10	0.41±0.06

Los valores representan la media y la desviación estándar de tres repeticiones

No se encontró una clara correlación entre la concentración de los compuestos orgánicos y el tiempo de reposo del mezcal. Los valores de los índices de correlación entre el tiempo de reposo y la concentración del compuesto 4, que fue el más altamente concentrado y que estuvo presente en todas las muestras analizadas, fueron $r = 0.1483$, $r = 0.1923$ y $r = 0.2810$ para la barrica 1, la barrica 4 y la barrica 7, respectivamente (Figuras 26 a 28). Esto sugiere que la composición de derivados cetónicos y aldehídicos es muy estable en el mezcal de Durango, con ligeros cambios en su concentración a lo largo del tiempo de reposo. Esa estabilidad sugiere que la composición queda definida prácticamente desde que el destilado es obtenido, como producto principalmente de las condiciones de cocción y fermentación, como lo afirman Vallejo-Córdoba y col. (2004), y contrario a lo que afirman Pérez-Coello y col. (1988) acerca de que la madera de las barricas es una fuente importante de estos compuestos, las bajas correlaciones entre el tiempo de reposo y la concentración de los aldehídos y cetonas del mezcal de Durango sugieren que esa contribución es mínima.

Las diferencias entre los perfiles de derivados cetónicos y aldehídicos reportados para tequila (Muñoz y col., 2005) y los encontrados en este trabajo, los cuales fueron muy diferentes en términos cualitativos y cuantitativos, sugieren que esos perfiles pueden ser elementos de tipificación y autenticidad entre mezcales. Sin embargo, la baja correlación entre las concentraciones de los compuestos orgánicos y los tiempos de reposo, y la conservación cualitativa de los perfiles a lo largo del tiempo de almacenamiento, sugieren que éstos no serían indicadores de la edad de reposo del mezcal de Durango.

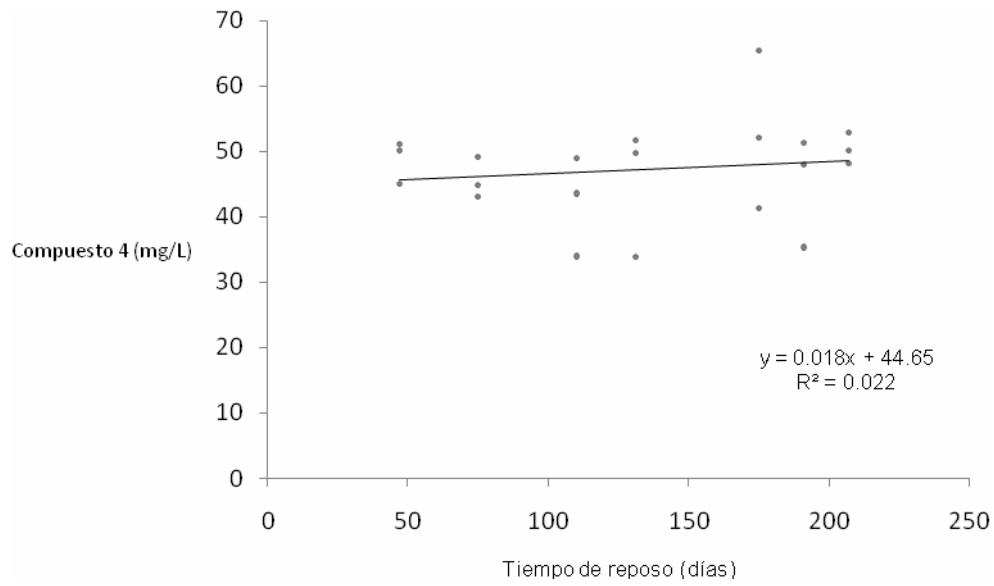


Figura 26. Correlación entre la edad de reposo del mezcal de la barrica 1 y la concentración del compuesto 4.

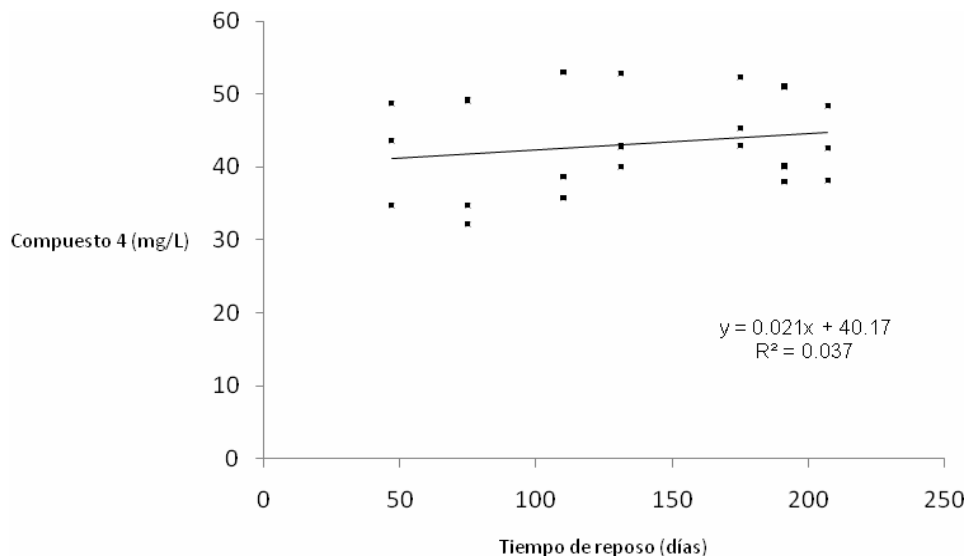


Figura 27. Correlación entre la edad de reposo del mezcal de la barrica 4 y la concentración del compuesto 4.

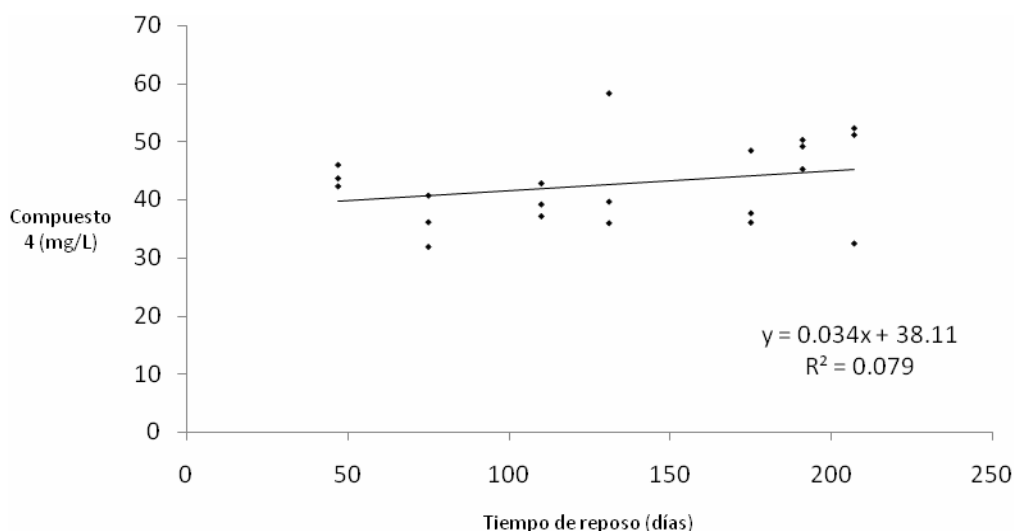


Figura 28. Correlación entre la edad de reposo del mezcal de la barrica 7 y la concentración del compuesto 4.

Los resultados de la cuantificación de derivados cetónicos y aldehídicos a diferentes tiempos de reposo en cada una de las barricas fueron también sometidos a un análisis estadístico multivariado. Este análisis indicó diferencias significativas entre las concentraciones de esos compuestos ($F_{(9,20)} = 301.44$, $p=0.0001$). La prueba de Duncan enfatiza lo mostrado en las Tablas 3, 4 y 5 sobre la predominancia de los compuestos 4 y 1 en las tres barricas analizadas. El análisis multivariado muestra la formación de tres grupos en la barrica 1, en el primero se encuentra el compuesto 4, que es el más concentrado; en el segundo grupo el compuesto 1, que es el segundo más concentrado; y en el tercero se agrupan los ocho compuestos restantes. El comportamiento de la concentración de derivados aldehídicos y cetónicos a lo largo del tiempo de reposo de la barrica 1, obtenido por este análisis, se muestra en la Figura 29.

Para la barrica 4 también se encontraron diferencias significativas ($F_{(9,20)} = 1440.07$, $p=0.0001$) y la prueba de Duncan indicó la formación de cuatro grupos, en el primero se encuentra el compuesto 4 con la mayor concentración, en el segundo grupo el compuesto 1, en el grupo tres se ubicaron los compuestos 2,3,6,5,7,y 8 y finalmente en el grupo cuatro están ubicados los compuestos 9 y 10 (Figura 30).

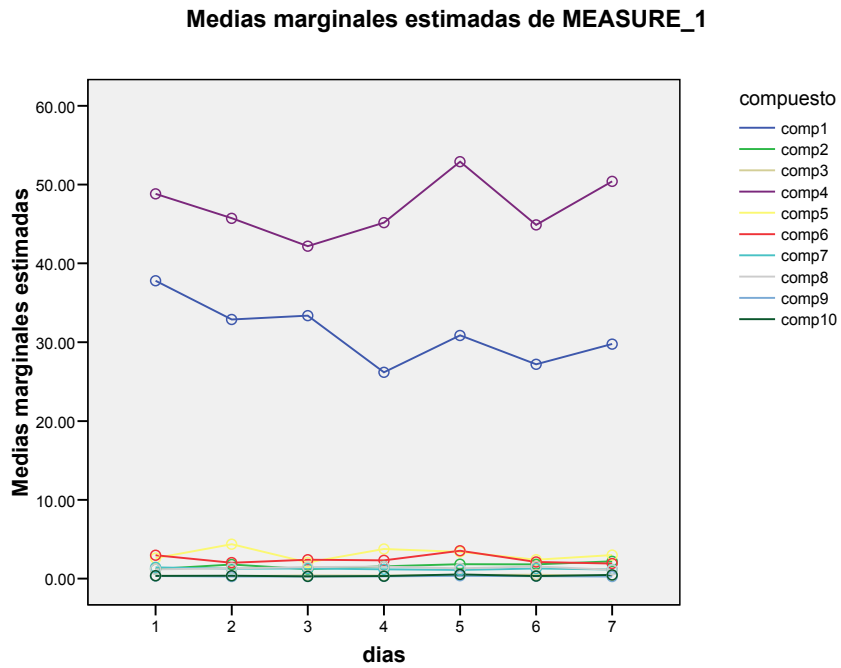


Figura 29. Comportamiento de la concentración de derivados aldehídicos y cetónicos a lo largo del tiempo de reposo de la barrica 1.

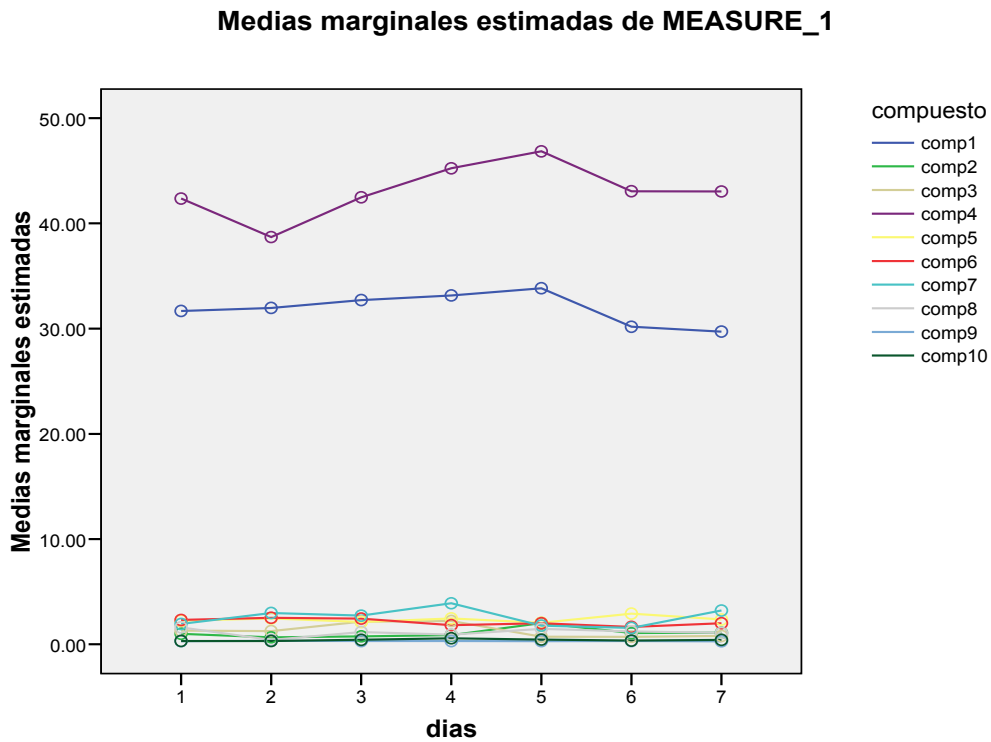


Figura 30. Comportamiento de la concentración de derivados aldehídicos y cetónicos a lo largo del tiempo de reposo de la barrica 4.

El análisis estadístico multivariado de la concentración de compuestos fenólicos a lo largo del tiempo de almacenamiento para la barrica 7 mostró también diferencias significativas ($F_{(9,20)} = 5036.35$, $p=0.0001$) y la prueba de Duncan indicó la formación de cinco grupos, en el primero se encuentra el compuesto 4 con la mayor concentración, en el segundo grupo el compuesto 1, en el tercero se ubicaron los compuestos 2, 5, 6, y 7, en el cuarto grupo el compuesto 8 y finalmente en el grupo quinto los compuestos 3, 9 y 10 (Figura 31).

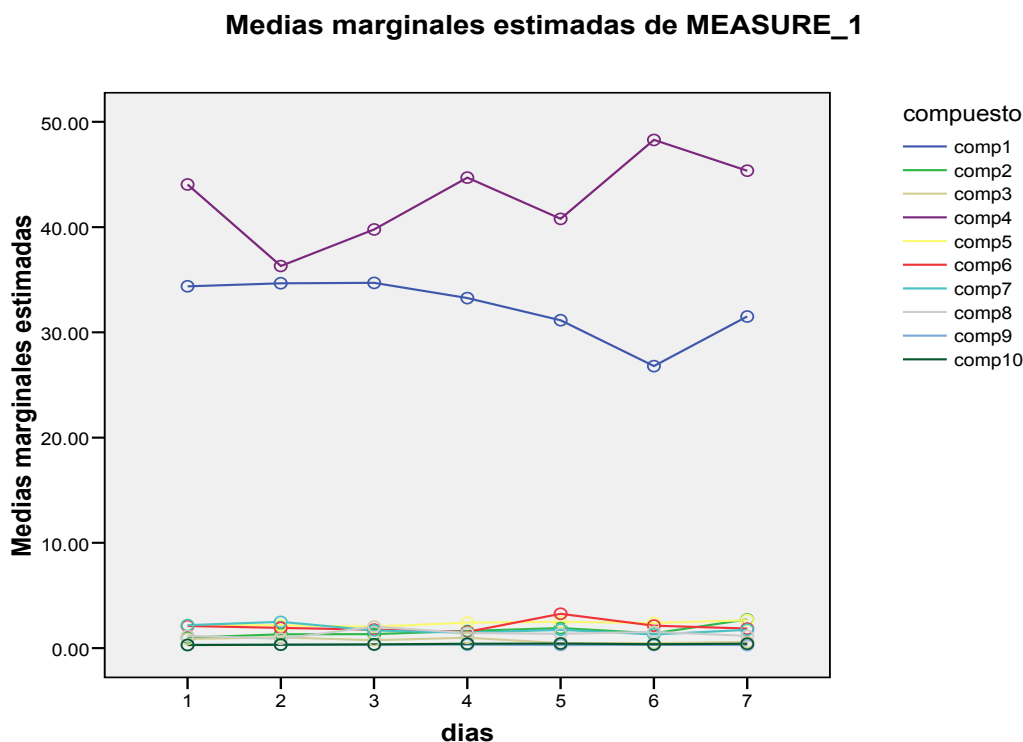


Figura 31. Comportamiento de la concentración de derivados aldehídicos y cetónicos a lo largo del tiempo de reposo de la barrica 7.

Cuando se compara la concentración de cada compuesto en las tres barricas a lo largo del tiempo de reposo se obtienen los datos presentados en la Tabla 6.

Tabla 6. Comparación de las concentraciones de derivados cetónicos y aldehídicos del mezcal de Durango almacenado en tres diferentes barricas.

Compuesto	Diferencias significativas	Valor de F	Grupos formados
1	No encontrada	-	-
2	Encontrada	$F_{(2,6)} = 13.1, p=0.006$	Barrica 7,1 vs. barrica 4
3	Encontrada	$F_{(2,6)} = 752.69, p=0.0001$	Barrica 4 vs. barrica 7, barrica 1
4	No encontrada	-	-
5	Encontrada	$F_{(2,6)} = 19.50, p=0.002$	Barrica 1 vs. barrica 4, barrica 7
6	Encontrada	$F_{(2,6)} = 5.54, p=0.038$	Barrica 1 vs. barrica 4, barrica 7
7	Encontrada	$F_{(2,6)} = 251.9, p=0.0001$	Barrica 4 vs. barrica 7, barrica 1
8	Encontrada	$F_{(2,6)} = 6.9, p=0.027$	Barrica 7, barrica 1 vs. barrica 4
9	No encontrada	-	-
10	No encontrada	-	-

Del análisis multivariado resalta que los compuestos 1, 4, 9 y 10, que no presentaron diferencias significativas en sus concentraciones a lo largo de tiempo de reposo en las tres barricas analizadas, podrían representar marcadores químicos de identidad para el mezcal de Durango a cualquier tiempo de reposo.

La variación en los demás compuestos, dependiendo de la barrica de la que la muestra de mezcal fue tomada para su análisis, como es el caso del compuesto 6, el cual se detectó a mayor concentración en la barrica 1 (entre 1.92 y 3.53 mg/L) que en las barricas 4 y 7 (entre 1.43 y 2.51, y entre 1.54 y 3.26 mg/L, respectivamente), en las cuales no se presentaron diferencias estadísticas, sugiere que el mezcal de Durango debe considerarse, al igual que otras bebidas reposadas, un sistema dinámico (Silva y Malcata, 1998; Jiménez y Ancín, 2006), en el cual están ocurriendo cambios cuantitativos e incluso cualitativos, a lo largo del tiempo de reposo, de los diferentes compuestos químicos presentes. Esos cambios pueden deberse a procesos de oxidación lenta, formación de complejos, y a efectos de diferencias de microambientes en relación a la temperatura y la humedad (Marais y Pool, 1980) entre las diferentes áreas de la bodega de almacenamiento.

5.3 Presencia de metales

Doce muestras de mezcal con cuatro diferentes tiempos de reposo se analizaron para detectar la presencia de As, Pb, Cd, Cu, Fe, y Zn. Los resultados correspondientes se presentan en la Tabla 7.

El único elemento cuya concentración se encontró que rebasó, en 6 de las 12 muestras analizadas, los límites permisibles por las normas mexicanas (NOM-142-

SSA1-1995-bebidas alcohólicas y NOM-117-SSA1-1994-agua potable) fue el Cd. Este y cualquier otro elemento se incorpora a las bebidas alcohólicas a partir de diferentes fuentes, como el material metálico con el que están elaborados los alambiques y los recipientes de almacenamiento, y el agua misma utilizada para lavados de la materia prima, de los recipientes, o la utilizada para la dilución de las bebidas destiladas. La materia prima a partir de la cual se elabora una bebida también puede ser fuente de metales que son acarreados al producto elaborado final, debido a que las plantas, en este caso los agaves, pueden absorber, translocar y almacenar minerales directamente del sustrato de crecimiento (Taiz y Zeiger, 2003), y de contaminantes o de agroquímicos adicionados (Salvo y col., 2003). La presencia de Cd ha sido evaluada en otras bebidas alcohólicas comercializadas en España, como vino, en el cual se encuentra presente entre 0.10 a 15.38 $\mu\text{g/L}$; en cerveza, a niveles no detectable y 0.80 $\mu\text{g/L}$; y en otras bebidas como sidra, brandy, ron, y whisky, con valores desde no detectable hasta 11.52 $\mu\text{g/L}$ (Mena y col., 1996). De acuerdo a los resultados de esos autores, los vinos y el último grupo de bebidas mencionadas podrían contener niveles de dos a tres veces lo señalado por la Norma Mexicana que rige el agua potable (NOM-117-SSA1-1994-agua potable).

Tabla 7. Concentraciones de As, Pb, Cd, Cu, Fe y Zn presentes en las diferentes muestras de mezcal.

Barrica	Tiempo reposo (días)	As ($\mu\text{g/L}$)	Pb ($\mu\text{g/L}$)	Cd ($\mu\text{g/L}$)	Cu ($\mu\text{g/L}$)	Fe ($\mu\text{g/L}$)	Zn (mg/L)
1	33	0.221 \pm 0.000	0.768 \pm 0.217	1.786 \pm 0.505	12.525 \pm 0.612	48.844 \pm 14.000	Nd
1	47	5.009 \pm 0.340	1.229 \pm 0.000	6.428 \pm 1.010	18.789 \pm 1.061	78.141 \pm 28.000	0.836 \pm 0.045
1	61	1.403 \pm 0.170	2.073 \pm 0.326	9.286 \pm 0.000	17.577 \pm 0.163	58.609 \pm 0.000	Nd
1	89	0.682 \pm 0.339	5.683 \pm 0.000	32.678 \pm 0.253	4.182 \pm 0.327	9.781 \pm 0.000	1.120 \pm 0.298
4	33	Nd	0.691 \pm 0.109	Nd	11.341 \pm 0.245	39.078 \pm 0.000	Nd
4	47	0.201 \pm 0.000	1.843 \pm 0.434	0.893 \pm 0.053	5.452 \pm 0.082	68.375 \pm 41.000	Nd
4	61	Nd	1.459 \pm 0.326	4.286 \pm 1.010	14.517 \pm 0.980	87.906 \pm 14.000	Nd
4	89	1.040 \pm 0.170	3.379 \pm 0.217	6.428 \pm 0.000	12.595 \pm 0.122	39.078 \pm 28.000	Nd
7	33	Nd	0.230 \pm 0.109	0.893 \pm 0.253	23.150 \pm 0.163	58.609 \pm 0.000	Nd
7	47	0.442 \pm 0.034	2.381 \pm 0.326	1.964 \pm 0.253	10.562 \pm 0.531	48.844 \pm 14.000	0.678 \pm 0.030
7	61	Nd	4.838 \pm 0.326	9.286 \pm 0.505	18.270 \pm 0.245	58.609 \pm 0.000	Nd
7	89	0.201 \pm 0.000	10.829 \pm 0.326	20.714 \pm 0.000	14.892 \pm 0.204	78.141 \pm 0.000	Nd
Máx. perm*		500 $\mu\text{g/L}$	500 $\mu\text{g/L}$	Nr	2000 $\mu\text{g/L}$	Nr	1.5 mg/L
Máx. per**		50 $\mu\text{g/L}$	25 $\mu\text{g/L}$	5 $\mu\text{g/L}$	2000 $\mu\text{g/L}$	300 $\mu\text{g/L}$	5 mg/L

Los valores representan la media y desviación estándar para dos muestras independientes

Nd = no detectada

nr = no reportado

* NOM-142-SSA1-1995-bebidas alcohólicas (máximo permisible)

** NOM-117-SSA1-1994-agua potable (máximo permisible)

El Cu es uno de los elementos que de acuerdo a Carreón-Álvarez y col. (2008) deberían ser estrictamente regulados por los efectos negativos que proporciona a las bebidas alcohólicas y por los daños que provoca a la salud humana. Aunque las normas NOM-142-SSA1-1995-bebidas alcohólicas y NOM-117-SSA1-1994-agua potable consideran un máximo permisible de este elemento de 2000 µg/L, y todas las muestras de mezcal analizadas quedaron muy por debajo de esos niveles, los contenidos de Cu encontrados para el mezcal de Durango fueron en 10 de las 12 muestras analizadas, mayores que los encontrados para tequila (< 10 µg/L) por esos mismos autores.

Todos los elementos analizados en las muestras del mezcal de Durango han sido detectados en otras bebidas alcohólicas (Ibanez y col., 2008) y aunque su presencia en ellas puede tener varios orígenes, el equipo usado en el proceso de elaboración es la principal fuente (Pohl, 2007), por lo que control en la naturaleza del equipo empleado sería un aspecto importante en la regulación de la presencia de metales en el mezcal y en cualquier otra bebida alcohólica.

De acuerdo a la Tabla 7, una variación en la concentración de todos los elementos analizados ocurre a lo largo del tiempo de reposo de las tres barricas. No se observa una tendencia clara de aumento de la concentración de esos elementos con el aumento del tiempo que el mezcal es almacenado dentro de las barricas para todos los metales analizados, sin embargo una tendencia de este tipo se puede encontrar en las tres barricas con respecto a Pb y Cd. La tendencia de aumento en la concentración de ambos elementos sugiere que éstos pueden estarse adicionando al mezcal de una fuente constante que puede ser la madera misma de las barricas, ya que ésta proviene de una planta (*Quercus alba*), y la absorción y almacenamiento de metales en diferentes tejidos, ha sido mencionado para varias especies vegetales por Taiz y Zeiger (1991) y Ghosh y Singh (2005). Kirkham (2006) reporta que es sorprendente los elevados niveles de Cd que pueden ser encontrados en las plantas que crecen en suelos contaminados.

La variación de las concentraciones de As, Cu, Fe y Zn, las cuales no muestran tendencia alguna hacia aumento o disminución es difícil de explicar, sin embargo, podría deberse a que cuando las barricas se humedecen (esta práctica se realiza durante todo el tiempo que las barricas pasan en las bodegas), los cinchos metálicos que éstas poseen sufren corrosión y diferentes elementos presentes en ellos logren atravesar la madera y alcanzar el líquido interno. Un reporte de elementos producto de la corrosión de contenedores de metal que se incorporan al licor es mencionado por Ibanez y col. (2008) para vodka. Ese movimiento de metales desde los cinchos hacia el mezcal no sería constante, ocurriría solamente cada que las barricas fueran

mojadas. Por otro lado, ha sido reportado que los metales en la matriz alcohólica de las bebidas forman complejos orgánicos solubles con fenoles (Green y col., 1997) y cetonas (Blanco y col., 2003) en una forma dinámica.

La presencia de elementos diferentes a los analizados en este estudio para mezcal, como el Al, ha sido revisada para otras bebidas alcohólicas, como vino, cerveza, y otras como sidra, brandy, ron y whisky, entre otras, encontrándose valores que oscilan entre 94.8 a 1682.6, 36.5 a 795.2, y 15.7 a 739.6 $\mu\text{g/L}$, respectivamente (Lopez y col., 1998). Sin embargo, este elemento no sería relevante por el momento para el mezcal de Durango, ya que éste no tiene una presentación comercial en envases de lata, que es, de acuerdo a esos autores, la principal fuente de Al en esas bebidas alcohólicas.

La presencia de metales, en cantidades inocuas en bebidas puede tener efectos positivos, ya que actúan como removedores de olores y sabores desagradables (Green col, 1997), pueden favorecer los procesos fermentativos (Akrida-Demertzi y Koutinas, 1992), pueden ser minerales esenciales para la alimentación humana (Mayer y col., 2003), y además la composición de esos elementos puede representar un parámetro de calidad y autenticidad, como ha sido propuesto por Kokkinofta y col. (2003) para una bebida destilada griega.

5.4 Composición fenólica

5.4.1 Contenido de fenoles totales

Los cambios en las concentraciones fenólicas que ocurrieron durante el periodo de reposo del mezcal de Durango en tres diferentes barricas se midieron durante 207 días (aproximadamente siete meses). La Tabla 8 muestra los valores medios para las concentraciones de fenoles totales detectadas en cada barril.

Tabla 8. Concentración de fenoles totales en mezcal reposado en tres diferentes barriles.

Reposo (días)	Contenido de fenoles totales (mg/L)		
	B1	B4	B7
0	0	0	0
26	179.46±12.25	225.12±3.81	238.14±0.45
33	213.10±10.23	253.96±4.99	239.54±4.99
47	261.18±1.44	280.37±1.02	271.89±5.92
68	293.39±4.63	352.05±10.09	374.65±4.15
75	304.45±0.00	362.63±1.66	389.07±21.65
89	338.11±7.94	393.88±20.03	415.03±19.68
96	329.76±9.03	394.36±16.21	415.03±2.20
103	358.78±12.09	423.20±23.44	450.61±9.38
110	378.01±4.32	436.67±32.45	461.19±16.71
117	387.63±0.83	462.15±17.80	485.23±11.65
124	405.90±7.25	478.98±14.20	515.04±10.40
131	514.56±22.54	484.75±16.06	520.80±30.00
138	548.21±30.60	513.59±5.21	536.68±10.89
159	566.02±10.23	630.91±27.98	615.041±15.88
175	588.60±49.29	671.78±20.00	731.40±9.00
195	637.16±13.63	744.85±44.04	797.75±27.63
207	779.90±3.81	838.62±6.66	938.62±2.20

Los valores representan la media de las muestras analizadas por triplicado \pm desviación estándar. B1: barril 1, B4: barril 4, B7: Barril 7.

Se observaron incrementos continuos en las concentraciones de fenoles totales. De acuerdo a los resultados presentados en la Tabla 8, la concentración de fenoles totales que el mezcal de Durango puede alcanzar a los 207 días (séptimo mes) de reposo en barricas de roble blanco varía de 779.90 a 938.62 mg/L, con un promedio de 852.38 ± 80.24 mg/L. Estos valores representan alrededor del 43.4% de la concentración encontrada en vino tinto reposado durante 12 meses en barricas de encino español (Hernández col, 2007) y alrededor del 26 % más de la concentración reportada para brandis añejados durante cuatro años en barricas de encino de Limousin, Francia (Canas y col., 2008).

Se observaron diferencias significativas entre los niveles de fenoles de cada barril ($p < 0.05$). Las Tablas 9 y 10 muestran los resultados del análisis de varianza y de discriminación de medias, respectivamente. Esos resultados indican que el origen botánico de la madera y los procedimientos de manufactura de los barriles pueden afectar la composición fenólica del mezcal reposado. Efectos debidos a estos dos aspectos han sido reportados para vino (Monagas y col., 2005; Peña-Neira y col., 2000).

Tabla 9. Análisis de varianza de dos factores de los resultados de los contenidos de fenoles totales de muestras de mezcal reposados en diferentes barricas durante intervalos variables de tiempo

Fuente de variación	SC	GL	CM	F	P
Barrica	154591.9158	2	77295.9579	279.6579	***
Tiempo de reposo	4346527.9781	16	271657.9986	982.8628	***
Barrica x Tiempo de reposo	74146.7457	32	2317.0858	8.3832	***
Error	28192.2515	102	276.3946		
Total	4603458.8913	152			

Considerar que *** representa el valor de $p=0.0001$

Tabla 10. Análisis de Duncan de discriminación de medias para los valores de las concentraciones de fenoles totales de las muestras de mezcal reposadas en diferentes barricas.

Barrica	n	Media
7	51	493.8692a
4	51	467.5260b
1	51	417.2441c

Nivel de significancia: 95%

Los resultados de los contenidos de fenoles totales se sometieron también a un análisis multivariado. Se corroboraron las diferencias estadísticas significativas en las concentraciones de fenoles a lo largo del tiempo entre las muestras de mezcal de cada una de las tres barricas ($F_{(2,6)} = 157.2$, $p < 0.0001$). La prueba *a posteriori* de Duncan indicó que se formaron tres grupos con las características que se presentan en la Tabla 11.

Tabla 11. Prueba a posteriori de Duncan para la discriminación de medias del contenido de fenoles entre las barricas de reposo.

Barrica	n	Grupos formados		
		2	3	1
Barrica 1	3	417.2441		
Barrica 4	3		467.5261	
Barrica 7	3			493.8688

*Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

La gráfica que se obtuvo del contenido total de fenoles con respecto al tiempo se presenta en la Figura 32.

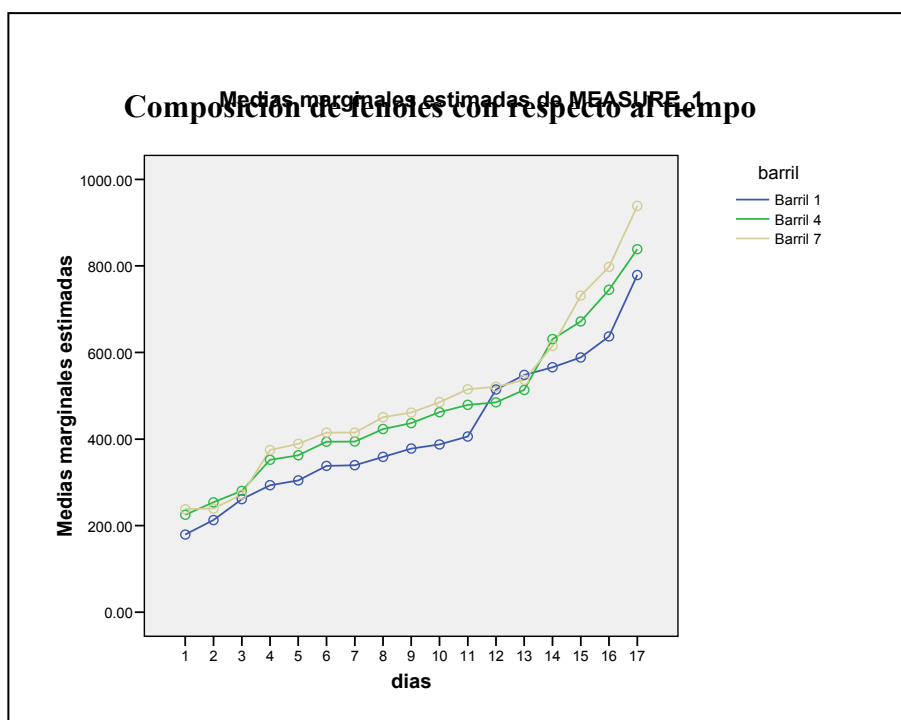


Figura 32. Comportamiento independiente de la concentración de fenoles totales en cada barrica, mostrando una tendencia similar en las tres.

La formación de tres grupos diferentes indica que el origen botánico de la madera y los procedimientos de manufactura de los barriles pueden afectar la composición fenólica del mezcal reposado. Sin embargo, esas variaciones en la composición fenólica son difíciles de controlar porque los efectos del origen de la madera del barril pueden ser diferentes sobre los distintos compuestos fenólicos presentes en las bebidas reposadas, esta variación se ha sido reportado para los diferentes fenoles del vino tinto (Hernández y col., 2007), y debido a la variabilidad intrapoblacional natural en la composición fenólica, como en cualquier otra característica, de la madera de encino (Doussot y col., 2000). Sin embargo, habría que realizar otras pruebas controlado al

máximo el origen de las barricas, de tal forma que se tenga la certeza de que el origen botánico de la madera sea el mismo.

Diferencias significativas en los niveles de fenoles también se observaron entre los diferentes tiempos de reposo ($p < 0.05$). Los resultados del análisis de discriminación de medias se muestran en la Tabla 12. Estos resultados sugieren que la concentración de fenoles puede ser específica para cada tiempo de reposo y de este modo, las concentraciones de fenoles podrían ser consideradas como parámetros de calidad para garantizar el tiempo de reposo del mezcal.

Tabla 12. Prueba de rango múltiple de Duncan de los resultados obtenidos en el Análisis de discriminación de medias para los valores de las concentraciones de fenoles totales de las muestras de mezcal reposadas en diferentes barricas durante intervalos variables de tiempo.

Tiempo (días)	n	Media
26	9	852.08444 a
33	9	726.5933 b
47	9	663.93111 c
68	9	603.9955 d
75	9	532.8288 e
89	9	506.7066 f
96	9	466.6422 g
103	9	445.0077 h
110	9	425.2944 i
117	9	410.8700 i
124	9	382.9833 j
131	9	382.3422 j
138	9	352.0511 k
159	9	340.0322 k
175	9	271.1488 l
195	9	235.5377 m
207	9	214.2400 n

5.4.2 Análisis de HPLC/DAD

Bajo las condiciones experimentales en las cuales los perfiles HPLC fueron obtenidos, patrones formados por derivados de ácidos fenólicos y flavonoides fueron los únicos compuestos fenólicos encontrados (Tabla 13). Tanto los ácidos fenólicos como los flavonoides son compuestos con un amplio espectro de actividad biológica (Formica y Regelson, 1995; Campos, 1997), incluyendo una importante actividad antioxidante (Almaraz-Abarca y col., 2004; Almaraz-Abarca y col., 2007).

Un total de 11 fenoles principales fueron detectados, tres flavonoides y ocho ácidos fenólicos (Tabla 13). Entre los flavonoides, dos fueron flavonas y uno fue dihidroflavonoide (Figura 33). Entre los ácidos fenólicos, se detectaron derivados del ácido benzoico y del ácido hidroxicinámico (Figura 34).

Tabla 13. Principales compuestos fenólicos encontrados en el mezcal de Durango reposado en barriles de madera de encino.

Número de compuesto	Tiempo de Retención (min)	Nombre y/o tipo de compuesto
1	29.063±0.057	ácido siringico
2	34.384±0.155	ácido fenólico
3	39.592±0.037	derivado de ácido hidroxicinámico
4	40.244±0.110	flavona glicósido
5	42.875±0.027	ácido benzoico
6	43.109±0.024	ácido sinápico
7	44.706±0.001	luteolina glicósido
8	45.770±0.044	derivado de ácido benzoico
9	47.102±0.098	dihidroflavonoide
10	47.536±0.065	derivado de ácido hidroxicinámico
11	47.993±0.000	derivado de ácido benzoico

Los valores representan la media \pm desviación estándar

A diferencia de lo encontrado para la composición de derivados cetónicos y aldehídicos, los perfiles fenólicos aumentaron en complejidad con el tiempo de reposo (Anexo 3). La composición de fenoles de los mezcales de 75 días de reposo contienen solamente dos compuestos principales, ambos ácidos fenólicos (Anexo 3). A partir de los 110 días de reposo la composición de fenoles del mezcal llega a ser más compleja; dos compuestos fenólicos más fueron detectados, ambos siendo flavonoides, una flavona glicósido y un dihidroflavonol (Anexo 3). Alcanzando los 207 días de reposo la composición de fenoles se conformó 10 a 11 elementos, siendo adicionados más ácidos fenólicos.

Se detectaron incrementos en las concentraciones de cada compuesto fenólico individual en las muestras de mezcal con respecto al tiempo de reposo. Contrario a lo reportado para otras bebidas alcohólicas, como los vinos (Vivas y Glories, 1996), donde algunos fenoles dan origen a diferentes compuestos, la correlación positiva (valores de r entre 0.7745 y 1) entre el incremento de concentración de prácticamente cada compuesto fenólico del mezcal y el tiempo de reposo, lo que indica que la extracción desde la madera hacia la solución alcohólica, es la principal causa del incremento de la complejidad de la composición fenólica durante el periodo de reposo analizado. Esto se explica debido a que el vino posee por si mismo una composición

fenólica muy compleja, que incluye antocianinas, las cuales reaccionan con otros fenoles en procesos de co-pigmentación durante el reposo (Boulton, 2001).

La complejidad de la composición fenólica del mezcal, aunque es importante no alcanza la del vino, formada por una mayor diversidad de fenoles, donde además de derivados de ácido benzoico y de ácido hidroxicinámico, un espectro mayor de flavonoides como flavonoles, flavan-3-ols, procianidinas y antocianinas pueden ser encontrados como una consecuencia de las uvas usadas para elaborar el vino y de las condiciones de vinificación (Cheynier y col., 1997; Goldberg y Soleas, 1999). Sin embargo, los fenoles encontrados en el mezcal de Durango, principalmente extractados de la madera del barril de añejamiento, pueden conferir importantes propiedades antioxidantes a esa bebida.

El mezcal elaborado de *Agave durangensis* mostró un perfil fenólico típico a cada determinado tiempo de reposo, de tal manera que esos perfiles podrían ser valiosos como marcadores de calidad con relación al tiempo de reposo para esta bebida alcohólica.

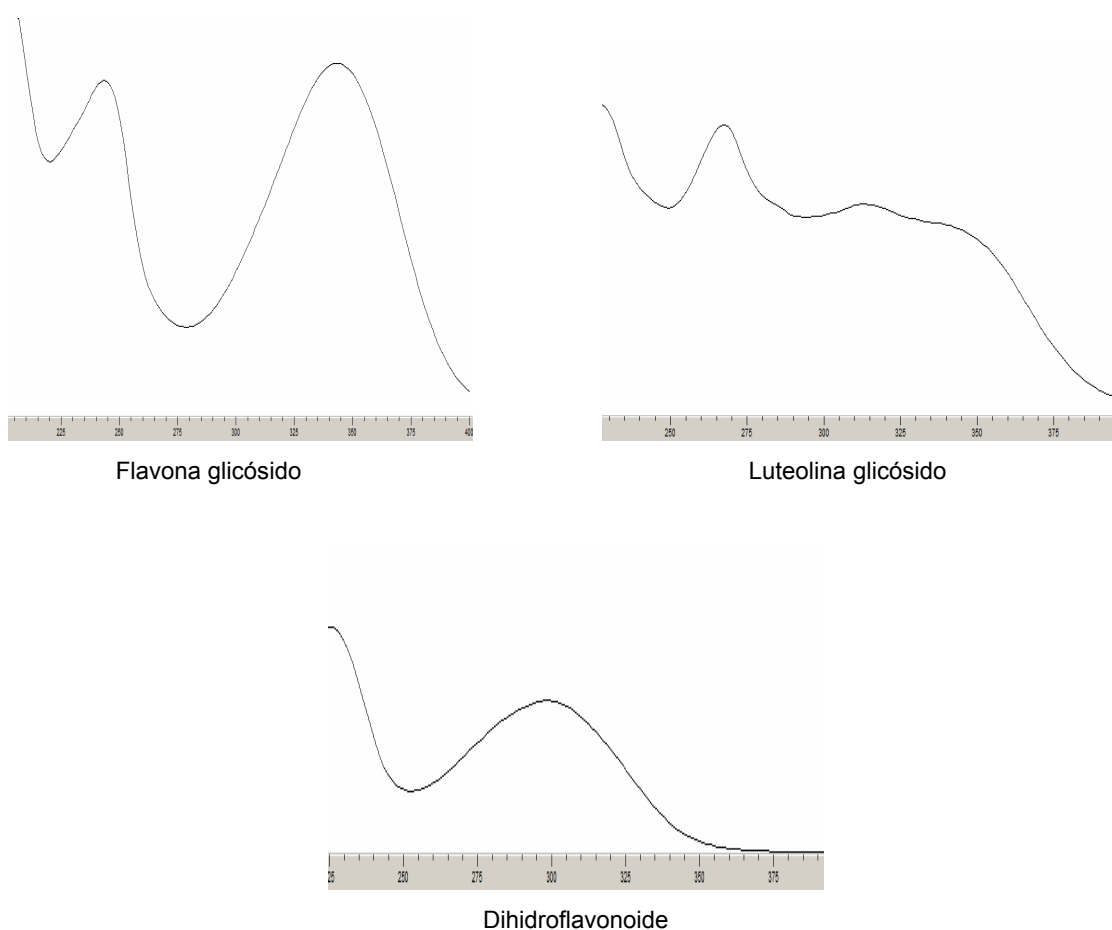


Figura 33. Flavonoides detectados en el mezcal de Durango

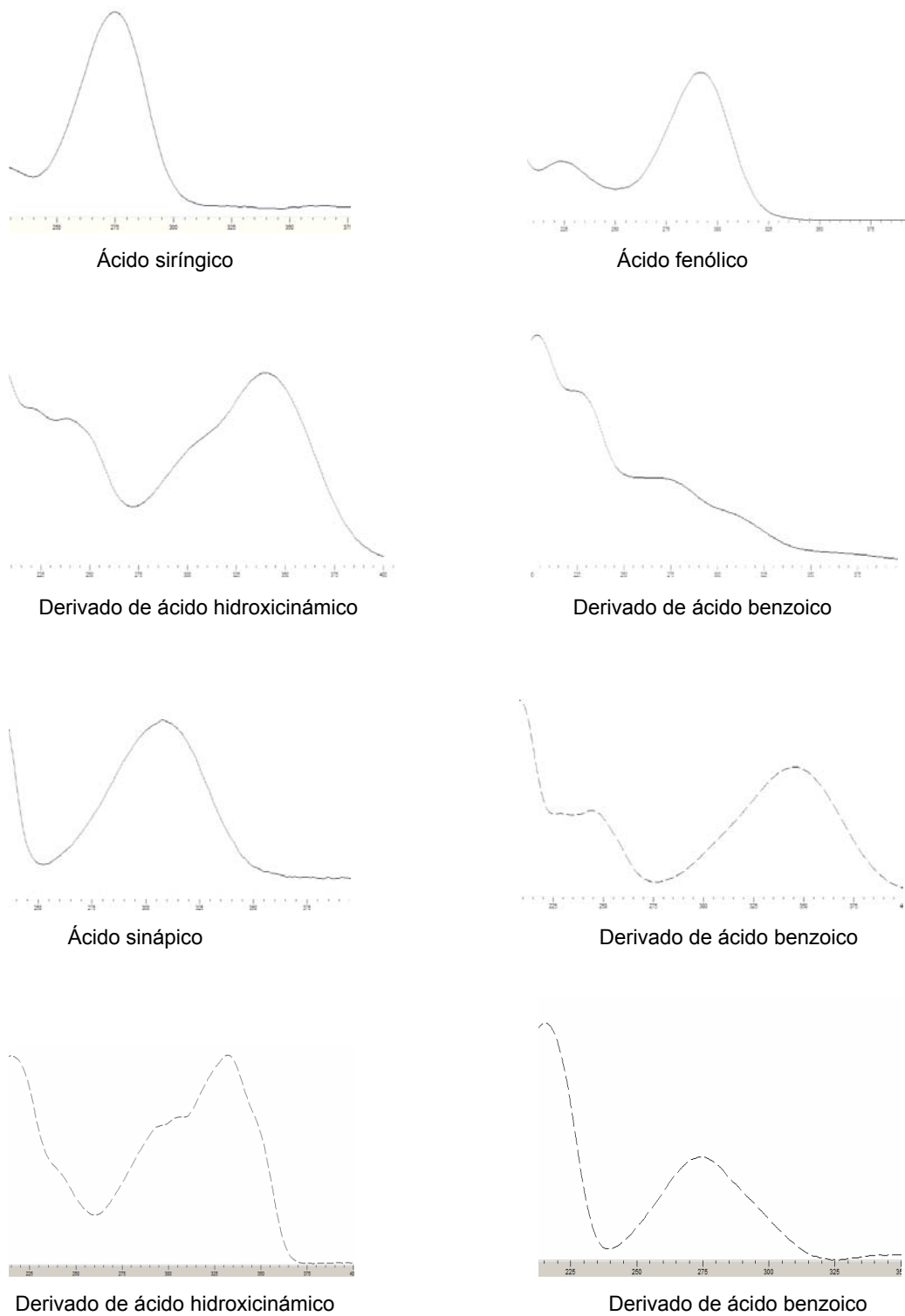


Figura 34. Ácidos fenólicos encontrados en el mezcal de Durango

5.5 Capacidad antioxidante

La Tabla 14 muestra los valores de EC_{50} de los compuestos de referencia evaluados. Entre los estándares, el ácido vanílico tuvo el valor más bajo de capacidad antioxidante como bloqueador de radicales libres ($EC_{50} = 335.527 \mu\text{g/mL}$) y el ácido tánico tuvo el más alto ($EC_{50} = 6.694 \mu\text{g/mL}$), este último sin diferencias significativas con el ácido ferúlico y el ácido gálico. Otros autores también han reportado un valor alto de capacidad bloqueadora de radicales libres para el ácido ferúlico (Brand-Williams y col., 1995).

Tabla 14. Actividad bloqueadora de radicales libres de los compuestos de referencia.

Compuesto	EC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
ácido vanílico	335.517 ± 4.992^a
ácido ferúlico	7.244 ± 0.173^b
ácido gálico	7.021 ± 0.087^b
ácido tánico	6.694 ± 0.057^b

Los valores representan la media de las muestras analizadas por triplicado \pm desviación estándar. Las letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Se observó una reducción de la concentración de DPPH* con relación al incremento de las concentraciones de fenoles en las tres muestras de mezcal. La reducción fue lineal y dependiente de la concentración de fenoles. De acuerdo con la clasificación del comportamiento cinético de Brand-Williams y col. (1995), las cinéticas de reacción del bloqueo del DPPH* con el aumento de la concentración de fenoles de una misma muestra de mezcal se consideró intermedia, debido a que tardó alrededor de 30 minutos para alcanzar el estado estacionario. El registro espectrométrico de la desaparición del DPPH* por la presencia del incremento de concentraciones de fenoles del mezcal del barril 1, a 131 días de reposo, se muestra en la Figura 35, como ejemplo de ese comportamiento. El comportamiento cinético de la desaparición del DPPH* estuvo claramente correlacionado con la concentración de fenoles como ha sido reportado para algunos compuestos fenólicos (Brand-Williams y col., 1995; Sánchez-Moreno y col., 1999). Sin embargo, una clara correlación entre el contenido de fenoles en mezcales con más tiempo de reposo y la actividad antirradicales libres parece ser más difícil de establecer. Resultados similares han sido reportados para el contenido de fenoles en polen y la actividad bloqueadora de radicales libres (Almaraz-Abarca y col., 2004).

Todas las muestras de mezcal fueron efectivos antioxidantes como bloqueadores de radicales libres, con niveles más altos de actividad, entre 47 y 207 días de reposo, que cualquiera de los estándares evaluados (Tablas 14 y 15). La actividad bloqueadora de radicales libres (EC_{50}) y el contenido de fenoles fueron calculados buscando una correlación entre esas dos medidas. Contrariamente a lo reportado para otras bebidas alcohólicas destiladas, como brandis, y para derivados, como vinagres de vinos (Alonso y col., 2004; Canas y col., 2008), no se encontró para el mezcal de Durango una correlación positiva entre el incremento de la actividad bloqueadora con el incremento del contenido de fenoles (Tabla 15). Estos resultados sugieren que la composición más que la concentración de fenoles podría definir la actividad bloqueadora de radicales libres en el mezcal elaborado a partir de *Agave durangensis*, reposado en barriles de encino blanco. En las muestras de mezcal reposado durante 206 días, la presencia de ácido benzoico y de ácido sinápico fue detectada en proporciones similares a la de otros fenoles (Anexo 3); en estos dos ácidos las sustituciones aromáticas *p*-hidroxidimetoxi y dihidroxi, las cuales proporcionan la actividad antioxidante a los ácidos fenólicos (Natella y col., 1999) están ausentes y así, estos dos nuevos componentes del perfil fenólico aunque contribuyen a incrementar la complejidad de los perfiles no mejorarían la capacidad antioxidante. Efectos antagonistas, similares a los que han sido reportados entre varios antioxidantes, incluidos fenoles, para extractos de diferentes vegetales (Pineda y col., 1999), podrían también ser la causa de la falta de incremento de la actividad bloqueadora de radicales libres en mezcales con más tiempo de reposo, los cuales muestran concentraciones más altas de fenoles.

La capacidad bloqueadora de radicales libres del mezcal de Durango puede establecerse entre $EC_{50} = 1.238$ a $EC_{50} = 6.564$ $\mu\text{g/mL}$ (Tabla 15), teniendo los mezcales reposados por más de 110 días, propiedades antioxidantes ligeramente más bajas.

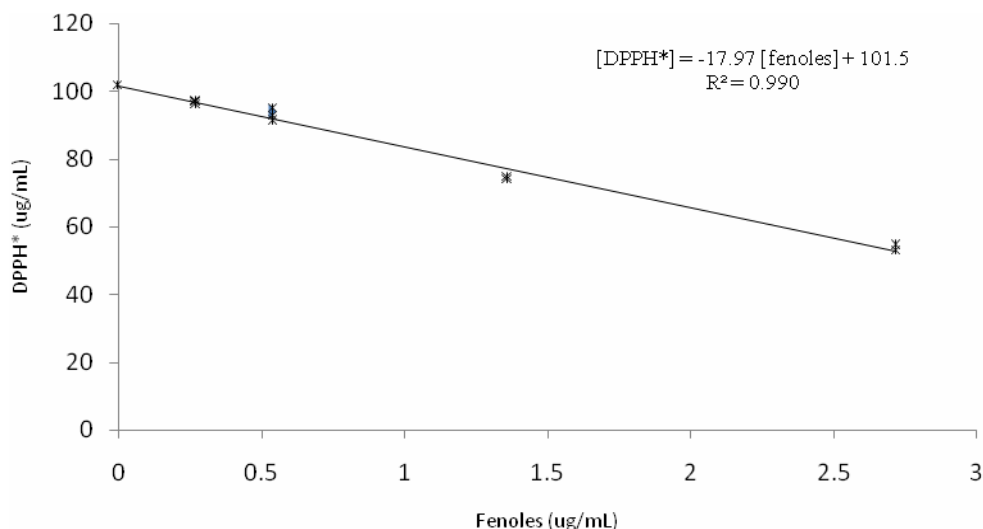


Figura 35. Desaparición del radical libre DPPH* con respecto al aumento de concentración de fenoles en alcúotas del mezcal del barril 1, a los 131 días de reposo

Tabla 15. Actividad bloqueadora de radicales libres del mezcal de Durango, a diferentes tiempos de reposo.

Reposo (días)	CE ₅₀ (µg/mL)		
	Barril 1	Barril 4	Barril 7
47	1.238 ± 0.111	1.444 ± 0.179	3.421 ± 0.471
75	1.279 ± 0.206	2.066 ± 0.150	1.889 ± 0.160
110	4.374 ± 0.093	3.676 ± 0.433	5.162 ± 0.241
131	2.815 ± 0.373	3.956 ± 0.621	3.853 ± 0.613
175	3.902 ± 0.153	3.197 ± 0.297	3.388 ± 0.149
195	3.908 ± 0.412	4.357 ± 0.416	4.542 ± 0.043
207	6.564 ± 0.208	6.065 ± 0.335	6.547 ± 0.150

Los valores corresponden a las medias de las muestras analizadas por triplicado ± desviación estándar.

El hecho de que los mezcales reposados durante 47 a 75 días, los cuales tuvieron perfiles fenólicos menos complejos que aquellos reposados durante más días, presentaran capacidades antioxidantes más elevadas sugiere que los dos ácidos fenólicos encontrados en el mezcal a esos tiempos de reposo, contribuyen en mucho a la capacidad antioxidante promedio de esta bebida alcohólica.

Se encontraron diferencias significativas fueron entre los valores de EC₅₀ de muestras de mezcal de diferentes barriles ($p < 0.05$, Tablas 16 y 17). Estas diferencias podrían explicarse debido a las variaciones en la composición de fenoles entre los barriles.

Hasta donde fue posible investigar para la realización de este estudio, no existe al presente, información sobre la evaluación de la capacidad bloqueadora de radicales libres para el mezcal, por ese motivo no fue posible presentar comparaciones de la actividad antioxidante entre mezcales de diferente origen botánico. Algunos reportes

sobre la actividad antioxidante de otras bebidas destiladas como brandis (Canas y col., 2008), cognac, grapa, ron y whisky (Pellegrini y col., 2003); y de vinos (Minussi y col., 2003) mencionan que todas esas bebidas tienen propiedades antioxidantes; sin embargo, sus niveles de capacidad antioxidante no son comparables a nuestros resultados porque fueron estimados con diferentes métodos o índices, de este modo, hacer comparaciones llevaría a resultados inconsistentes como ha sido reportado por algunos autores (Frankel y Meyer, 2000).

Tabla 16. Resultados del análisis de varianza de dos factores de la actividad antioxidante (CE_{50}) de las muestras de mezcal almacenadas en diferentes barricas durante intervalos variables de tiempo

Fuente de variación	SC	GL	CM	F	P
Barrica	55.6654	2	27.8327	108.0452	***
Tiempo de reposo	145.6703	6	24.2783	94.2474	***
Barrica x Tiempo de reposo	46.7109	12	3.8925	15.1107	***
Error	10.8193	42	0.2576		
Total	258.8660	62			

Considerar que *** representa el valor de $p=0.0001$

Tabla 17. Datos de la prueba de Duncan de discriminación entre medias para los valores de actividad antioxidante (CE_{50}) de las muestras de mezcal almacenados en diferentes barricas.

Barrica	n	Media
7	21	5.5434 a
4	21	3.7278 b
1	21	3.4093 c

Las evaluaciones de la capacidad antioxidante del mezcal elaborado de *Agave durangensis*, usando el mismo método de HPPH*, permiten comparar las capacidades bloqueadoras de radicales libres de este mezcal con las de otros alimentos cuya actividad fue calculada con el mismo método y con el mismo índice, como el polen de abeja proveniente de diferentes especies de plantas (Almaraz-Abarca y col., 2004), siendo la capacidad del mezcal elaborado a partir de *A. durangensis* mayor a la de cualquiera de las siete clases de polen analizada por esos autores.

La capacidad antioxidante encontrada para el mezcal de Durango permite sugerir que el consumo moderado de este tipo de bebida alcohólica podría resultar en algún grado de protección a la salud, no solo contra los efectos oxidativos sino también contra el riesgo de trombosis y desordenes cardiacos, ya que se ha demostrado que existen propiedades cardioprotectoras, debido a un efecto sinérgico entre el etanol y los fenoles, en otras bebidas alcohólicas (Grenett y col., 2004). La búsqueda de

propiedades, como la capacidad antioxidante evaluada en este estudio para el mezcal de Durango, que caractericen, distingan y hagan atractiva y novedosa a esa bebida alcohólica, destacando cualidades que algunos autores llaman estéticas (Luna, 2007), es necesario para que este producto pueda competir con el tequila como producto comercial.

5.6 Tipificación química del mezcal de Durango

El mezcal de Durango podría ser distinguido de otros mezcales producidos en diferentes estados de México, por la combinación de todos los atributos químicos, incluidos los determinados en este estudio, y por propiedades como el potencial antioxidante, que quedarán resaltados en una etiqueta. Todas las características químicas analizadas en este estudio representan un papel importante en la determinación del aroma y del sabor característico de ese mezcal, y el conocimiento sobre la composición cualitativa y cuantitativa de cada una de ellas permite establecer nuevos criterios para el control de su calidad. Las características químicas de esa bebida, con las cuales el mezcal de Durango elaborado en la planta destiladora de Nombre de Dios puede ser tipificado, se resumen en la Tabla 18.

Tabla 18. Tipificación química del mezcal elaborado en el Estado de Durango

Característica	Valor y/o descripción
Pico de máxima absorción	277 nm
Perfil de aldehídos y cetonas	10 principales compuestos, de los cuales fueron identificados seis: 5-hidroximetilfurfuraldehído (entre 26.18 y 37.79 mg/L), 2-furaldehído (entre 0.65 y 2.79 mg/L), 5-metilfurfuraldehído (entre 0.33 y 2.20 mg/L), valeraldehído (entre 1.16 y 3.89 mg/L), acetona (entre 36.30 y 52.90 mg/L), y ciclopentanona (entre 0.42 y 2.04 mg/L), a cualquier tiempo de reposo entre 47 y 207 días
Compuesto orgánico predominante	Acetona, a cualquier tiempo de reposo entre 47 y 207 días
Metal más abundante	Fe (entre 39.078 y 87.906 µg/L)
Contenido de fenoles totales	Típico de cada periodo de reposo (alcanza entre 779.90 y 938.62 mg/L a los 207 días)
Perfil fenólico	Los perfiles se hacen más complejos conforme aumenta el tiempo de reposo: dos compuestos (ácido fenólico y derivado de ácido hidroxicinámico) entre 47 y 110 días, seis compuestos (ácido siríngico, ácido fenólico, derivado de ácido hidroxicinámico, flavona glicósido, derivado de ácido benzoico, y dihidroflavonoide) entre 131 y 191 días; 11 compuestos (ácido siríngico, ácido fenólico, derivado de ácido hidroxicinámico, flavona glicósido, ácido benzoico, ácido sinápico, luteolina glicósido, derivado de ácido benzoico, dihidroflavonoide, derivado de ácido hidroxicinámico, y derivado de ácido benzoico) a los 206 días.
Actividad antioxidante	Alta capacidad bloqueadora de radicales libres a cualquier tiempo de reposo entre 47 y 207 días (valores de CE ₅₀ entre 6.564 a 1.238 µg/mL)

6. CONCLUSIONES

El comportamiento espectral, la composición de cetonas y aldehídos, la composición de metales, los perfiles fenólicos, y los niveles de actividad antioxidante son características químicas típicas del mezcal elaborado en Durango a partir de *Agave durangensis* que pueden ser usadas como criterios de autenticidad.

El comportamiento espectral en la región UV, encontrado para el mezcal elaborado a partir de *A. durangensis* en la planta destiladora de Nombre de Dios, Durango puede considerarse como un elemento para la tipificación de este producto. El comportamiento semejante de los más de 100 espectros UV obtenidos para muestras de ese producto alcohólico indica que la banda de máxima absorbancia al rededor de 277 nm y la ausencia de absorbancia después de 400 nm es característica para esta bebida. El comportamiento espectral encontrado puede servir como referencia de adulteraciones de este producto.

El mezcal de Durango presenta un perfil de aldehídos y cetonas formado por 10 principales compuestos, siendo el 5-hidroximetilfuraldehído y la acetona los más abundantes. Este perfil es diferente al reportado para tequila, por lo que la composición de estos compuestos pueden ser considerados como parámetros de autenticidad de mezcales.

La estabilidad cualitativa y cuantitativa de los perfiles de cetonas y aldehídos del mezcal de Durango con relación al tiempo de reposo, hacen a éstos no adecuados en el control de calidad relacionado a la edad del mezcal.

La concentración de 5-hidroximetilfuraldehído y de acetona en el mezcal de Durango se encuentra entre los valores 26 a 38 mg/L y 36 a 53 mg/L, respectivamente. Cambios en esas concentraciones podrían indicar adulteraciones.

Las estimaciones de la concentración de fenoles totales indican una tendencia hacia el aumento con el tiempo de almacenamiento en barricas del mezcal analizado. De acuerdo a los valores encontrados para las tres barricas estudiadas, el contenido de fenoles puede aumentar de 14 a 17 veces la concentración inicial en 200 días de almacenamiento.

La presencia de concentraciones de fenoles arriba de los niveles detectados para cada tiempo de reposo puede ser un indicativo de un impropio proceso de elaboración y almacenamiento o de adulteración.

La complejidad y la concentración de fenoles proporcionan información sobre el tiempo de reposo del mezcal. Para el mezcal reposado durante tres meses, la concentración total de fenoles debería oscilar entre 213 y 239 mg/L, y para el mezcal reposado durante siete meses, entre 779 y 938 mg/L.

En las muestras de mezcal analizadas las concentraciones de metales pesados y arsénico se encontraron, en lo general, a niveles más bajos que los establecidos por las normas oficiales mexicanas (NOM-142-SSA1-1995-Bebidas alcohólicas y NOM 117-SSAI-1994-Agua potable).

En este estudio se proporcionaron datos para la tipificación y se inició la creación de una base de datos para facilitar la categorización del mezcal elaborado en Durango de acuerdo a su edad de reposo.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdala, L. R., P. Seeligmann. 1995. Flavonoids in *Tagetes zipaquirensis* and their chemosystematic significance. *Biochemical Systematics and Ecology* 23: 871-872.
- Afanas'ev, I. B., A. I. Dorozhko, A. V. Brodskii, V. A. Kostyuk, A. I. Potapovich. 1989. Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochemical Pharmacology* 38: 1763-1769.
- Akrida-Demertzi, K., A. A. Koutinas. 1991. Optimization of sucrose ethanol fermentation for K, Na, Ca, and Cu metal contents. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 30: 1-7.
- Albores, A., M. Cebrián, I. Tellez, B. Valdez. 1979. Estudio comparativo del hidroarsenicismo crónico en dos comunidades rurales de la Región Lagunera de México. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana* 86:195-204.
- Almaraz, A. N. 1984. Estudio Etnobotánico de los Agaves del Altiplano Potosino. Tesis de Licenciatura. UNAM. México.
- Almaraz-Abarca, N., M. G. Campos, J. A. Ávila-Reyes, N. Naranjo-Jiménez, J. Herrera-Corral, L. S. González-Valdez. 2004. Variability of antioxidant activity among honeybee-collected pollen of different botanical origin. *Interciencia* 29:574-578.
- Almaraz-Abarca, N., M. S. González-Elizondo, J. A. Tena-Flores, J. A. Ávila-Reyes, N. Naranjo-Jiménez, J. Herrera-Corral. 2006. Foliar flavonoids distinguish *Pinus leiophylla* and *Pinus chihuahuana* (Coniferales: Pinaceae). *Proceedings of the Biological Society of Washington* 119:426-436.
- Almaraz-Abarca, N., M. G. Campos, J. A. Ávila-Reyes, N. Naranjo-Jiménez, J. Herrera-Corral, L. S. González-Valdez. 2007. Antioxidant activity of polyphenolic extract of monofloral honeybee-collected pollen from mesquite (*Prosopis juliflora*, Leguminosae). *Journal of Food Composition and Analysis* 20:119-124.
- Alonso, A. M., Castro, R., Rodríguez, M. C., Guillén, D. A., & Barroso, C. G. 2004. Study of the antioxidant power of brandies and vinegars derived from Sherry wines and correlation with their content in polyphenols. *Food Research International* 37: 715-721.

Ames, B. N., M. K. Shigenaga, T. M. Hagen. 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 90:7915-7922.

Arrizon, J., A. Gschaedler. 2007. Effects of the addition of different nitrogen sources in the tequila fermentation process at high sugar concentration. *Journal of Applied Microbiology* 102: 1123-1131.

Barbosa-García, O., G. Ramos-Ortiz, J. L. Maldonado, J. L. Pichardo-Molina, M. A. Meneses-Nava, J. E. A. Landgrave, J. Cervantes-Martinez. 2007. UV-Vis absorption spectroscopy and multivariate analysis as a method to discriminate tequila. *Spectrochimica Acta Part A* 66:129-134.

Bauer-Christoph, C., N. Christoph, B. O. Aguilar-Cisneros, M. G. López; E. Richling; A. Rossmann; P. Schreier. 2003. Authentication of tequila by gas chromatography and stable isotope ratio analyses. *European Food Research and Technology* 217: 438-443.

Benn, S. M., T. L. Peppard. 1996. Characterization of tequila flavor by instrumental and sensory analysis. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 44:557-566.

Blanco, C. A., I. Caballero, A. Rojas, M. Gómez, J. Alvarez. 2003. Chelation of aqueous iron (III) by 2-acetyl-1,3-cyclohexanedione and beer ageing. *Food Chemistry* 81: 561-568.

Bogler, J. D., B. B. Simpson, 1995. A chloroplast DNA study of the *Agavaceae*. *Systematic Botany* 20: 191-205.

Bohm, B. A. 1998. *Introduction to Flavonoids*. Harwood Academic Publishers. Singapore.

Boulton, R. 2001. The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: a critical review. *American Journal of Enology and Viticulture* 52: 67-87

Bourke, J. G. 1983. Primitive distillation among the Tarascoes. *American Anthropology* 6:65-70.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologi* 28: 25-30.

Brown J. E., H. Khodr, R. Hider, C. A. Rice-Evans. 1998. Structural dependence of flavonoids interactions with Cu²⁺ ions: implications for their antioxidant properties. *Biochemical Journal* 330: 1173-1178

Bruman, H. J. 1944. The Asiatic origin of the Huichol still. *Geographical Review* 34:418-427.

Campos, M. G. 1997. Caracterização do pólen apícola pelo seu perfil em compostos fenólicos e pesquisa de algumas actividades biológicas. Dissertação de candidatura au grau de Doutor. Universidade de Coimbra. Portugal

Campos, M. G.; K. R. Markham. 2007. Structure information from HPLC and On-Line Measured Absorption Spectra – Flavone, Flavonols and Phenolic Acids. Universidade de Coimbra. Portugal.

Campos, M. G., K. R. Markham, A. Proença da Cunha. 1997. Quality assessment of bee-pollen using flavonoid/phenolic profiles. *Polyphenol Communications* 96:53-54.

Canas, S., A. P. Belchior, M. I. Spranger, R. Bruno-de-Sousa. 2003. High-performance liquid chromatography method for analysis of phenolic acids, phenolic aldehydes, and furanic derivatives in brandies. Development and validation. *Journal of Separation Science* 26: 496-502.

Canas, S., V. Casanova, A. P. Belchior. 2008. Antioxidant activity and phenolic content of Portuguese wine aged brandies. *Journal of Food Composition and Analysis* 21: 626-633.

Cardoso, D. R., S. M. Bettin, R. V. Reche, B. S. Lima-Neto, D. W. Franco. 2003. HPLC-DAD analysis of ketones as their 2,4-dinitrophenylhydrazones in Brazilian sugarcane spirits and rum. *Journal of Food Composition and Analysis* 16:563-573.

Carreón-Alvarez, A. N. Casillas, J. G. Ibáñez, F. Hernández, R. Prado-Ramírez, M. Bárcena-Soto, S. Gómez-Salazar. 2008. Determination of Cu in tequila by anodic stripping voltammetry. *Analytical Letters* 41: 469-477.

Castillo, G. V. M., A. M. Coelho. 2007. Dinámica de la cadena agave-tequila: tendencias y adaptación a la globalización. En: Agaves del occidente de México (Eds. Vázquez-García, J. A., M J. Cházar, G. Hernández Vera, E. P. Flores-Berrios, Y. L. Vargas-Rodríguez). Universidad de Guadalajara, Consejo Regulador del Tequila. México, pp. 150-163.

Cheyrier, V., I. Hidalgo-Arellano, J. M. Souquet, M. Moutounet. 1997. Estimation of oxidative changes in phenolic compounds of Carignane during winemaking. *American Journal of Enology and Viticulture* 48: 225-228.

Choi, Y. H., Y. H. Lim, H. Yeo, J. Kim. 1996. A flavonoid diglycoside from *Lepisorus ussuriensis*. *Phytochemistry* 43: 1111-1113.

Dahlgren, R.T.M., H.T Clifford, P.F. Yeo. 1985. The families of the Monocotyledons. Structure, Evolution and Taxonomy. Springer-Verlag. Berlín.

De Azevedo, L. C., C. A. de Araújo, M. M. Reis, L. A. da Silva, J. B. de Andrade. 2008. Estabilidade de aldeídos em vinhos, após abertura da garrafa. III Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica. Brazil.

Dewick, P. M. 1994. Isoflavonoids. In: *The Flavonoids: Advances in Research since 1986*. (Ed. Harborne, J. B.). London. Chapman and Hall, pp. 116-238.

Doussot, F., Pardon, P., Dedier, J., de Jeso, B. 2000. Individual, species and geographic origin influence on cooperage oak extractable content (*Quercus robur* L. and *Quercus petraea* Liebl.). *Analisis* 28: 960-965.

Eguiarte, L.E., M.R. Duvall, G.H. Learn, M.T. Clegg. 1994. The systematic status of the *Agavaceae* and *Nolinaceae* and related *Asparagales* in the monocotyledons: An analysis based on the *rbcL* gene sequence. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 54: 35-56.

Fernández de Simón, B., E. Cadahía. 2007. Tratamiento de la madera de roble para tonelería. *Enología* 4: 2-18.

Ferreira, V., R. Lopez, A. Escudero, J. F. Cacho. 1998. Quantitative determination of trace and ultratrace flavour active compounds in red wines through gas chromatographic-ion trap mass spectrometric analysis of microextracts. *Journal of Chromatography A* 806: 349-354.

Formica, J. V., W. Regelson. 1995. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food and Chemical Toxicology* 33: 1061-1080.

Frankel, E. N., A. S. Meyer. 2000. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80:1925-1941.

Frias, S., J. P. Trujillo, E. M. Pena, J. E. Conde. 2001. Classification and differentiation of bottled sweet wines of Canary Islands (Spain) by their metallic content. *European Food Research and Technology* 213: 145-149.

Fukai, T., C. B. Shen, T. Horikoshi, T. Nomura. 1996. Isoprenylated flavonoids from underground parts of *Glycyrrhiza glabra*. *Phytochemistry* 43: 1119-1124.

García-Mendoza, A. 1995. Riqueza y Endemismos de la Familia Agavaceae en México. En: *Conservación de Plantas en Peligro de Extinción: Diferentes Enfoques* (Eds. Linares, E., P. Dávila, F. Ching, R. Bye, T. Elias). Universidad Nacional Autónoma de México, México, pp. 51-75

García-Mendoza, A., R. Galván. 1995. Riqueza de las Familias Agavaceae y Nolinaceae en México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 56: 7-24

Gentry, H. S. 1982. *Agaves of Continental North America*. The University of Arizona Press. Arizona.

Ghosh, M., S. P. Singh. 2005. A review on phytoremediation of heavy metals and utilization of its by products. *Applied Ecology and Environmental Research* 3: 1-18.

Goldberg, D., G. J. Soleas. 1999. Analysis of antioxidant wine polyphenols by high performance liquid chromatography. *Methods in Enzymology* 299: 122-137.

Good-Avila, S. V., V. Souza, B. S. Gaut, y L. E. Eguiarte. 2006. Timing and rate of speciation in *Agave* (*Agavaceae*). *Proceedings of the National Academy of the United States of America* 103:9124-9129.

Granados-Sánchez, D. 1999. *Los Agaves en México*. Universidad Autónoma de Chapingo. México.

Grayer, R. J. 1989. Flavanoids. In: *Methods in Plant Biochemistry* 1. (Eds. Dey, P. M., J. B. Harborne). London. Academic Press, pp. 283-323.

Green, A. M., A. C. Clark, G. R. Scollary. 1997. Determination of free and total copper and lead in wine by stripping potentiometry. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 358: 711-717.

Grenett, H. E., L. A. Abou-Agag, D. A. Parks, F. M. Booyse. 2004. Ethanol and polyphenols (Cat, Quer) increase expression of fibrinolytic protein mRNAs *in vivo* in rat aortic endothelium. *Biological Research* 37: 342.

Gutiérrez, C. M. L., F. E. Acedo, Q. A. I. Valenzuela. 2007. Industria del bacanora y su proceso de elaboración. *Ciencia y Tecnología Alimentaria* 5: 394-404.

Hammond, J. R. M. 1981. Brewer's yeast. In: *The Yeast*. (Eds. Rose, A. H., J. S. Harrison) Academic Press, United Kingdom.

Harborne, J. B. 1973. *Phytochemical Methods. A guide to Modern Techniques of Plant Analysis*. London. Chapman and Hall.

Harborne, J. B. 1989. General Procedures and Measurement of Total Phenolics. In: *Methods in Plant Biochemistry*. (Eds. Dey, P. M., J. B. Harborne). Vol. 1. London. Academic Press, pp. 1-27.

Hernández, T., I. Estrella, M. Dueñas, B. Fernández de Simón, E. Cadahía. 2007. Influence of wood origin in the polyphenolic composition of a Spanish red wine aging in bottle, alter storage in barrels of Spanish, French and American oak wood. *European Food Research and Technology* 224:695-705.

Hrazdina, G. 1992. Biosynthesis of flavonoids. In: Plant Polyphenols: Synthesis, Properties, Significance (Eds. Hemingway, R. W., O. E. Laks). New York, Plenum Press, pp. 61-72.

Hutchinson, J. 1934. The Families of Flowering Plants. Vol. II. Monocotyledons. Macmillan. London.

Ibanez, J. G., A. Carreón-Álvarez, M. Bárcena-Soto, N. Casillas. 2008. Metals in alcoholic beverages: A review of sources, effects, concentrations, removal, speciation, and analysis. *Journal of Food Composition and Analysis* 21: 672-683.

Imperato, F. 1996. Kaempferol-3-O-(5'-feruloylapioside) from *Pteridium aquilinum*. *Phytochemistry* 43: 1421-1423.

Jenner, P. M., E. C. Hagan, J. M. Taylor, E. L. Cook, O. G. Fitzhugh. 1994. Food flavouring and compounds of related structure I. Acute oral toxicity. *Food and Cosmetics Toxicology* 2: 327-343.

Jiménez, M. N., A. C. Ancín. 2006. The development of esters in filtered and unfiltered wines that have been aged in oak barrels. *International Journal of Food Sciences and Technology* 41: 155-161.

Kirkham, M. B. 2006. Cadmium in plants on polluted soils: effects of soils factors, hyperaccumulation, and amendments. *Geoderma* 137: 19-32.

Kokkinofa, R., P. V. Petrakis, T. Mavromoustakos, C. R. Theocaris. 2003. Authenticity of the traditional Cypriot spirit zivania on the basis of metal content using a combination of coupled plasma spectroscopy and statistical analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 6233-6239.

Leal, M. T., S. Gelover. 2002. Evaluación de la calidad del agua subterránea de fuentes de abastecimiento en acuíferos prioritarios de la región Cuencas Centrales del Norte. *Anuario IMTA 2002*. México.

Lin, Y. T., D. Vatter, R. G. Labbe, K. Shetty. 2005. Enhancement of antioxidant activity and inhibition of *Helicobacter pylori* by phenolic phytochemical-enriched alcoholic beverages. *Process Biochemistry* 40: 2059-2065.

Lopez, F. F., C. Cabrera, M. L. Lorenzo, M. C. Lopez. 1998. Aluminium levels in wine, beer, and other alcoholic beverages consumed in Spain. *The Science of the Total Environment* 220: 1-9.

López, G. M., N. A. Mancilla-Margalli, G. Mendoza-Díaz. 2003. Molecular structures of fructans from *Agave tequilana* Weber var. Azul. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 7835-7840.

Lozoya-Saldaña, H., R. Rivera-Hinojosa, M. T. Colinas-León. 2007. Fenoles, peroxidasa y fenilalanina amonio-liasa: su relación con la resistencia genética de clones de papa (*Solanum tuberosum* L.) contra el tizón tardío (*Phytophthora infestans* Mont. De Bary). *Agrociencia* 41: 479-489.

Lumholtz, C. 1986. *El Mexico Desconocido. Volumen 2.* Instituto Nacional Indigenista. México.

Luna, Z. R. 2007. Economía y estética de los destilados del maguey. En: *En lo Ancestral hay Futuro: del Tequila, los Mezcales y otros Agaves.* (Eds. Colunga-GarcíaMarín, P., L. Eguiarte, S. A. Larque, D. Zizumbo-Villarreal). CICY-CONACYT-CONABIO-INE. México, pp. 175-190.

Mabry, T. J., K. R. Markham, M. B. Thomas. 1970. *The systematic identification of flavonoids.* Springer-Verlag, New York.

MacKenzie, W. M., R. I. Aylott. 2004. Analytical strategies to confirm Scotch whisky authenticity. Part II: Mobil brand authentication. *The Analyst* 129:607-612.

Mancilla-Margalli, N. A., M. G. López. 2002. Generation of Maillard compounds from inulin during the thermal processing of *Agave tequilana* Weber var. azul. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 806-812.

Mancilla-Margalli, N. A., M. G. López. 2006. Water-soluble carbohydrates and fructan structure patterns from *Agave* and *Dasyliroion* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54:7832-7839.

Manguro, L. O., J. O. Midiwo, W. Graus. 1996. A flavonol glycoside from *Myrsine africana* leaves. *Phytochemistry* 43: 1107-1109.

Marais, J., H. J. Pool. 1980. Effect of storage time and temperature on the volatile composition and quality of dry white table wines. *Vitis* 19: 151-164.

Markham, K. R. 1982. *Techniques of Flavonoid Identification*. London. Academic Press.

Markham, K. R., M. Campos. 1996. 7- and 8-O-meyhylherbacitin-3-O-sophorosides from bee pollens and some structure/activity observations. *Phytochemistry* 43: 763-767.

Mayer, H., O. Marconi, S. Floridi, L. Montanary, P. Fantozzi. 2003. Determination of Cu(II) in beer by derivative potentiometric stripping analysis. *Journal of the Institute of Brewing* 109: 332-336.

Mena, C., C. Cabrera, M. L. Lorenzo, M. C. López. 1996. Cadmium levels in wine, beer, and other alcoholic beverages: posible sources of contamination. *Science of the Total Environment* 181: 201-208.

Michel-Cuello, C., B. I. Juárez-Flores, J. R. Aguirre-Rivera, J. M. Pinos-Rodríguez. 2008. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 5753-5757.

Middleton Jr., E., C. Kandaswami. 1994. The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer. In: *The Flavonoids: Advances in Research since 1986*. (Ed. Harborne, J. B.). London. Chapman and Hall, pp. 618-652.

Minussi, R. C., M. Rossi, L. Bologna, L. Cordi, D. Rotilio, G. M. Pastore, N. Durán. 2003. Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines. *Food Chemistry* 82: 409-416.

Monagas, M., B. Bartolomé, C. Gómez-Cordovés. 2005. Evolution of polyphenols in red wines from *Vitis vinifera* L. during aging in the bottle. *European Food Research and Technology* 220:331-340.

Muñoz, R D., K. Wrobel, K. Wrobel. 2005. Determination of aldehydes in tequila by high-performance liquid chromatography with 2,4-dinitrophenylhydrazine derivatization. *European Food Research and Technology* 221: 798-802.

Natella, F., M. Nordini, D. Felice, C. Scaccini. 1999. Benzoic and cinnamic acid derivatives as antioxidants: structure-activity relation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 1453-1459.

Norma Oficial Mexicana NOM-070-SCFI-1994-Bebidas Alcohólicas-Mezcal.

Ocaña-Nava, D., A. García-Mendoza, J. Larson. 1997. Modelación supervisada de la distribución de los magueyes mezcaleros en México. En: *En lo Ancestral hay Futuro: del Tequila, los Mezcales y otros Agaves*. (Eds. Colunga-GarcíaMarín, P., L. Eguiarte, S. A. Larque, D. Zizumbo-Villarreal). CICY-CONACYT-CONABIO-INE. México, pp. 153-171.

Ortiz, D., L. Castro, F. Turrubiates, J. Milan, F. Díaz-Bariga. 1998. Assessment of the exposure to fluoride from drinking water in Durango, Mexico, using a geographic information system. *Fluoride* 31: 183-187.

Panossian, A., G. Mamikonyan, M. Torosyan, E. Gabrielyan, S. Mkitaryan. 2001. Analysis of aromatic aldehydes in brandy and wine by high performance capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry* 73 (17): 4379-4383.

Parson, J. R., J. A. Darling. 2000. Maguey (*Agave* spp.) utilization in Mesoamerica civilization: a case for precolumbian pastoralism. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 66:81-91.

Pax, F., K. Hoffmann. 1930. *Amaryllidaceae*. In: *Die Natürlinchen Pflanzenfamilien* (Eds. Engler, A., K. Prantl). *Pflanzenreich*, Leipzig, pp. 391-430.

Pellegrini, N., M. Serafini, B. Colombi, D. Del Río, S. Salvatore, M. Bianchi, F. Brighenti. 2003. Total antioxidant capacity of plants foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *The Journal of Nutrition* 133: 2812-2819.

Peña-Neira, A., T. Hernández, C. García-Vallejo, I. Estrella, J. A. Suarez. 2000. A survey of phenolic compounds in Spanish wines of different geographical origin. *European Food Research and Technology* 210: 445-448.

Pérez-Coello, M. S., J. Sanz, M. D. Cabezudo. 1998. Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of volatile compounds in oak Wood used for ageing of wines and spirits. *Chromatographia* 47: 427-432.

Pérez, R. R. 2008. Carbohidratos Solubles de *Agave durangensis* (Agavaceae). Tesis de Licenciatura. Universidad Juárez del Estado de Durango. Durango, México.

Phl, P. 2007. What do metals tell us about wine? *Trends in Analytical Chemistry* 26: 941-949.

Pietta, P. G. 2000. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products* 63: 1035-1042.

Pineda, A. D., M. Salucci, R. Lázaro, G. Maiani, A. Ferro-Luzzi. 1999. Capacidad antioxidante y potencial de sinergismo entre los principales constituyentes antioxidantes de algunos alimentos. *Revista Cubana de Alimentos y Nutrición* 13: 104-111.

Quesada, G. J., M. M. Villalón, H G. S. López, M. C. M. López. 1995. Comparison of spectrophotometric and chromatographic methods of determination of furanic aldehydes in wine distillates. *Food Chemistry* 52: 203-208.

Rocha, M., S. V. Good-Ávila, F. Molina-Freaner, H. T. Arita, A. Castillo, A. García-Mendoza, A. Silva-Montellano, B. S. Gaut, V. Souza, L. E. Eguiarte. 2006. Pollination biology and adaptative radiation of *Agavaceae*, with special emphasis on the genus *Agave*. *Aliso* 22: 327-342.

Rodríguez G., B., A. Gutiérrez M., E.P. Flores B., M.M. Loera Q. 2004. *Agave tequilana* Weber var. azul: Inicio del Proceso. En: *Ciencia y Tecnología del Tequila. Avances y perspectivas* (Ed. Gschaedler-Mathis, A.). CIATEJ. México, pp 14-34.

Rosas, I., R. Belmont, A. Armienta, A. Baez. 1999. Arsenic concentrations in water, soil, milk and forage in Comarca Lagunera, México. *Water, Air, and Soil Pollution* 112: 133–149,

Salisbury, R. A. 1866. *The Genera of Plants*. John Van Voorst. London.

Savchuk, S. A., V. N. Vlasov, S. A. Appolonova, V. N. Arbuzov, A. N. Vedenin, A. B. Mezinov, B. R. Grigor'yan. 2001. Application of chromatography and spectrometry to the authentication of alcoholic beverages. *Journal of Analytical Chemistry* 56: 214-231.

Salvo, F., L. L. Pera, G. D. Bella, M. Nicotina, G. Dugo. 2003. Influence of different mineral and organic pesticide treatments on Cd(II), Cu(II), Pb(II), and Zn(II) contents determined by derivative potentiometric stripping analysis in Italian white and red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 1090-1094.

Sánchez-Moreno, C., J. A. Larrauri, F. Saura-Calixto. 1999. Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grapes juices and related polyphenolic constituents. *Food Research International*. 32:407-412.

Sardesai, V. M. 1998. *Introduction to Clinical Nutrition*. Marcel Dekker. New York

Serra, B., M. V. Arribas, P. O. Gómez. 1999. Estrés oxidativo y nutrientes antioxidantes. En: *Tratado de Nutrición*. (Ed. Hernández, R. M.). Diaz de Santos. España, pp. 317-321.

Serra, J. B., T. M. Soliva, L. E. Centelles. 2001. Evaluation of polyphenolic and flavonoid compounds in honeybee-collected pollen produced in Spain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49:1848-1853.

Silva, M. L., F. X. Malcata. 1998. Relationships between storage conditions of spirits obtained hereform. *American Journal of Enology and Viticulture* 49: 56-64.

Smith Jr. 1986. Preceramic Plant Remains from Guilá Naquitz. In: *Guilá Naquitz. Archaic Foraging and Early Agriculture in Oaxaca, Mexico*. (Ed. Flannery, K. V.). Academic Press. New York, pp. 265-301.

Soufleros, E. H., S. A. Mygdalia, P. Natskoulis. 2005. Production process and characterization of the traditional Greek fruit distillate "Koumaro" by aromatic and mineral composition. *Journal of Food Composition and Analysis* 18:699-716.

Spillman, P. J., A. P. Pollnitz, D. Liacopoulou, G. K. Skouroumounis, M. A. Sefton. 1997. Accumulation of vanillin during barrel-aging of white, red, and model wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 2584-2589.

Strack, D., V. Wray. 1989. The anthocyanins. In: *The Flavonoids: Advances in Research since 1986*. (Ed. Harborne, J. B.). London. Chapman and Hall, pp. 1-22.

Taiz, L., E. Zeiger. 1991. *Plant Physiology*. The Benjamin Cummings Publishing. California.

Valenzuela-Ruiz, J. F., O. H. Velasco-González, M. A. Márquez-Linares. 2003. *Desarrollo Sustentable del Agave Mezcalero en Durango*. SEP, CIIDIR-IPN-Dgo., SAGDR. México.

Valenzuela-Zapata, A. G., G. P. Nabhan. 2003. *Tequila. A natural and cultural history*. The University of Arizona Press. Tucson.

Vallejo-Córdoba, B., A. F. González-Córdoba, M. C. Estrada-Montoya. 2004. Tequila volatile characterization and ethyl ester determination by solid phase microextraction gas chromatography/mass spectrometry analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:5567-5571.

Van Heerden, F. R., B. E. Van Wyk, A. M. Viljoen, P. A. Steenkamp. 2003. Phenolic variation in wild populations of *Aspalathus linearis* (rooibos tea). *Biochemical Systematics and Ecology* 31:885-895.

Visioli, F., L. Borsani, C. Galli. 2000. Diet and prevention of coronary heart disease: the potential role of phytochemicals. *Cardiovascular Research* 47: 419-425.

Vivas, N., Y. Glories. 1996. Role of oak wood ellagitannins in the oxidation process of red wines during aging. *American Journal of Enology and Viticulture* 47: 103-107.

Vlassov, V. N., D. S. Maruzhenkov. 1999. Application of GC/MS method for the identification of brandies and cognacs. *Analisis* 27: 663-667.

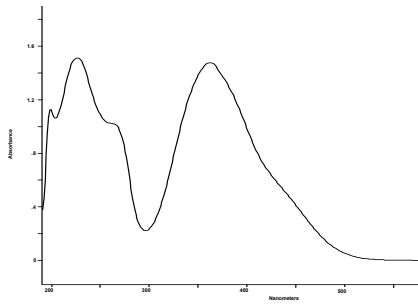
Zizumbo-Villareal, D., P. Colunga-GarcíaMarín. 2008. Early coconut distillation and the origins of mezcal and tequila spirits in west-central Mexico. *Genetic Resource and Crop Evolution* 55: 493-510.

8. ANEXOS

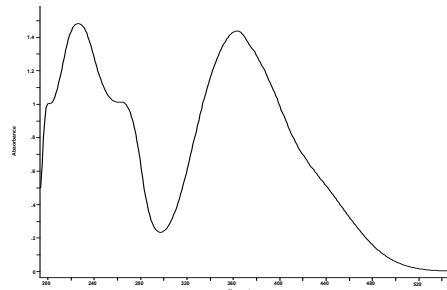
ANEXO 1. Valores de absorbancia de 10 repeticiones a 10 longitudes de onda elegidas, del mezcal joven de La Constancia, Durango.

Nm	Absorbancia									
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10
220	0.602	0.608	0.631	0.684	0.600	0.705	0.622	0.611	0.614	0.599
240	0.322	0.328	0.342	0.333	0.325	0.337	0.337	0.333	0.336	0.327
260	0.335	0.345	0.348	0.350	0.342	0.351	0.354	0.350	0.350	0.343
280	0.471	0.480	0.497	0.481	0.476	0.485	0.491	0.484	0.481	0.476
300	0.238	0.242	0.252	0.252	0.240	0.244	0.247	0.244	0.243	0.240
320	0.140	0.142	0.148	0.142	0.140	0.142	0.144	0.142	0.142	0.140
340	0.117	0.120	0.124	0.119	0.117	0.119	0.122	0.119	0.119	0.116
360	0.087	0.090	0.093	0.089	0.088	0.089	0.092	0.090	0.090	0.088
380	0.048	0.051	0.053	0.051	0.050	0.052	0.051	0.050	0.052	0.051
400	0.025	0.026	0.027	0.025	0.024	0.026	0.025	0.025	0.027	0.028

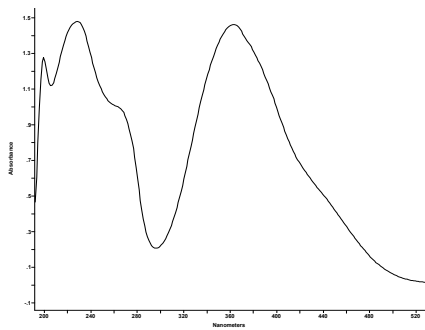
ANEXO 2. Espectros UV/Vis de los estándares y de cada uno de los derivados cetónicos y aldehídicos encontrados en las muestras del mezcal de Durango



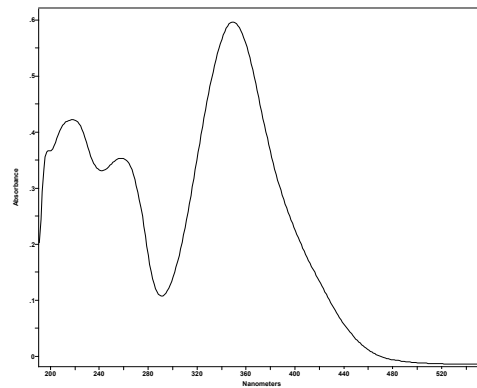
a) 2-butanona (TR: 22.238)



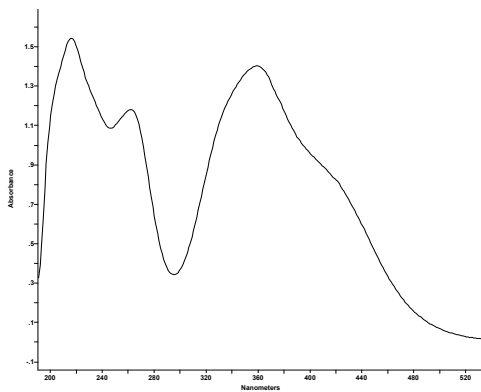
b) acetona (TR: 12.277)



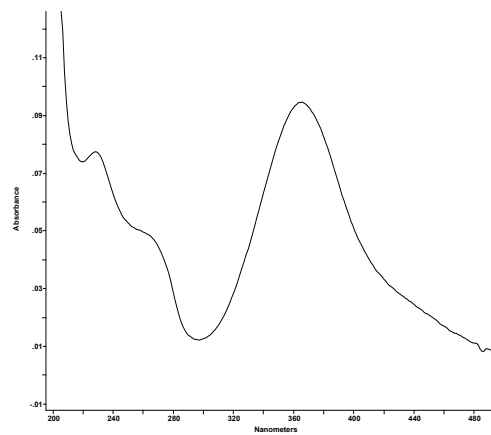
c) 2-metilciclohexanona (TR: 27.713)



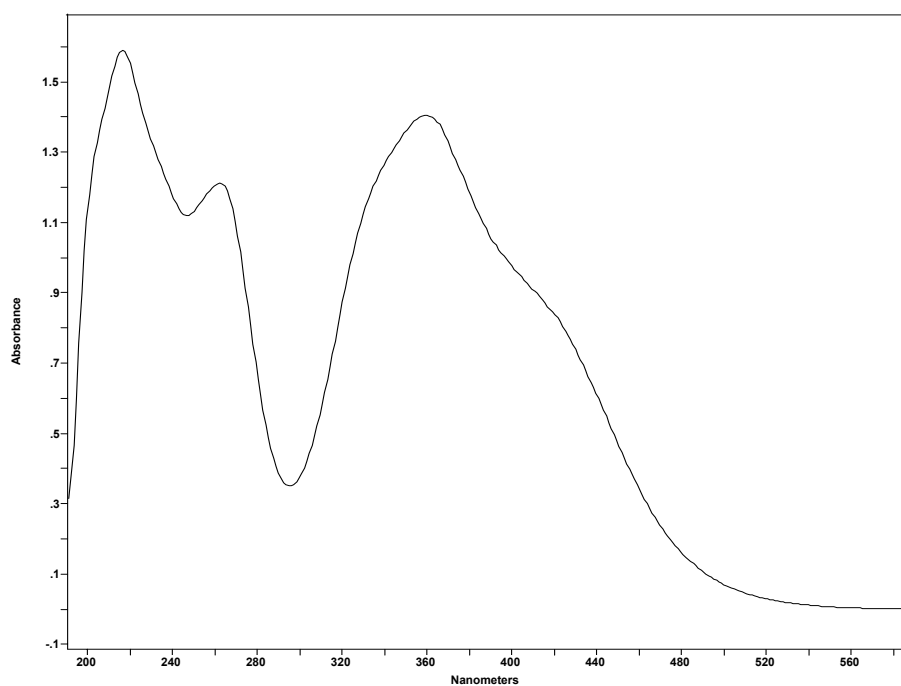
d) ciclopentanona (TR: 22.01)



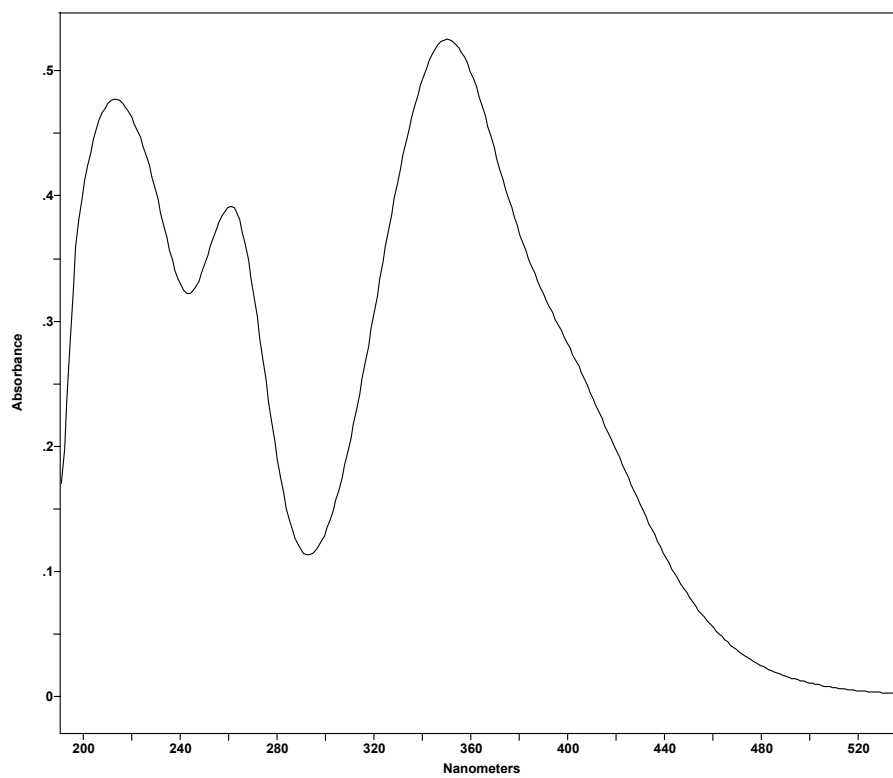
e) formaldehído (TR: 5.0)



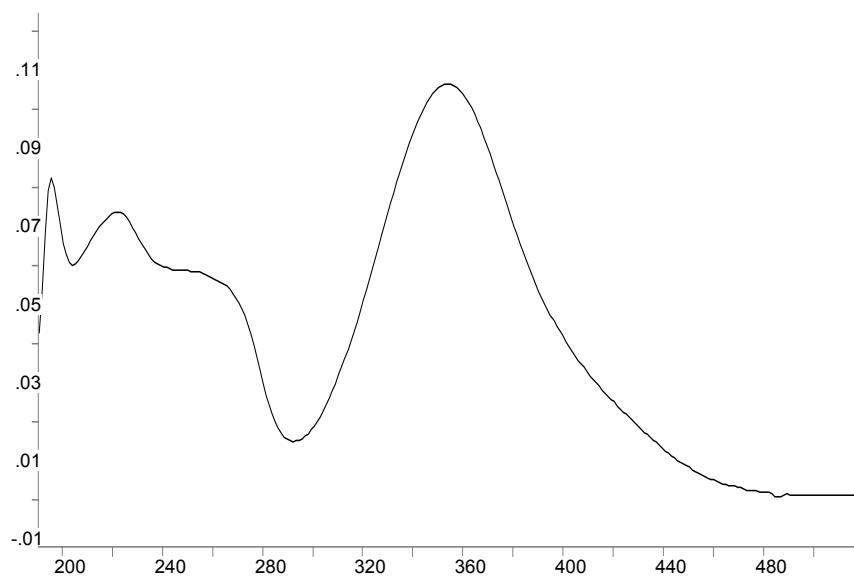
f) valeraldehído (TR: 21.5)



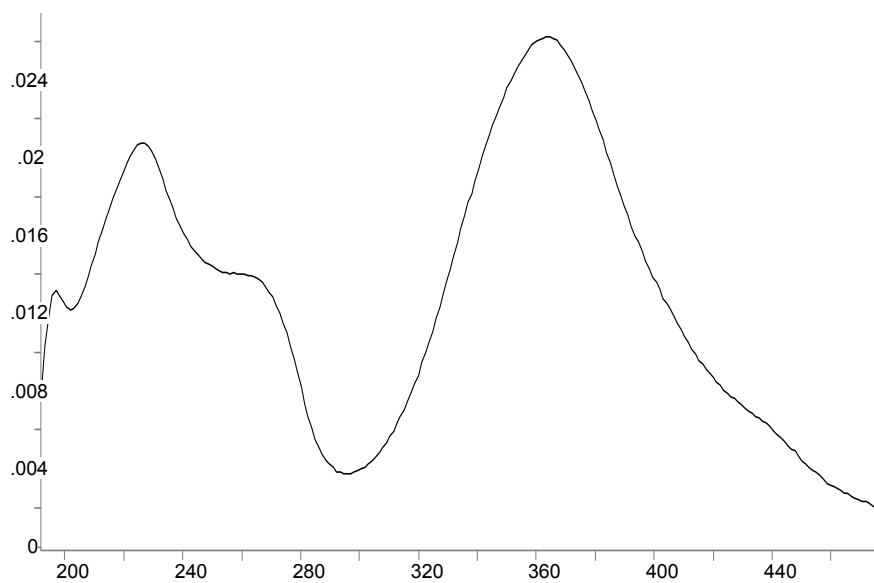
Compuesto 1: 5-hidroximetilfuraldehido (5-HMF)



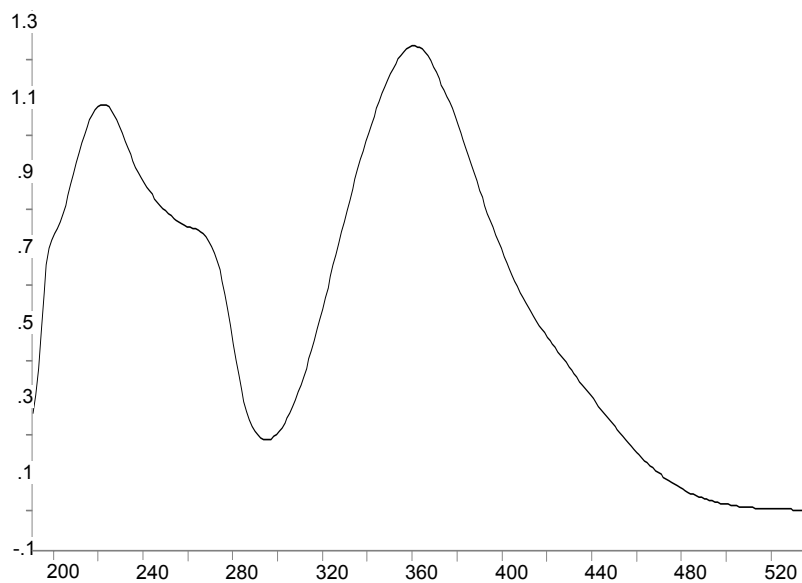
Compuesto 2: 2-furaldehído (2-FAL)



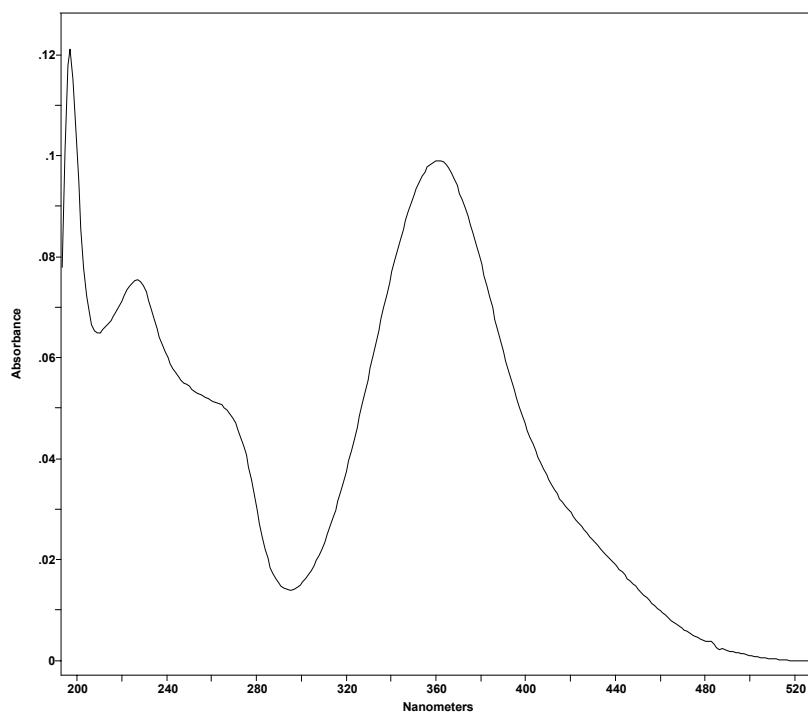
Compuesto 3: 5-metilfuraldehído (5-FMA)



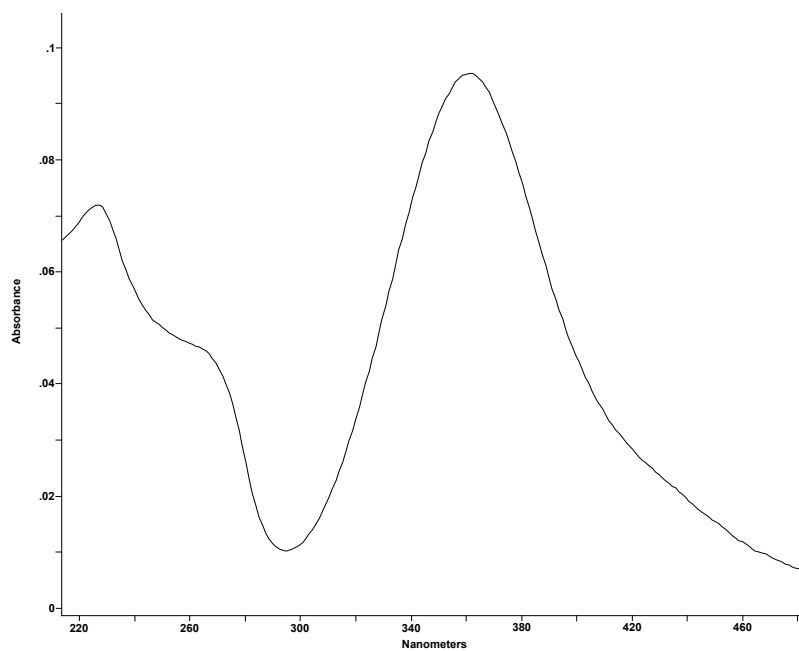
Compuesto 4: Acetona



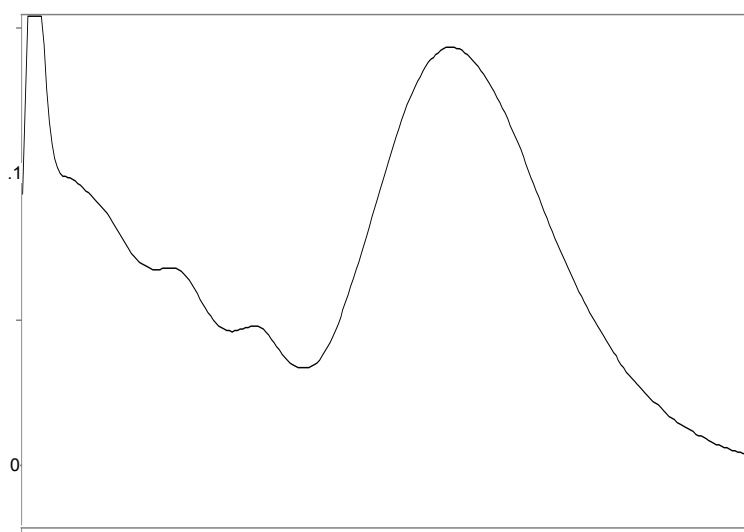
Compuesto 5: no identificado



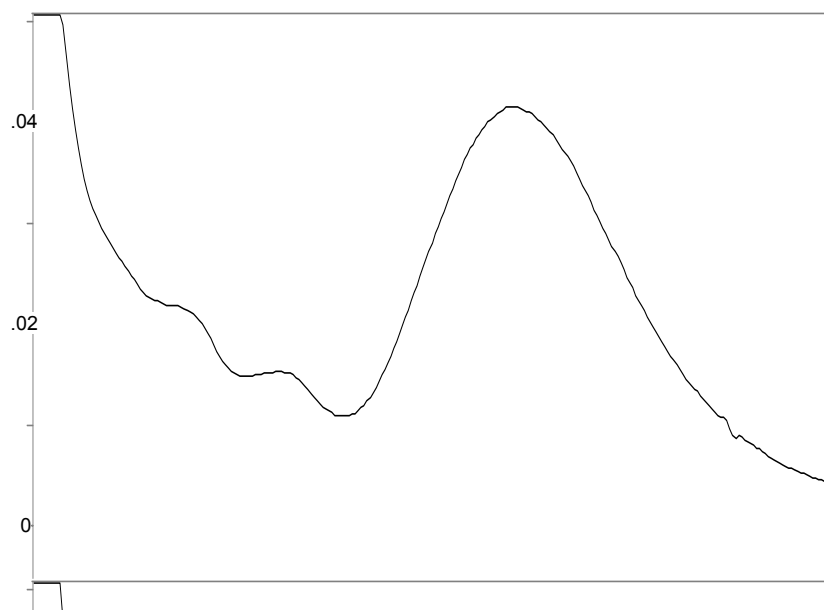
Compuesto 6: no identificado



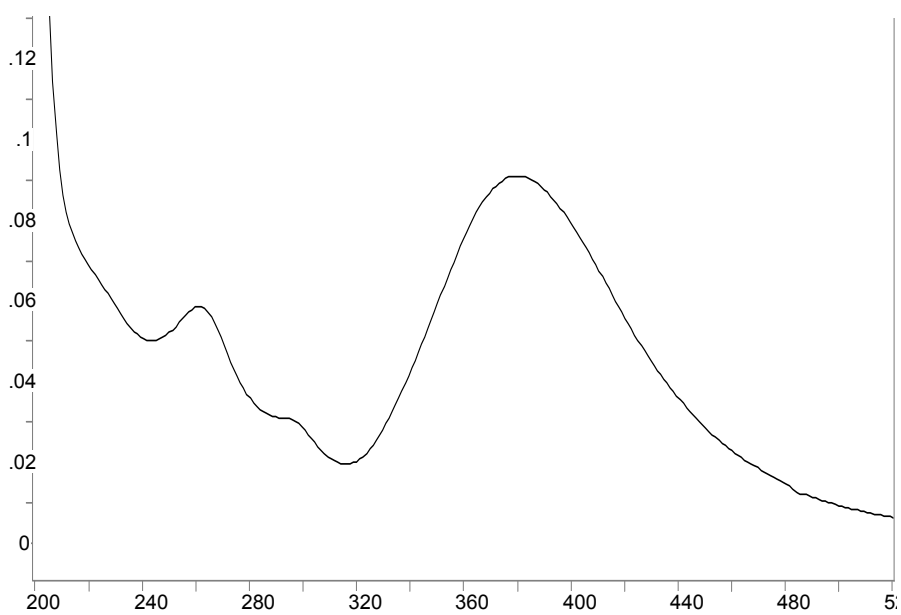
Compuesto 7: varaldehído



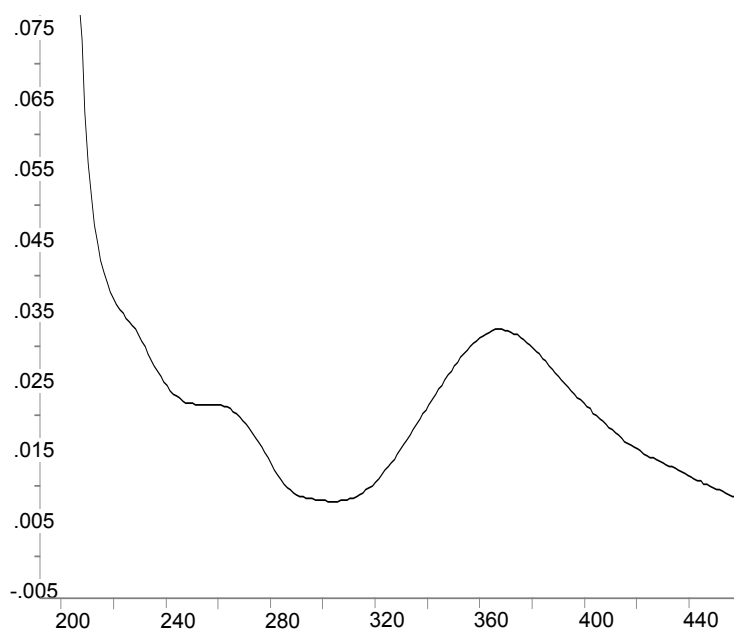
Compuesto 8: ciclopentanona



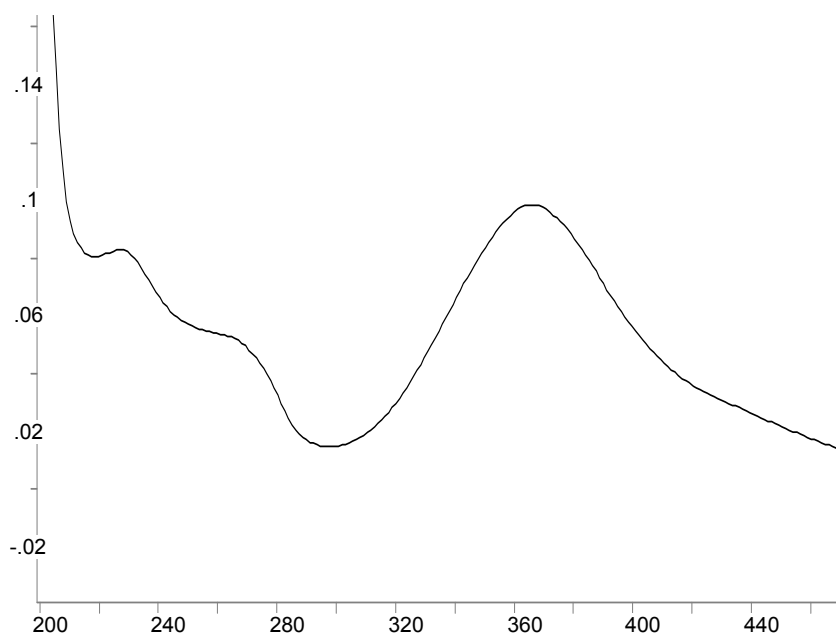
Compuesto 9: no identificado



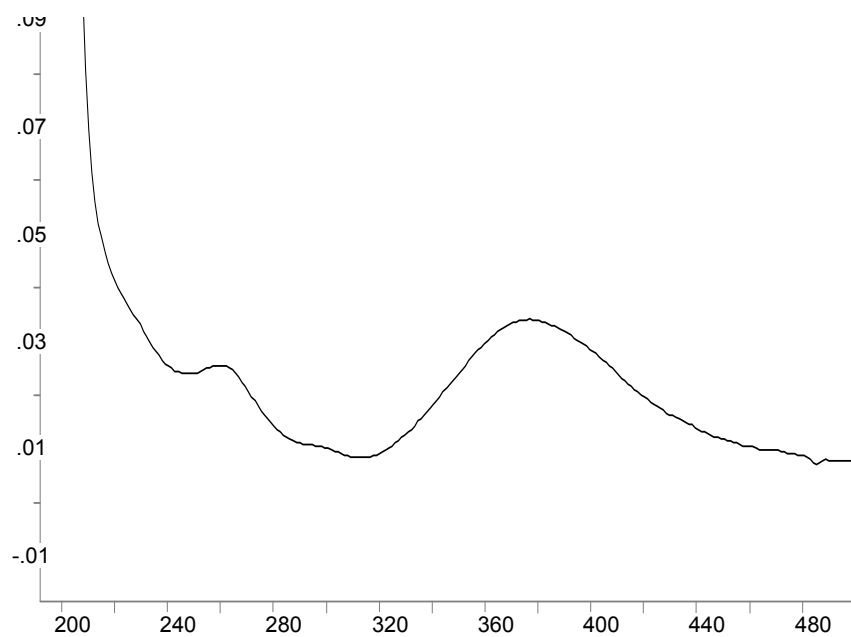
Compuesto 10: no identificado



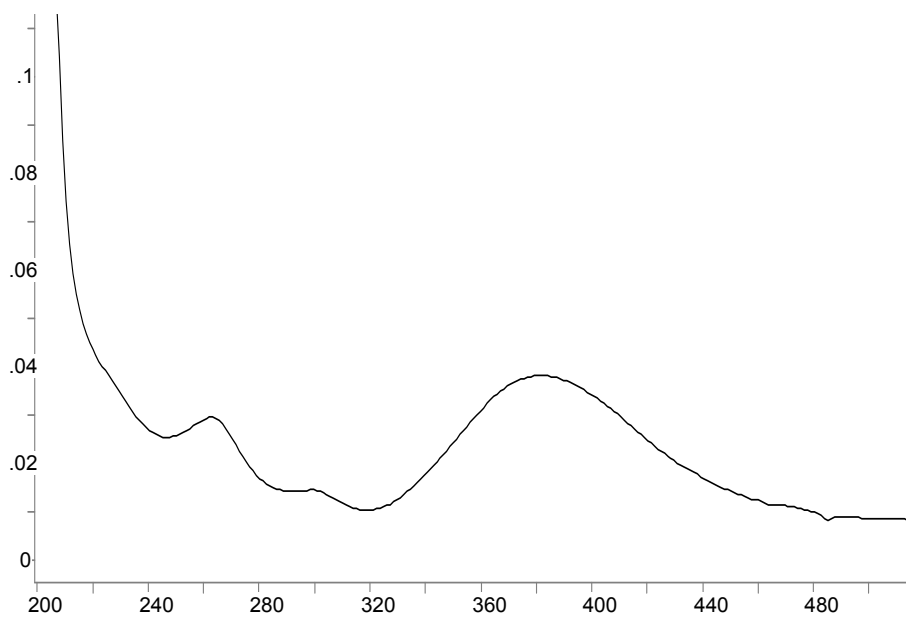
Compuesto 11: no identificado



Compuesto 12: no identificado



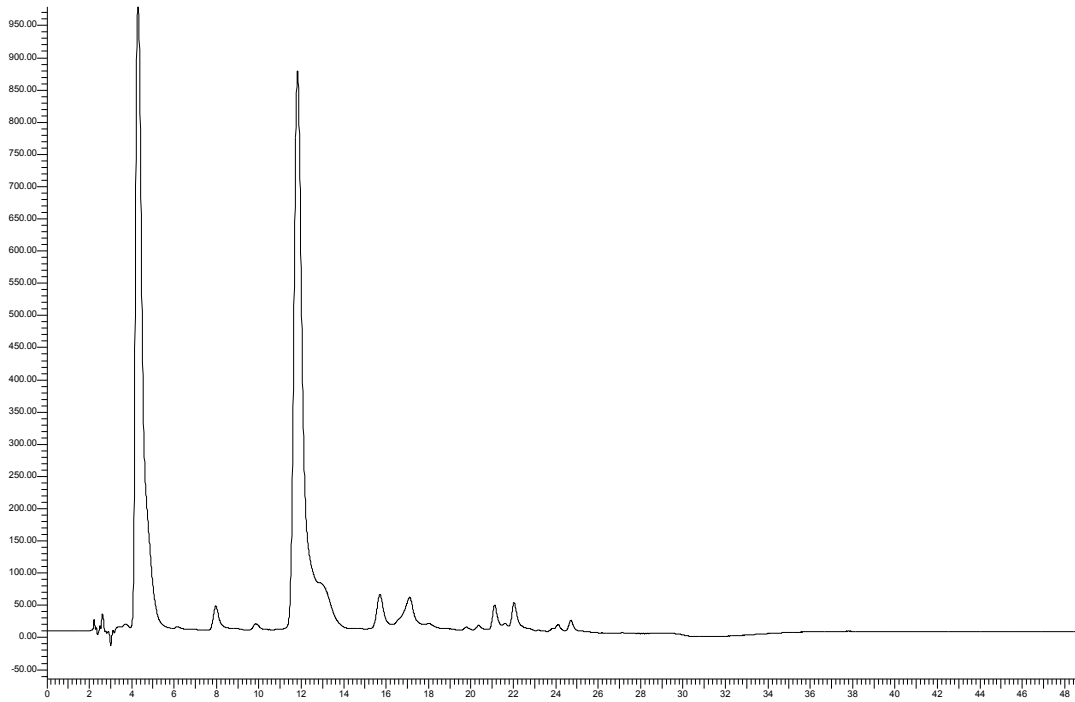
Compuesto 13: no identificado



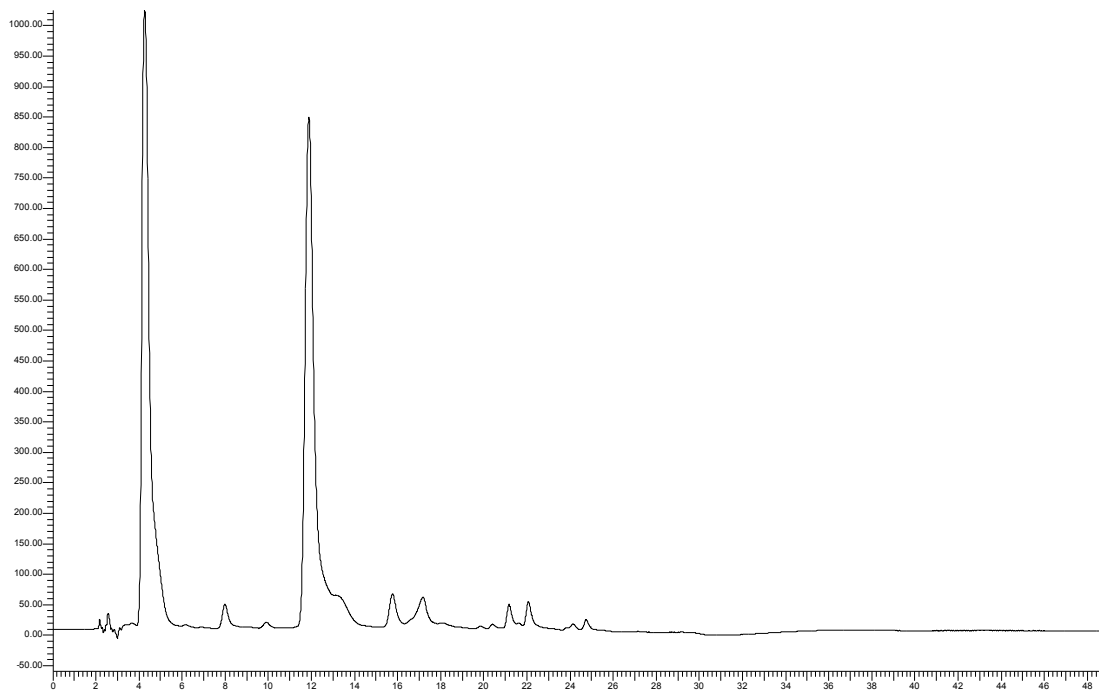
Compuesto 14: no identificado

ANEXO 3. Cromatogramas de las muestras de mezcal analizadas por sus derivados cetónicos y aldehídicos a diferentes tiempos de reposo.

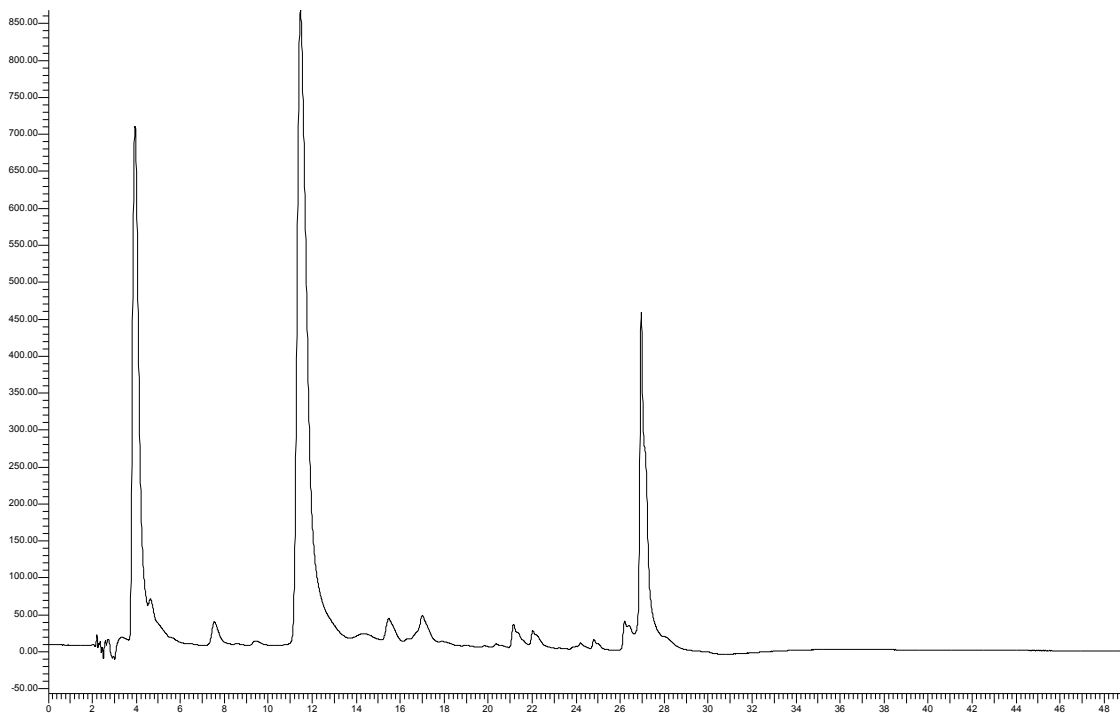
Barrica B1



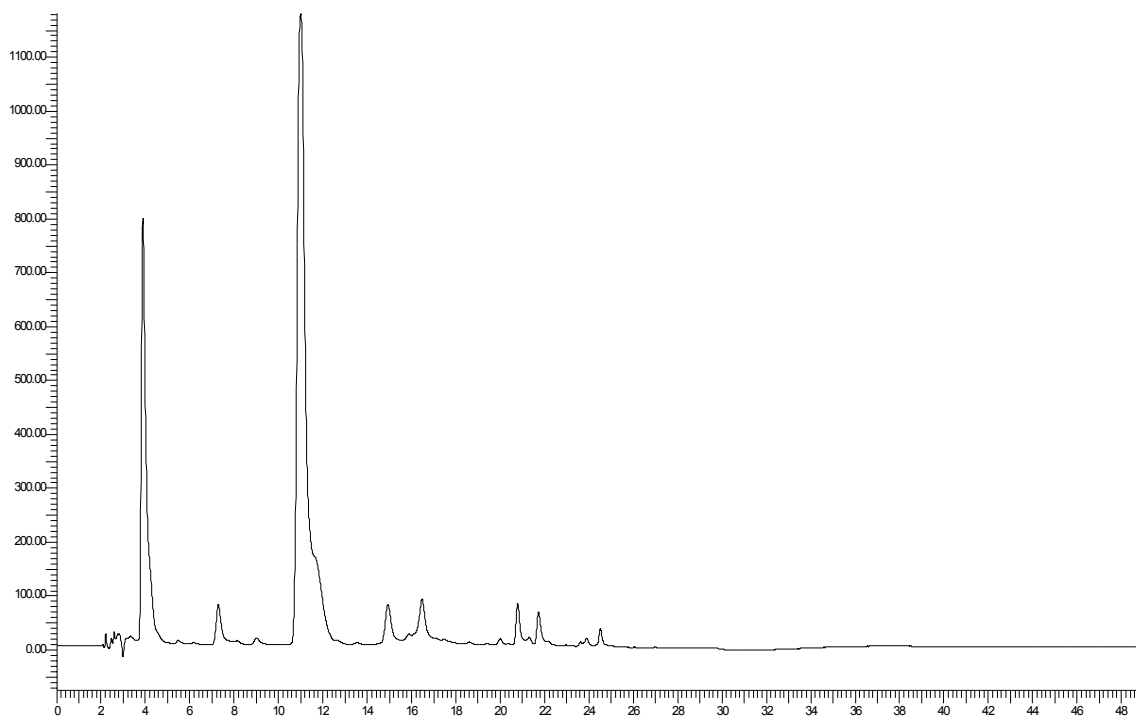
47 días



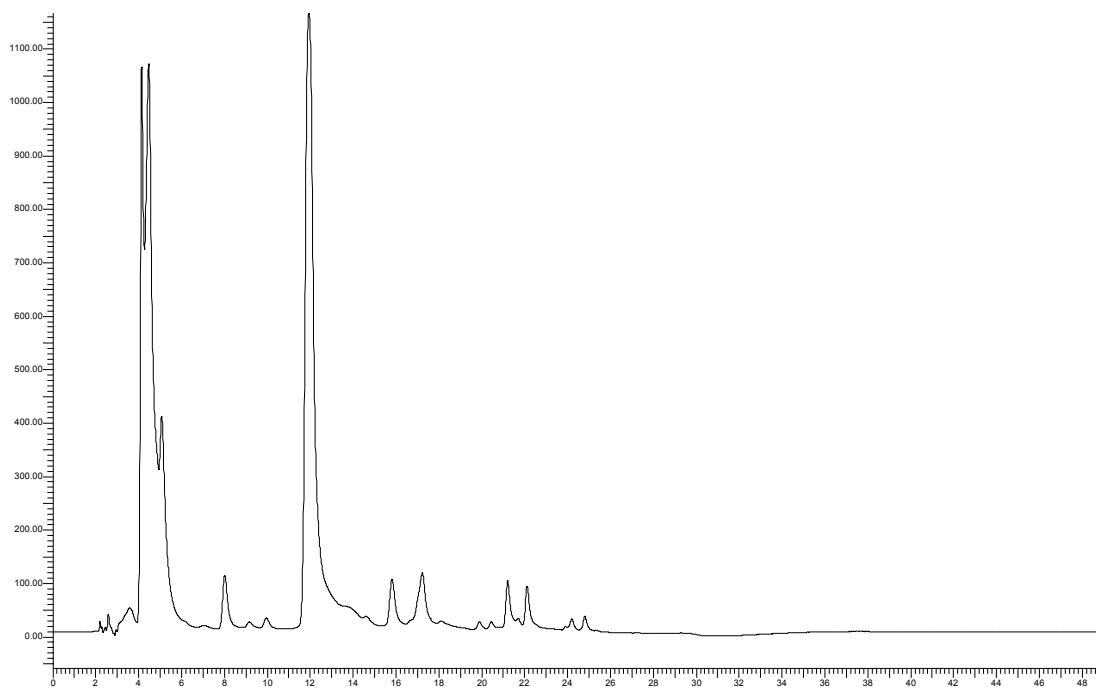
75 días



110 días

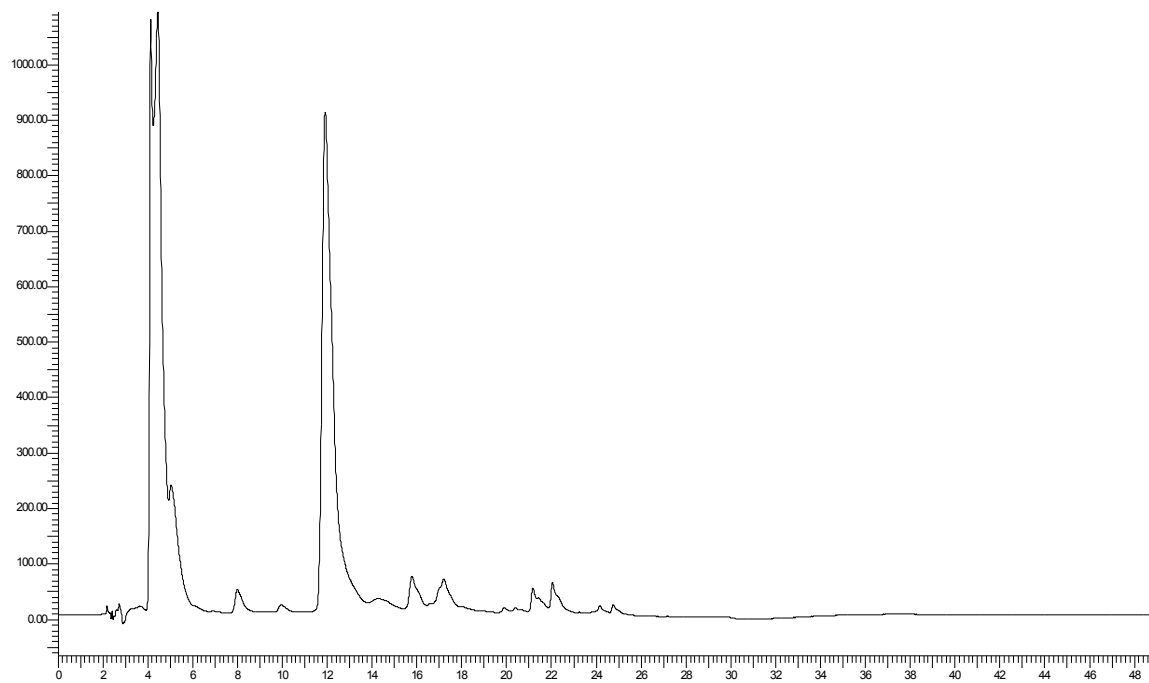


195 días

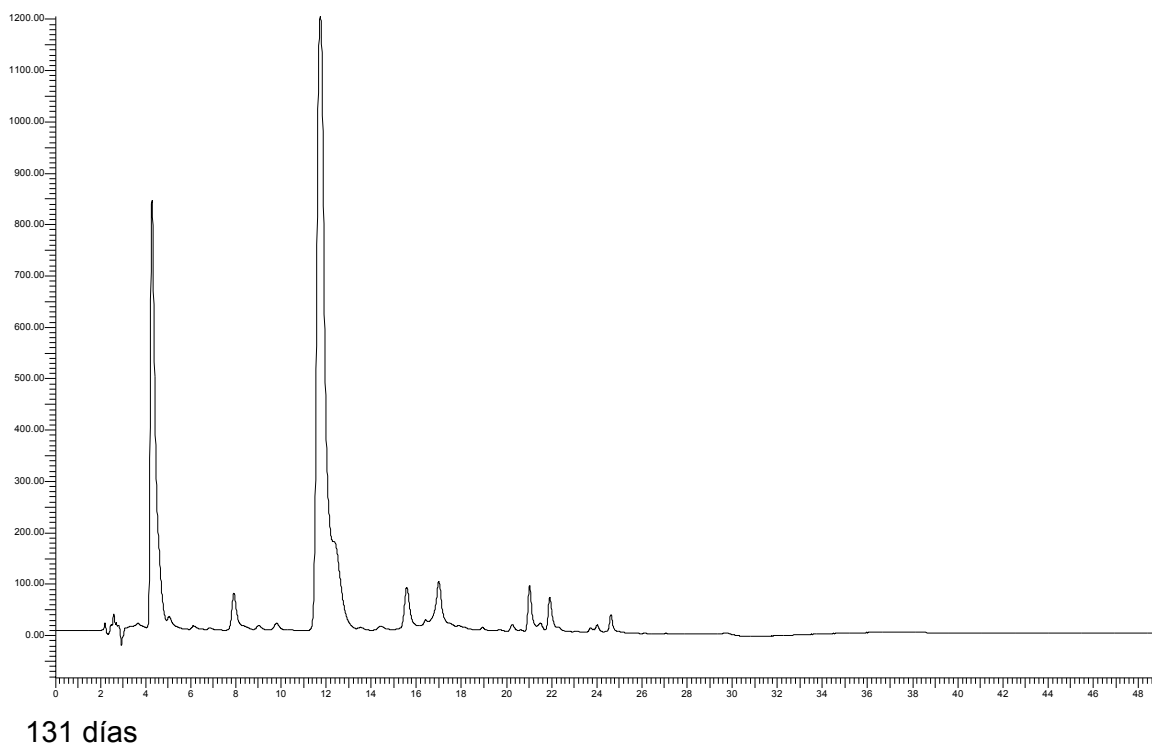
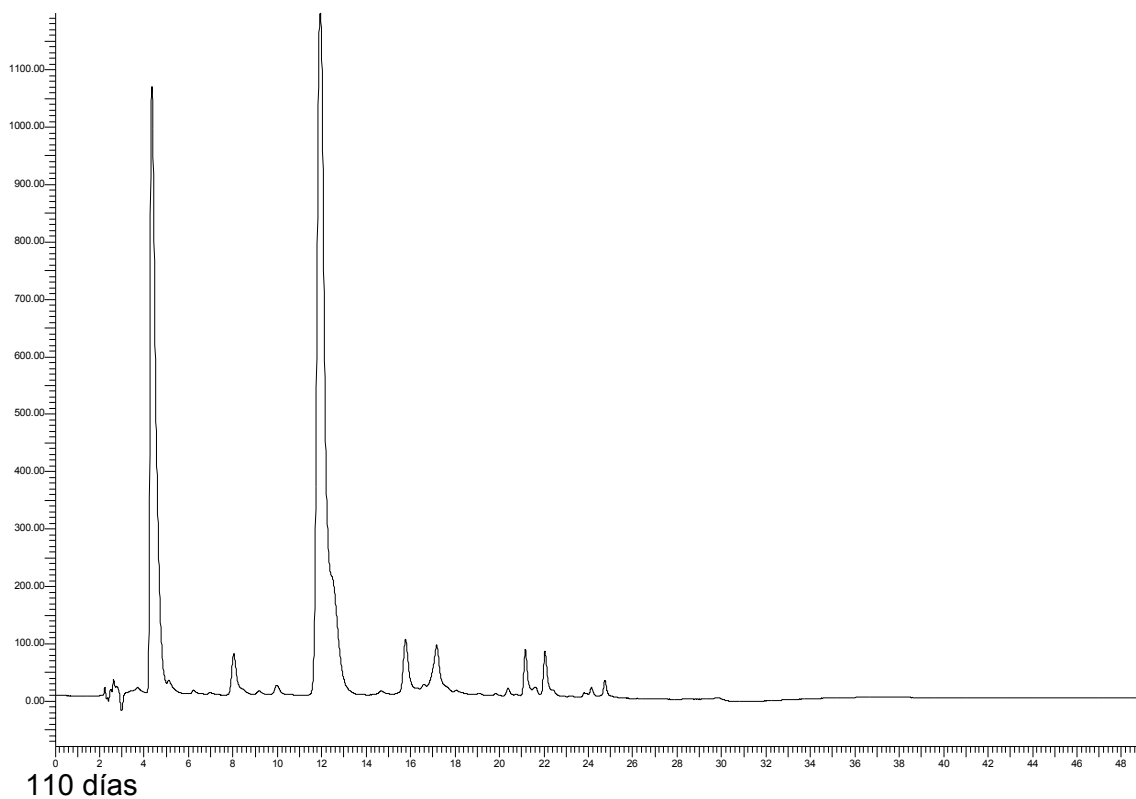


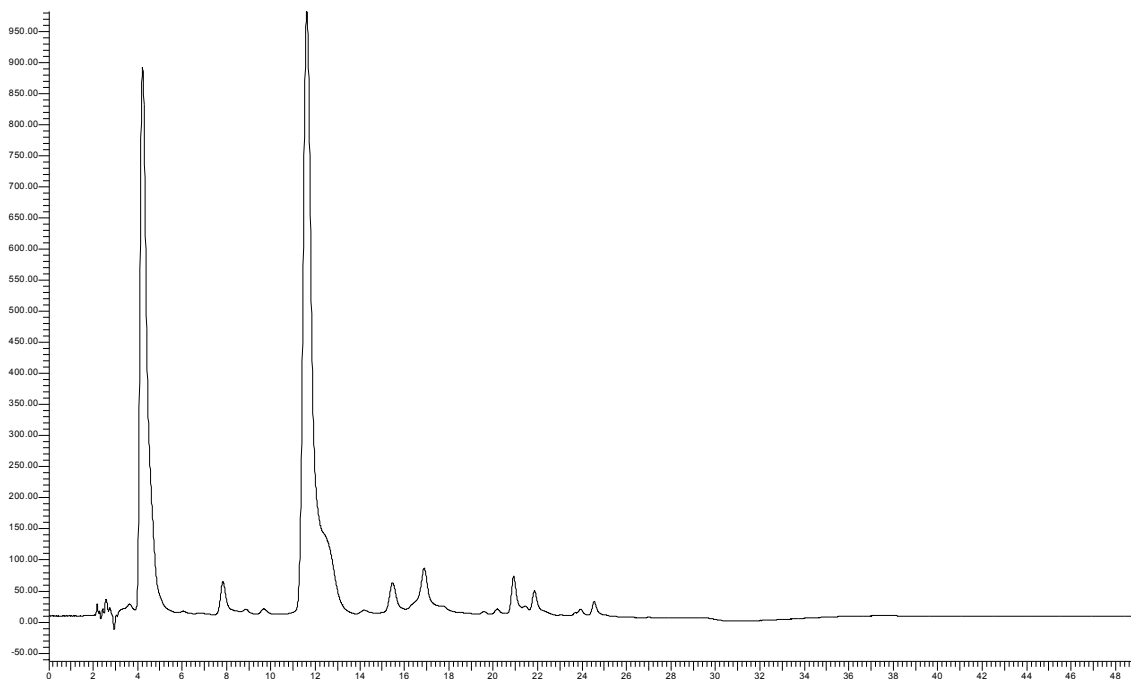
207 días

Barrica B4

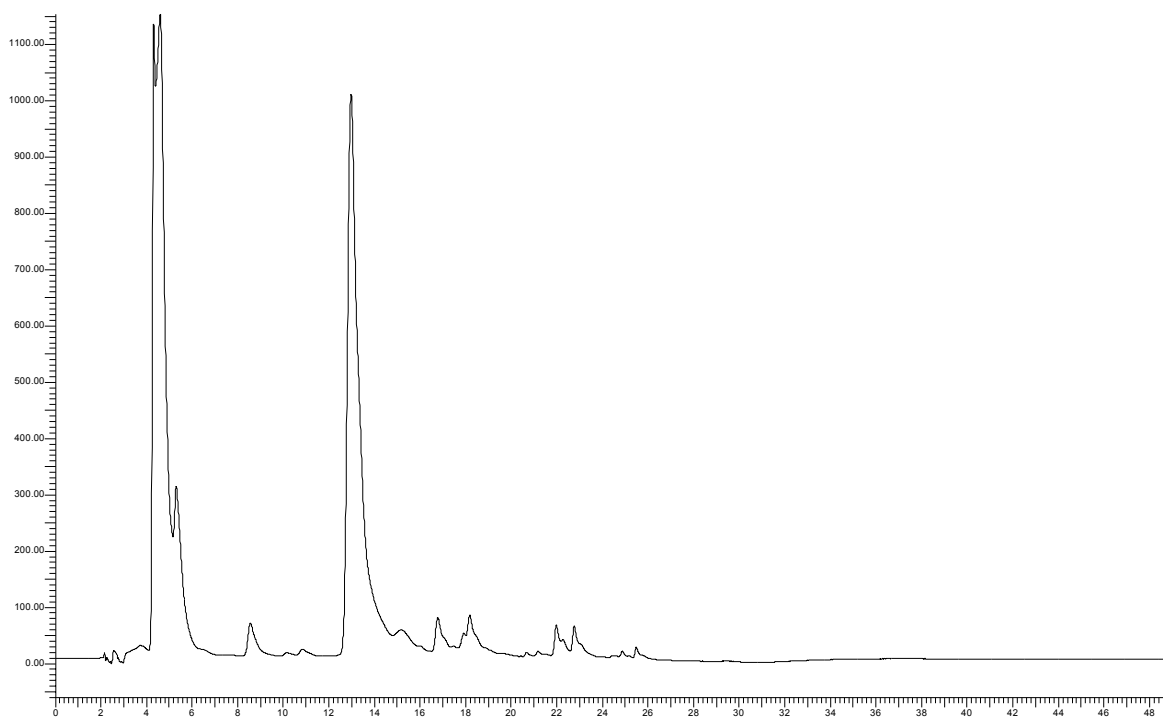


47 días

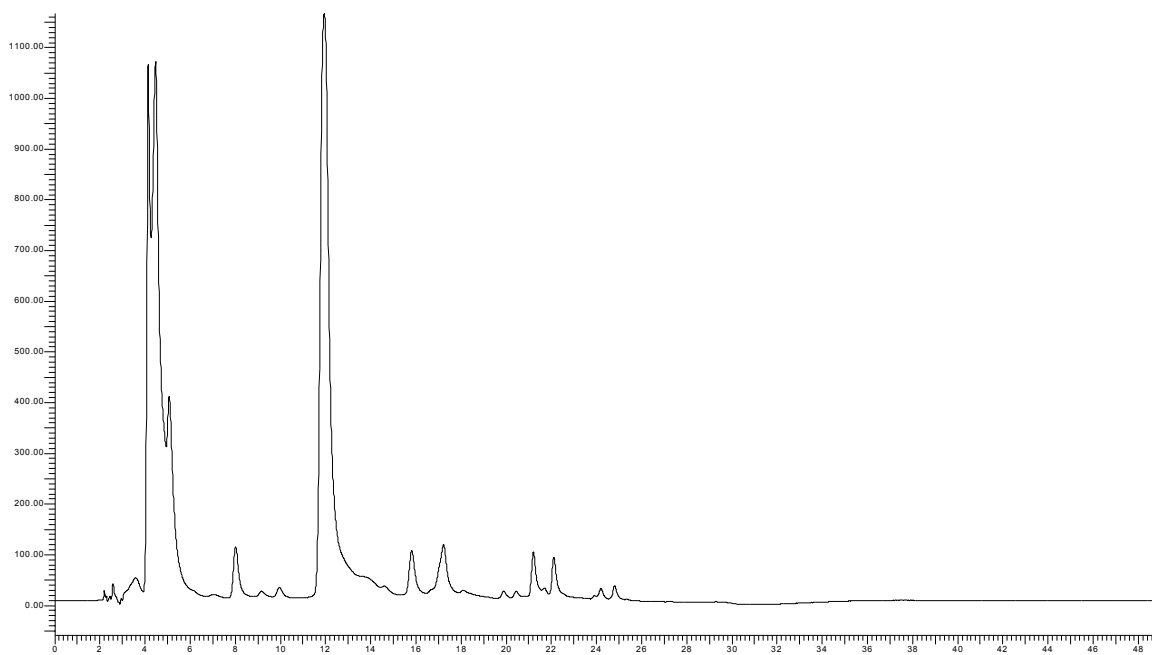




171 días

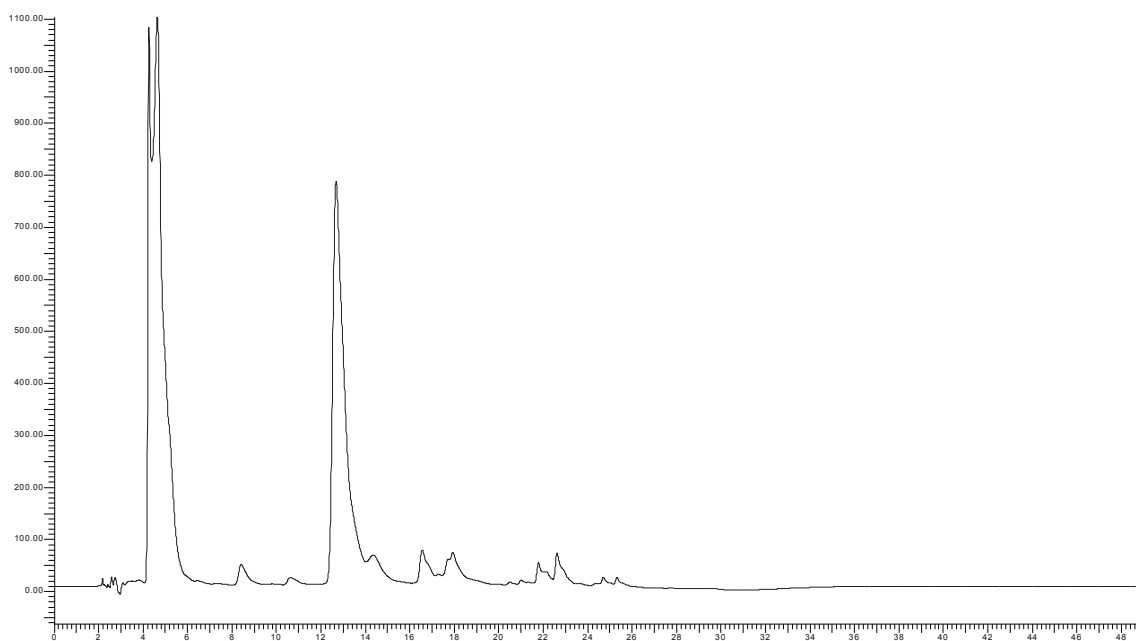


195 días

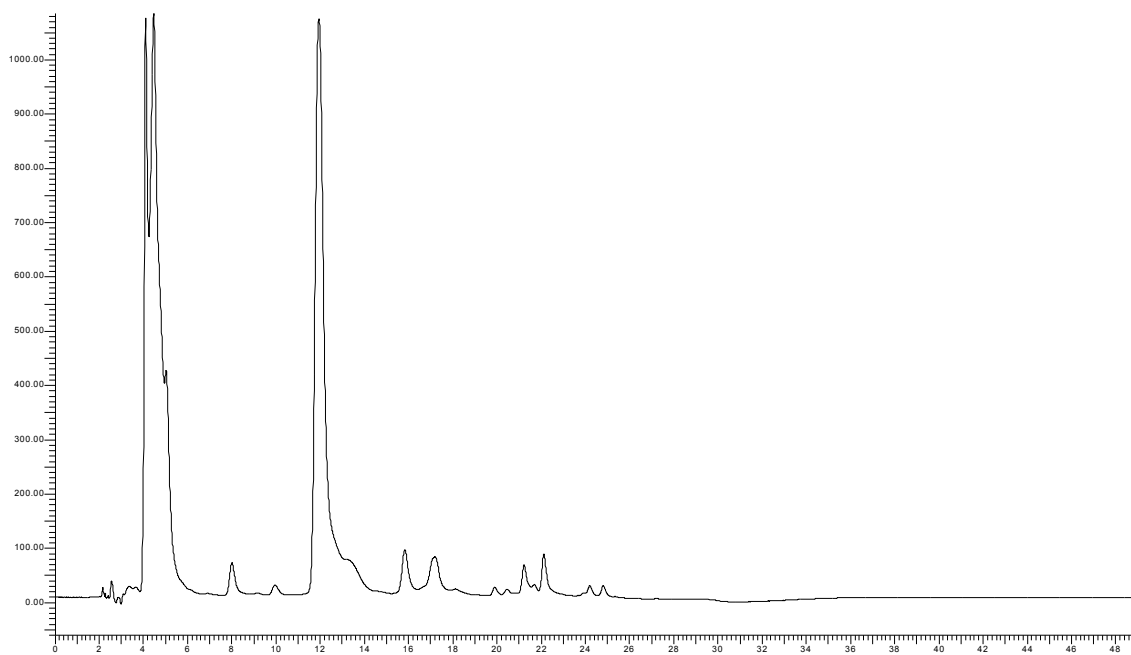


207 días

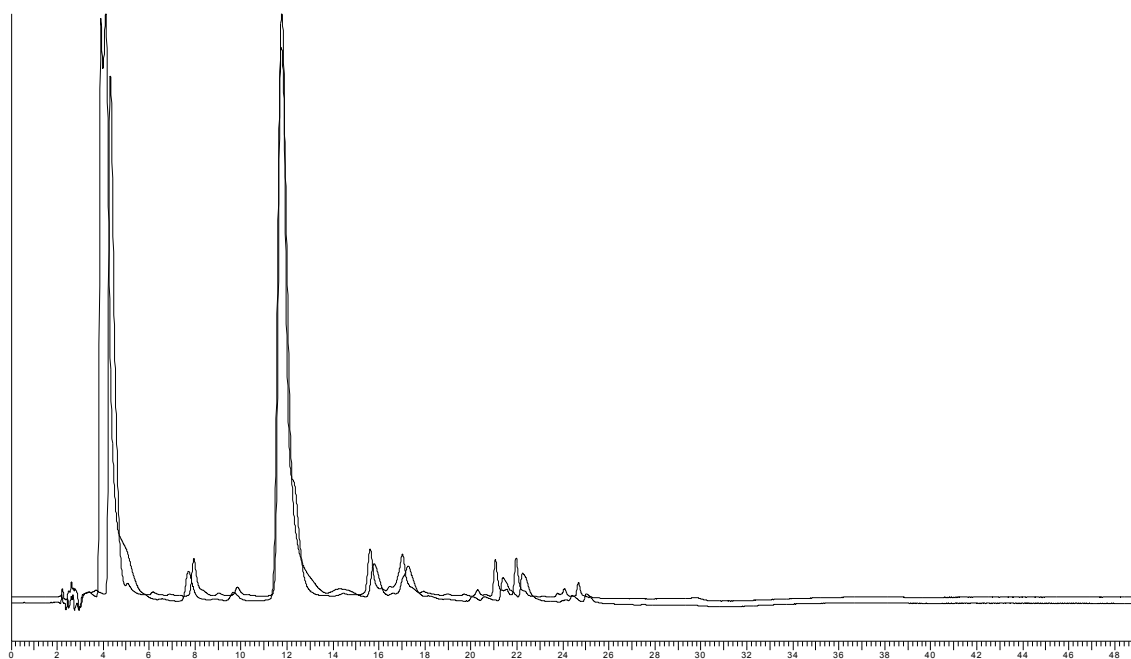
Barrica B7



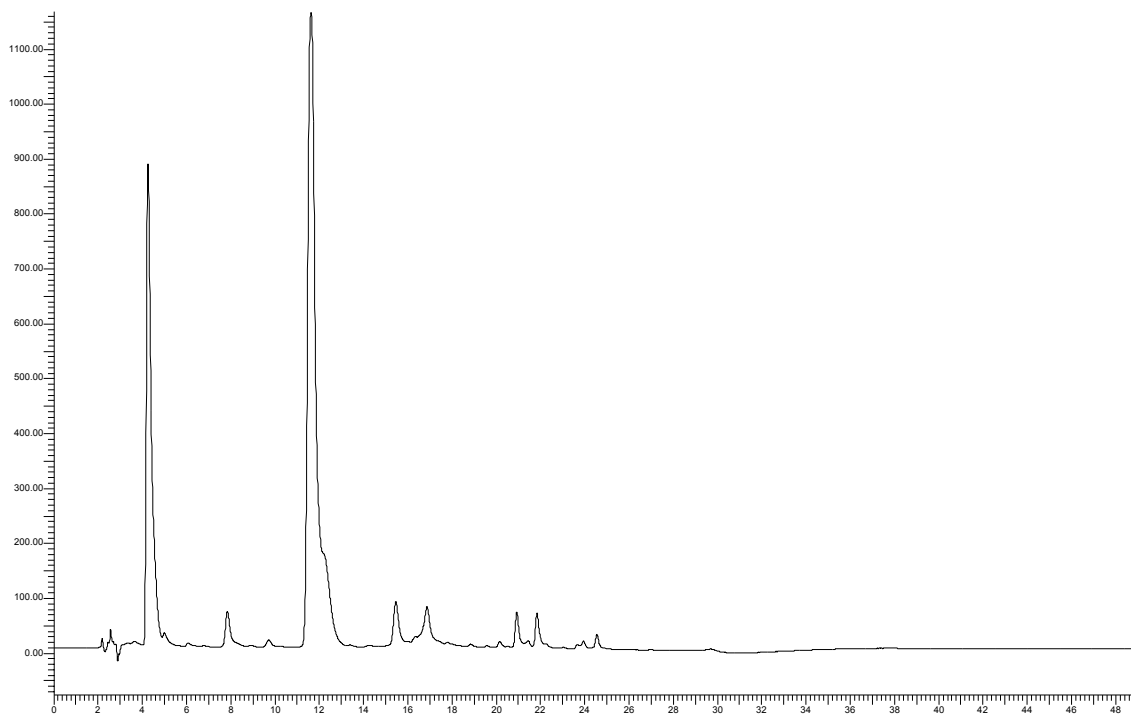
47 días



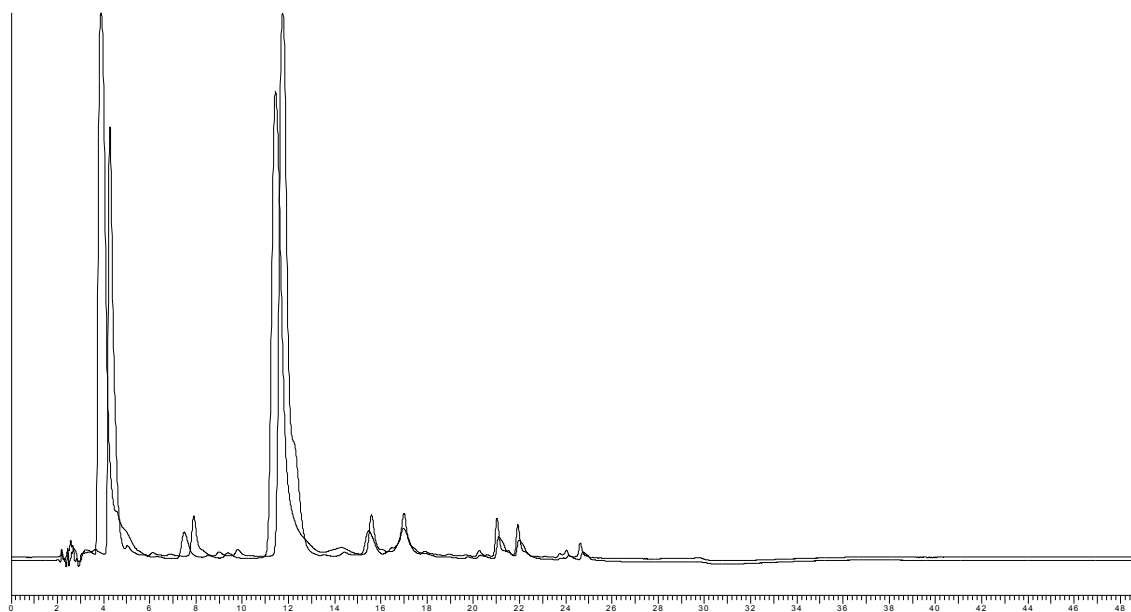
75 días



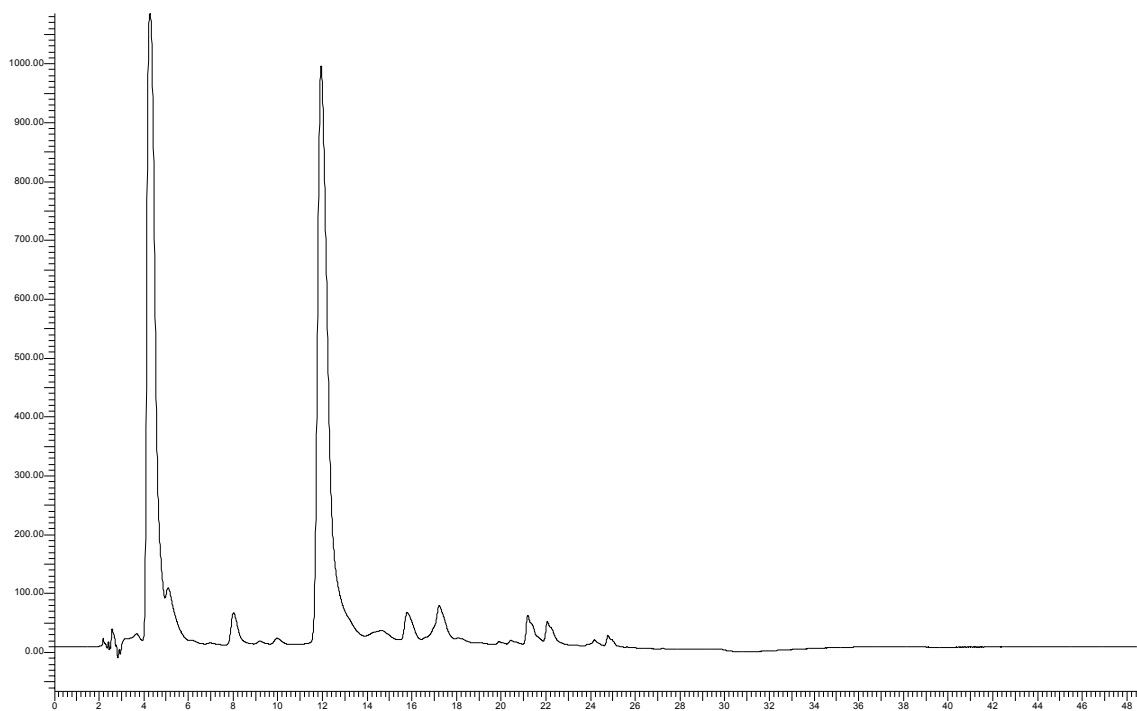
110 días



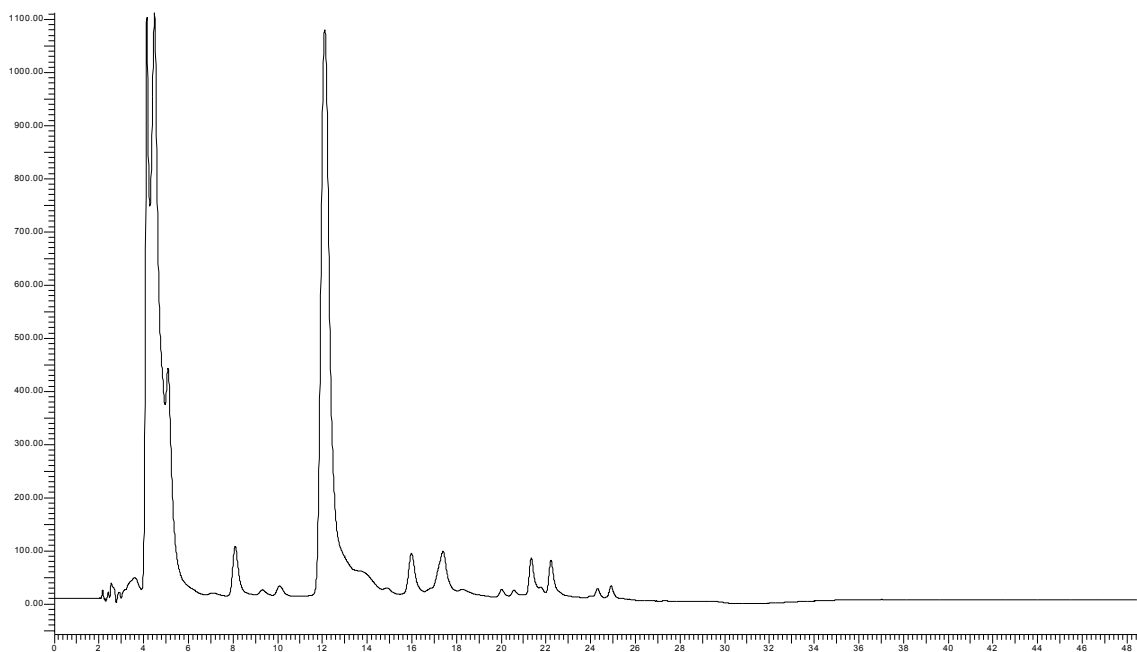
131 días



175 días



195 días



207 días

ANEXO 4. Concentraciones de fenoles (mg/L) en el mezcal de Durango a diferentes tiempos de reposo en barriles de madera de encino blanco.

Com- puesto	Tiempo de reposo (días)																					
	47			75			110			131			175			191			206			
	B1	B4	B7	B1	B4	B7	B1	B4	B7	B1	B4	B7	B1	B4	B7	B1	B4	B7	B1	B4	B7	
1	33.65	34.307	34.578	34.701	34.701	34.701	34.701	34.701	34.701	34.701	34.701	34.701	34.701	34.701	34.701	34.701	34.701	34.701	34.701	34.701	34.701	34.701
2	33.256	35.227	34.701	34.786	36.015	35.227	34.701	34.701	35.358	36.804	35.621	35.368	37.581	37.329	39.053	40.196	41.018	43.9	46.659	46.157	39.957	40.817
3																						
4																						
5																						
6																						
7																						
8																						
9																						
10																						
11																						