



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA

AGROINDUSTRIAL

POSGRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA

METABOLITOS RESPONSABLES DE LAS PROPIEDADES SENSORIALES
EN MEZCAL OAXAQUEÑO

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS AGROALIMENTARIAS



APROBADA



PRESENTA

ROSA LÓPEZ AGUILAR

BAJO LA SUPERVISIÓN DE: DR. ARTURO HERNÁNDEZ MONTES



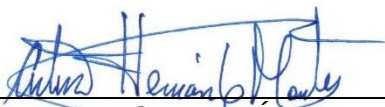
Chapingo, Estado de México, noviembre de 2022.

**METABOLITOS RESPONSABLES DE LAS PROPIEDADES SENSORIALES
EN MEZCAL OAXAQUEÑO**

Tesis realizada por **ROSA LÓPEZ AGUILAR** bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS AGROALIMENTARIAS

DIRECTOR:



DR. ARTURO HERNÁNDEZ MONTES

CO-DIRECTOR:



DR. JOSÉ ENRIQUE HERBERT-PUCHETA

ASESOR:



DR. HOLBER ZULETA PRADA

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS	vii
LISTA DE FIGURAS	x
AGRADECIMIENTOS	xv
DATOS BIOGRÁFICOS.....	xvi
RESUMEN GENERAL	xvii
GENERAL ABSTRACT	xviii
1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1.1 Objetivo general	3
1.2 Objetivos específicos	3
1.3 Hipótesis.....	4
1.4 Organización de la tesis	4
1.5 Literatura citada.....	5
2. REVISIÓN DE LITERATURA	11
2.1 Mezcal	11
2.2 Especies empleadas en el mezcal	12
2.3 Estados productores de mezcal	12
2.4 Proceso de elaboración de mezcal	14
2.5 Compuestos volátiles del mezcal	18
2.6 Métodos de identificación de compuestos.....	21
2.6.1 Espectroscopía de Resonancia magnética nuclear	21
2.6.2 Espectroscopía de infrarrojo	23
2.6.3 Cromatografía de gases.....	24
2.7 Literatura citada.....	25
3. PERFILES METABOLÓMICOS DE MEZCALES ARTESANALES Y ANCESTRALES BASADOS EN RMN Y MSA PARA DISCRIMINAR ORÍGENES GEOGRÁFICOS, ESPECIES DE AGAVE Y PROCESOS DE MANUFACTURA, EN FUNCIÓN DE SUS ATRIBUTOS DE CALIDAD	38

4.6.3	Cuantificación de compuestos volátiles por GC-FID	78
4.6.4	Análisis estadístico de los datos	78
4.7	Resultados y discusión.....	79
4.7.1	Variables fisicoquímicas.....	79
4.7.2	Discriminación de mezcales por espectroscopía de infrarrojo	81
4.7.3	Compuestos volátiles identificados por SPME-GC-MS.....	88
4.7.4	Cuantificación alcoholes superiores y furfural en mezcales por GC-FID	100
4.8	Conclusiones.....	104
4.9	Literatura citada.....	71
5.	METABOLÓMICA BASADA EN GC-MS DE COMPUESTOS VOLÁTILES EN MEZCALES PARA ESTABLECIMIENTO DE PERFILES ASOCIADOS A PROCESOS DE MANUFACTURA, ORIGEN GEOGRÁFICO Y ESPECIE DE AGAVES	114
5.1	Resumen.....	114
5.2	Abstract	115
5.3	Introducción.....	116
5.4	Materiales y métodos	119
5.4.1	Reactivos	119
5.4.2	Muestras de mezcal	119
5.5	Métodos analíticos	120
5.5.1	Contenido alcohólico.....	120
5.5.2	Compuestos volátiles	120
5.6	Resultados y discusión.....	123
5.6.1	Contenido alcohólico.....	123
5.6.2	Método de separación de cromatografía de gases	125
5.6.3	Metabolómica no dirigida basada en cromatografía de gases	130
5.6.4	Metabolómica dirigida basada en cromatografía de gases	137
5.6.5	Perfiles masa/carga obtenidos por GC-EI-MS	138
5.7	Conclusiones.....	144
5.8	Literatura citada.....	145

6. DESCRIPCIÓN SENSORIAL DE MEZCAL OAXAQUEÑO PROVENIENTE DE TRES ESPECIES DE AGAVE	154
6.1 Resumen	154
6.2 Abstract	155
6.3 Introducción.....	156
6.4 Materiales y métodos	156
6.4.1 Muestras de mezcal	158
6.4.2 Métodos	159
6.5 Resultados y discusión.....	163
6.5.1 Análisis instrumental	163
6.5.2 Prueba Napping	164
6.5.3 Análisis descriptivo cuantitativo	171
6.5.4 Relación entre variables.....	177
6.6 Conclusiones.....	182
6.7 Literatura citada.....	183
7. CONCLUSIONES GENERALES	189
8. ANEXOS.....	190

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Conjunto de muestras de mezcal utilizados para el perfilamiento por $^1\text{H-NMR/MSA}$ arreglados por especie de agave, región y categoría del mezcal.	45
Cuadro 2. Resonancias de $^1\text{H-NMR}$ con desplazamientos químicos (δ , ppm), acoplamiento escalar homonuclear de protón (J, Hz) y multiplicidad de las señales de los metabolitos identificados en mezcales mexicanos, que muestran en cada caso los desplazamientos correspondientes.....	60
Cuadro 3. Mezcales empleados en el análisis de espectroscopía de infrarrojo y cromatografía de gases. Se presenta la especie de agave empleada, origen geográfico, proceso de elaboración, contenido alcohólico y pH.	75
Cuadro 4. Contenido alcohólico y pH en mezcales provenientes de Oaxaca y San Luis Potosí, México.....	81
Cuadro 5. Grupos funcionales identificados en mezcales provenientes de Oaxaca y San Luis Potosí, México.....	89
Cuadro 6. Compuestos identificados mediante GC-MS en mezcales <i>A. angustifolia</i> ; <i>A. salmiana</i> y <i>A. potatorum</i> provenientes de Oaxaca y San Luis Potosí, México.	96
Cuadro 7. Contenido de alcoholes superiores y furfural (mg/100 mL) cuantificados por-GC-FID en mezcales de <i>A. angustifolia</i> ; <i>A. salmiana</i> y <i>A. potatorum</i> originarios de Sola de Vega y Tlacolula, Oax y San Luis Potosí.....	100
Cuadro 8. Mezcales empleados en el análisis de GC-MS. Se presenta la especie de agave empleada, origen geográfico, proceso de manufactura, estado y contenido alcohólico (% Alc. Vol).....	123
Cuadro 9. Contenido alcohólico de mezcales ancestrales y artesanales, originarios de Oaxaca y San Luis Potosí, México y elaborados con <i>A. potatorum</i> , <i>A. karwinskii</i> , <i>A. angustifolia</i> y <i>A. salmiana</i>	125
Cuadro 10. Valores de cargas para el componente uno del análisis PLS-DA (origen geográfico y especie de agave) y valores de cargas para un componente ortogonal del análisis OPLS-DA (proceso de manufactura) para cada compuesto identificado, el tiempo de retención en el cual eluyó (rt), con su nota sensorial y	

la fuente de formación del metabolito (planta de agave, cocción del agave y fermentación del mosto).	141
Cuadro 11. Muestras de mezcal empleadas durante el análisis sensorial presentadas por especie de agave, región de producción y proceso de manufactura empleado.	158
Cuadro 12. Contenido alcohólico, pH y sólidos solubles totales en mezcales oaxaqueños elaborados con <i>A. potatorum</i> , <i>A. angustifolia</i> y <i>A. karwinskii</i> elaborados por proceso ancestral y artesanal.	164
Cuadro 13. Lista de atributos (aroma, sabor y sensaciones trigeminales), definición, referencia y valor generados por el panel para el QDA de mezcales oaxaqueños elaborados con <i>A. potatorum</i> , <i>A. angustifolia</i> y <i>A. karwinskii</i> procedentes de Sierra Sur y Valles Centrales (muestreo del año 2022).	172
Cuadro 14. Valores de probabilidad para la interacción panelista x tratamiento de cada variable sensorial generada durante el análisis descriptivo de mezcales oaxaqueños.	173
Cuadro 15. Atributos significativos ($p < 0.05$) identificados por el panel sensorial en mezcales oaxaqueños elaborados con <i>A. potatorum</i> , <i>A. angustifolia</i> y <i>A. karwinskii</i> procedentes de Sierra Sur y Valles Centrales (Muestreo del año 2022).	174
Cuadro 16. Cargas de correlación de las variables sensoriales evaluadas en mezcales oaxaqueños elaborados con <i>A. potatorum</i> , <i>A. angustifolia</i> y <i>A. karwinskii</i> procedentes de Sierra Sur y Valles Centrales (Muestreo del año 2022).	176
Cuadro 17. Matriz de correlaciones de las variables con los componentes uno y dos obtenida del análisis de regresión por mínimos cuadrados parciales tipo dos entre variables sensoriales y químicas de los mezcales oaxaqueños.	179
Cuadro 18. Matriz de correlaciones de las variables con los componentes uno y dos obtenida del análisis de regresión por mínimos cuadrados tipo dos parciales entre variables sensoriales y químicas de los mezcales oaxaqueños.	180

Cuadro 19. Parámetros Q^2 , R^2Y y R^2X que indican la calidad del modelo de regresión por mínimos cuadrados parciales tipo dos entre variables sensoriales y químicas de los mezcales oaxaqueños.	182
---	-----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estados mexicanos que cuentan con Denominación de Origen Mezcal.	13
Figura 2. Materiales empleados para evaluar el contenido alcohólico en la destilación artesanal y ancestral de mezcal en los estados de Oaxaca (A y B) y Tamaulipas (C y D), México.....	18
Figura 3. Espectro { ¹ Hwater_presat NMR} de muestras de mezcal de <i>A. angustifolia</i> , <i>A. potatorum</i> , <i>A. salmiana</i> , <i>A. cupreata</i> y sus mezclas.	48
Figura 4. Esquema de multipresaturación agua-etanol mediante experimento NOESY-1D { ¹ Hwater_presat NMR} en mezcales oaxaqueños artesanales y ancestrales.....	49
Figura 5. Análisis estadístico multivariado del OPLS-DA generados de la matriz de datos de NMR-1D: { ¹ Hwater_presat NMR} para el factor región de procedencia del mezcal.	52
Figura 6. Curvas de precisión de la predicción como una función de los componentes del PLS-DA (A), significancia de la prueba de permutación (B), análisis de componentes principales (C) obtenidos de la matriz de datos de NMR y gráfico de cargas del OPLS-DA de mezcales (D).	52
Figura 7. Análisis estadístico multivariado del OPLS-DA generados de la matriz de datos de NMR-1D: { ¹ Hwater_presat NMR} para el factor especie de agave utilizada en la manufactura del mezcal.	53
Figura 8. Curvas de precisión de la predicción como una función de los componentes del PLS-DA (A), significancia de la prueba de permutación (B), análisis de componentes principales (C) obtenidos de la matriz de datos de ¹ H-NMR y gráfico de cargas del OPLS-DA de mezcales (D).	54
Figura 9. Gráfico de puntuaciones del análisis estadístico multivariado OPLS-DA generados de la matriz de datos de NMR-1D { ¹ Hwater_presat NMR} para el factor categoría del mezcal.	54
Figura 10. Curvas de precisión de la predicción como una función de los componentes del PLS-DA (A), significancia de la prueba de permutación (B), análisis de componentes principales (C) obtenidos de la matriz de datos de ¹ H-	

NMR y gráfico de cargas del análisis discriminante OPLS-DA de mezcales (D).	55
Figura 11. Gráfico de cargas del modelo OPLS-DA de los factores discriminantes: región (A), especie (B) y proceso (C) evaluado en una matriz de ^1H -NMR obtenida en mezcal.	57
Figura 12. Gráficos apilados de los espectros de ^1H -NMR de mezcales Mexicanos, con asignación preliminar de señales basada en literatura (A) y gráfico de cargas del OPLS-DA [to,1] como una función de los desplazamientos químicos de protón de los metabolitos identificados y sus desplazamientos químicos asignados (B).	59
Figura 13. Análisis de componentes principales implementado en la matriz de datos obtenida por FT-MIR para discriminar mezcales por especie: <i>A. angustifolia</i> , <i>A. potatorum</i> y <i>A. salmiana</i> (A); por origen geográfico: San Luis Potosí (SLP), Sola de Vega y Tlacolula, Oax (B) y por proceso: ancestral y artesanal (C).	82
Figura 14. Análisis discriminante PLS implementado en la matriz de datos obtenida por FT-MIR- para discriminar mezcales por especie: <i>A. angustifolia</i> , <i>A. potatorum</i> y <i>A. salmiana</i> (A), por origen geográfico: San Luis Potosí: SLP, Sola de Vega y Tlacolula, Oax (B) y por proceso: ancestral y artesanal (C).....	84
Figura 15. Análisis discriminante OPLS implementado en la matriz de datos obtenida por FT-MIR para discriminar mezcales por especie: <i>A. angustifolia</i> y <i>A. potatorum</i> (A), por origen geográfico: Sola de Vega y Tlacolula, Oax (B) y por proceso: ancestral y artesanal (C).	86
Figura 16. Parámetros del modelo OPLS-DA implementado en la matriz de datos obtenida por FT-MIR para discriminar mezcales por especie: <i>A. angustifolia</i> y <i>A. potatorum</i> (A y D), por origen geográfico: Sola de Vega y Tlacolula, Oax (B y E) y por proceso: ancestral y artesanal (C y F).	87
Figura 17. Espectroscopía de infrarrojo por FT-MIR en mezcales provenientes de Oaxaca y San Luis Potosí, México. Espectro promedio con n=4 (<i>A. potatorum</i>), n=2 (<i>A. salmiana</i>) y n=9 (<i>A. angustifolia</i>).	89

Figura 18. Análisis de componentes principales implementado en la matriz de datos obtenida por GC-MS para discriminar mezcales por especie: <i>A. angustifolia</i> , <i>A. potatorum</i> y <i>A. salmiana</i> (A), por origen: procedentes de San Luis Potosí (SLP), Sola de Vega y Tlacolula, Oax. (B) y por proceso: ancestral y artesanal (C).	91
Figura 19. Análisis discriminante por PLS implementado en la matriz de datos obtenida por GC-MS para discriminar mezcales por especie: <i>A. angustifolia</i> , <i>A. potatorum</i> y <i>A. salmiana</i> (A), por origen geográfico: San Luis Potosí (SLP), Sola de Vega y Tlacolula, Oax (B) y por proceso: ancestral y artesanal (C).....	92
Figura 20. Análisis discriminante OPLS implementado en la matriz de datos obtenida por GC-MS para discriminar mezcales por especie: <i>A. angustifolia</i> y <i>A. potatorum</i> (A); por origen geográfico: Sola de Vega y Tlacolula, Oax. (B) y por proceso: ancestral y artesanal (C).	93
Figura 21. Parámetros del modelo OPLS-DA implementado en la matriz de datos obtenida por GC-MS para discriminar mezcales por especie: <i>A. angustifolia</i> y <i>A. potatorum</i> (A y D), por origen geográfico: Sola de Vega y Tlacolula, Oax. (B y E) y por proceso: ancestral y artesanal (C y F).	94
Figura 22. Análisis de componentes principales de la matriz de datos obtenida por GC-MS en mezcal de <i>A. potatorum</i> , <i>A. angustifolia</i> y <i>A. salmiana</i> . Componente principal uno explica el 55.09 % y el componente principal dos el 44.91 %.....	99
Figura 23. Análisis de componentes principales de la matriz de datos obtenida por GC-MS en mezcal de San Luis Potosí y Villa Sola de Vega y Tlacolula, Oax.	99
Figura 24. Formación de ésteres a partir de complejos enzimáticos y alcoholes. (A) Formación de acetato de isoamilo. (B) Formación de ácido octanoico, etil éster.....	101
Figura 25. Análisis de componentes principales de la matriz de datos obtenida por GC-FID en mezcal de <i>A. potatorum</i> , <i>A. angustifolia</i> y <i>A. salmiana</i>	103
Figura 26. Análisis de componentes principales de la matriz de datos obtenida por GC-FID en mezcal de San Luis Potosí y Villa Sola de Vega y Tlacolula, Oax.	

Componente principal uno explica el 86.74 % y componente principal dos el 13.26 %.....	103
Figura 27. Matriz de datos de cromatografía de gases de mezcales sometida a análisis estadístico multivariado para metabolómica dirigida y no dirigida, obtenida del método de separación uno.	127
Figura 28. Matriz de datos de cromatografía de gases de mezcales sometida a análisis estadístico multivariado para metabolómica dirigida y no dirigida, obtenida del método de separación dos.	128
Figura 29. Análisis de componentes principales obtenido de la matriz de datos de cromatografía de gases con el método de separación dos.....	129
Figura 30. Análisis estadístico multivariado supervisado OPLS-DA (A) y PLS-DA (B y C), obtenido de la matriz de datos de cromatografía de gases con el método de separación dos.....	129
Figura 31. Análisis de componentes principales obtenido de la matriz de datos de cromatografía de gases con el método de separación uno.	130
Figura 32. Analisis discriminante supervisado de mezcales por mínimos cuadrados parciales ortogonales [OPLS-DA, (A)] y de mínimos cuadrados parciales [PLS-DA, (B y C)].....	135
Figura 33. Coeficientes del análisis de permutación del modelo OPLS-DA entre un componente predictivo (p1) y cuatro ortogonales (o1, o2, o3 y o4).	136
Figura 34. Gráfico de cargas de los modelos OPLS-DA (A) para discriminar entre mezcales ancestrales y artesanales y PLS-DA (B y C) para evaluar origen geográfico y especies de agave, como una función de los tiempos de retención de la cromatografía de gases.....	136
Figura 35. Rango continuo de reflexión especular entre el patrón de fragmentación de m/z experimental (gráfico azul) con respecto al patrón de fragmentación de m/z obtenido de la base de datos del NIST (gráficos rojos) para 12 metabolitos identificados mediante experimentos de EI-GC-MS.	144
Figura 36. Mezcales oaxaqueños ancestrales (identificados con letras azules) y artesanales (identificados con letras verdes) elaborados con <i>A. angustifolia</i> , <i>A. potatorum</i> y <i>A. karwinskii</i> , evaluados durante la prueba sensorial Napping. ..	165

Figura 37. Mezcales oaxaqueños ancestrales (identificados con letras azules) y artesanales (identificados con letras verdes), colectados en el año 2022, elaborados con <i>A. angustifolia</i> , <i>A. potatorum</i> y <i>A. karwinskii</i> , evaluados durante la prueba sensorial Napping.	167
Figura 38. Mezcales oaxaqueños ancestrales (identificados con letras azules) y artesanales (identificados con letras verdes), colectados en el año 2020, elaborados con <i>A. angustifolia</i> y <i>A. potatorum</i> , evaluados durante la prueba sensorial Napping.	168
Figura 39. Coeficientes RV entre cada configuración (juez) y el consenso obtenidos durante la prueba Napping de muestras de mezcal oaxaqueños ancestrales y artesanales elaborados con <i>A. angustifolia</i> , <i>A. potatorum</i> y <i>A. karwinskii</i> (muestreo del año 2022).	170
Figura 40. Coeficientes RV entre cada configuración (juez) y el consenso obtenidos durante la prueba Napping de muestras de mezcal oaxaqueños ancestrales y artesanales elaborados con <i>A. angustifolia</i> y <i>A. potatorum</i> (muestreo del año 2020).	170
Figura 41. Análisis factorial múltiple para estudiar las variables químicas y sensoriales (obtenidas de prueba Napping) correspondientes a los mezcales <i>A. potatorum</i> y <i>A. angustifolia</i> de Valles Centrales y Sierra Sur, Oaxaca (muestreo del año 2020).	171
Figura 42. Bi-plot de cargas de correlación y calificaciones del análisis de componentes principales para atributos sensoriales de mezcales <i>A. potatorum</i> , <i>A. angustifolia</i> y <i>A. karwinskii</i> de Valles Centrales y Sierra Sur, Oaxaca (muestreo del año 2022).	177
Figura 43. Análisis por mínimos cuadrados parciales tipo dos antes de la eliminación de las cuatro variables con coeficiente de correlación menor a 0.5 (A) y después de la eliminación de las cuatro variables con coeficiente de correlación menor a 0.5 (B).	178

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Chapingo, por darme la oportunidad de continuar con mi formación profesional.

Al Programa de Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, en particular al Doctorado en Ciencias Agroalimentarias, por permitirme seguir con mi desarrollo profesional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para continuar con mis estudios de doctorado.

DATOS BIOGRÁFICOS



Datos personales

Nombre : Rosa López Aguilar
Fecha de nacimiento: 29 de agosto de 1986
Lugar de nacimiento: La Trinitaria, Chiapas
CURP: LOAR860829MCSPGS03
Profesión: Ingeniero Agroindustrial

Desarrollo académico

Licenciatura: Ingeniería Agroindustrial, Universidad Autónoma Chapingo.

Maestría: Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, Universidad Autónoma Chapingo.

RESUMEN GENERAL

METABOLITOS RESPONSABLES DE LAS PROPIEDADES SENSORIALES EN MEZCAL OAXAQUEÑO

La composición volátil del mezcal está asociada a las especies de agave que a su vez son ligadas a su lugar de origen y al proceso de manufactura. En este sentido, se implementaron experimentos de resonancia magnética nuclear (^1H -RMN) que permitieron establecer el perfil metabolómico de los mezcales. También, mediante espectroscopía de infrarrojo se pudo asociar las principales vibraciones moleculares con los compuestos presentes en las muestras. Posteriormente se diseñaron rutinas experimentales mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) para encontrar las huellas metabolómicas responsables de las discriminaciones por origen geográfico, especie de agave y proceso de manufactura. Finalmente, se realizaron pruebas sensoriales para correlacionar las variables químicas obtenidas durante la investigación con las variables sensoriales que permitiera describir los mezcales elaborados con *Agave angustifolia*, *Agave potatorum* y *Agave karwinskii*. Los principales resultados mostraron once metabolitos obtenidos por ^1H -RMN y doce identificados por GC-MS como los responsables de las discriminaciones de los mezcales. La evaluación sensorial mostró que el mezcal elaborado con *A. potatorum* fue definido con el atributo floral; los alcoholes superiores 1-butanol y 2-butanol del mezcal de *A. angustifolia* se relacionaron con el atributo ardiente y el éster ftalato de dibutilo identificado en el mezcal de *A. karwinkii* correlacionó con el descriptor ahumado.

Palabras clave: mezcal, metabolitos, ^1H -RMN, GC-MS, sensorial.

GENERAL ABSTRACT

METABOLITES RESPONSIBLE FOR THE SENSORY PROPERTIES IN OAXACAN MEZCAL

The volatile composition of mezcal is influenced by agave species that are in turn linked to their place of origin and the manufacturing process. In this context, nuclear magnetic resonance experiments (^1H RMN) were implemented to establish the metabolomic profile of mezcals. Moreover, the infrared spectroscopy allowed to associate the main molecular vibrations with the compounds present in the samples. Subsequently, experimental routines by using gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) were designed to find the fingerprinting responsible for discriminations by geographical origin, agave species and manufacturing process. Finally, sensory tests were performed to correlate the chemical variables obtained during the research with the sensory variables that allowed to describe the mezcals made with *Agave angustifolia*, *Agave potatorum* and *Agave karwinskii*. The main results showed that eleven metabolites obtained by ^1H RMN and twelve identified by GC-MS were responsible for the discrimination of mezcals. Sensory analysis showed that the mezcal made with *A. potatorum* was defined with the floral descriptor; the higher alcohols 1-butanol and 2-butanol of *A. angustifolia* mezcal were related to the burning sensation and the dibutyl phthalate ester identified in the mezcal of *A. karwinskii* correlated with the smoked attribute.

Key words: mezcal, metabolites, ^1H -RMN, GC-MS, sensory.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

El mezcal es una bebida elaborada mediante destilación del jugo de agave fermentado (Nolasco-Cancino et al., 2022). Para su elaboración se emplean diversas especies de agaves maduros, entre las que destacan *Agave angustifolia*, *Agave durangensis*, *Agave salmiana*, *Agave cupreata*, *Agave potatorum*, *Agave tequilana* y *Agave karwinskii* (Consejo Mexicano Regulador de la Calidad del Mezcal, 2022). Los agaves referidos están distribuidos en el territorio Mexicano, sin embargo, únicamente nueve estados cuentan con la denominación de origen mezcal, la cual incluye municipios de Oaxaca, Puebla, San Luis Potosí, Tamaulipas, Zacatecas, Durango, Guerrero, Guanajuato y Michoacán (Consejo Mexicano Regulador de la Calidad del Mezcal, 2022; Hernández-López, 2018). En el estado de Oaxaca, toma el nombre de palenque a la pequeña empresa donde se procesa mezcal (Hernández-López, 2019), mientras que en Durango adopta el nombre de vinata y hace referencia a una empresa artesanal (Barraza-Soto et al., 2014). En función del proceso de elaboración, la NOM-070-SCFI-2016 clasifica el mezcal en tres categorías: mezcal, mezcal artesanal y mezcal ancestral. Las estadísticas indican que en 2021 se produjo a nivel Nacional mayor volumen de mezcal artesanal, seguido por mezcal y finalmente ancestral (Consejo Mexicano Regulador de la Calidad del Mezcal, 2022).

La relevancia del mezcal se puede constatar por sus volúmenes de producción, puesto que pasó de 1 millón de litros en 2012 a 8 millones en 2021, lo que significa un aumento de siete veces en un periodo de 9 años (Consejo Mexicano Regulador de la Calidad del Mezcal, 2022). Esto se traduce a un producto económicamente valorado, aunado al impacto cultural, ambiental y tecnológico que origina en las poblaciones productoras (Rios-Colín et al., 2022).

Sin embargo, el mezcal es una bebida altamente propensa de ser adulterada puesto que puede ser fácilmente mezclada con líquidos más baratos (Esteki et al., 2018), lo que compromete su autenticidad, calidad y su valor en el mercado, además de incrementar el riesgo en la salud de los consumidores (Tabago et al., 2021). Esto conlleva a proponer estrategias que permitan vigilar la seguridad del consumidor de bebidas alcohólicas ya que se estima que alrededor de 40 a 50 % de las bebidas consumidas en México son ilegales y clandestinas (Gaytán, 2018).

En este contexto, nuevos enfoques basados en metabolómica se están implementando para analizar la calidad de bebidas espirituosas y sus adulteraciones (Gougeon et al., 2018). La evaluación de la autenticidad de bebidas implica verificar algunos parámetros como composición, origen y tipo de materias primas (Basalekou et al., 2022). Para lograrlo se requiere del conocimiento de dos campos científicos como la química analítica y la ciencia computacional, específicamente, métodos estadísticos multivariados (Fernandez-Lozano et al., 2019).

Monakhova (2015) evaluaron la autenticidad de vinos alemanes mediante metabolómica basada en espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protón ($^1\text{HRMN}$) para discriminar variedad de uva, origen geográfico y año de cosecha. Gougeon et al. (2018) y Hu et al. (2020) también emplearon espectroscopía de $^1\text{HRMN}$ para evaluar en vinos chinos el origen geográfico y la variedad de las uvas, cuyos resultados indicaron que el contenido de metabolitos puede ayudar a diferenciar entre vinos de distintas variedades.

Por otro lado, la espectroscopía de infrarrojo (IR) es una técnica instrumental no destructiva, sensitiva, rápida (30 muestras/hora), poderosa, amigable con el ambiente; se usa ampliamente para la caracterización y clasificación de bebidas alcohólicas (Arslan et al., 2021; Lachenmeier, 2007; Yadav & Sharma, 2019).

La espectroscopía de infrarrojo medio (MIR) se ha empleado en cerveza para evaluar autenticidad (Lachenmeier, 2007), determinar parámetros de calidad (Iñón et al., 2006), monitorear la producción de azúcares durante el macerado

(de Almeida et al., 2018). La espectroscopía por MIR se empleó para predecir atributos sensoriales de vinos con indicación geográfica (GI) del Sur de Australia (Niimi et al., 2021). También en vino, Cozzolino et al. (2011) evaluaron mediante espectroscopía por MIR parámetros composicionales (glucosa, fructosa, pH, acidez volátil y titulable). Finalmente, Cavaglia et al. (2020) usaron esta técnica para monitorear, detectar y corregir contaminación con bacterias acidolácticas en la fermentación de vino blanco. En cuanto a bebidas espirituosas elaboradas con agave, Lachenmeier et al. (2005) emplearon espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) para evaluar la autenticidad y control de calidad en tequilas y recientemente Mondragón-Cortéz et al. (2022) empleó FTIR con reflexión total atenuada (ATR) para caracterizar las etapas de molienda, cocimiento, destilación y añejamiento del tequila, así como en su materia prima (agave crudo). Quintero-Arenas et al. (2020) implementaron experimentos por FTIR-ATR en mezcal para detectar y cuantificar adulteraciones con agua, etanol y metanol.

La cromatografía de gases (GC) se emplea para identificar y cuantificar diferentes metabolitos responsables de las huellas químicas presentes en un producto (Jacobson et al., 2013). Puesto que las bebidas alcohólicas son matrices complejas, se emplea microextracción en fase sólida (SPME) y cromatografía de gases acoplada a detectores de ionización de flama (FID) o de masas (MS). La metodología SPME se caracteriza por ser simple, rápida y sin empleo de solventes (Cuadros-Rodríguez et al., 2016).

En cerveza, se ha empleado GC-FID con SPME para asociar los compuestos volátiles (ésteres, alcoholes y ácidos orgánicos) con sus atributos sensoriales (Li et al., 2015). En vino, se implementó GC-MS con SPME para autenticar el origen botánico de vinos blancos alemanes y encontraron que los terpenos y ésteres fueron los responsables de las clasificaciones (Springer et al., 2014).

En mezcal, las investigaciones de Vera-Guzmán et al. (2009) aportaron el perfil volátil del mezcal oaxaqueño mediante GC-FID, mientras que en otro estudio, Vera-Guzmán et al. (2010) emplearon SPME-GC-MS para relacionar la variación

de los compuestos volátiles del mezcal con el método de manufactura y atribuir las similitudes entre compuestos a la especie de agave. También Vera-Guzmán et al. (2018) emplearon GC-MS con extracción líquido-líquido para encontrar compuestos volátiles discriminantes entre especies de agave, origen geográfico y estación del año. En mezcales de *A. salmiana* se emplearon rutinas de SPME-GC-MS para establecer los marcadores volátiles para autenticar la bebida (De León-Rodríguez et al., 2006).

Los análisis de cromatografía de gases implementados han ayudado a establecer el perfil volátil del mezcal responsable de su sabor y aroma. Los compuestos volátiles están en función de la especie de agave ligadas a su origen geográfico y a las etapas de elaboración de la bebida (Gómez-Zamora et al., 2016; Nolasco-Cancino et al., 2022; Vera-Guzmán et al., 2009)

1.1 Objetivo general

Diseñar una metodología que comprenda nuevos métodos de prueba de autenticidad y metabolómicos dirigidos - no dirigidos de especies nativas de agave, que correlacionados con los análisis sensoriales permitan proponer estrategias de buenas prácticas de manufactura y generar un producto típico de México con calidad internacional.

1.2 Objetivos específicos

Establecer una metodología experimental basada en resonancia magnética nuclear para la obtención de perfiles metabolómicos estadísticamente aceptables, asociados a la distinción por origen geográfico, especies de agave y proceso de manufactura en mezcal.

Proponer un método experimental por espectroscopía de infrarrojo que permita discriminar las muestras por especie de agave, origen geográfico y proceso de manufactura, de tal forma que la información generada contribuya a mantener la calidad de la bebida.

Implementar un método de separación por cromatografía de gases para la obtención de cromatogramas explotables que puedan ser usados como una matriz de datos de entrada para el análisis estadístico multivariado supervisado que permita describir las huellas metabolómicas en mezcales por especie de agave, origen geográfico y procesos de manufactura.

Obtener el perfil sensorial de los mezcales artesanales y ancestrales elaborados con los agaves *A. angustifolia*, *A. potatorum* y *A. karwinskii*, a través de pruebas Napping y análisis descriptivo cuantitativo que permita determinar las correlaciones entre perfiles metabolómicos y perfiles sensoriales a través de un modelo de regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS-R).

1.3 Hipótesis

Los metabolitos del mezcal permitirán establecer discriminaciones asociadas a los procesos de manufactura, al origen geográfico y a las especies de agave empleadas.

El perfil volátil de los mezcales influirá en los atributos sensoriales desarrollados por un panel, que a su vez permitirá describir las principales características del destilado.

1.4 Organización de la tesis

La tesis está organizada en seis capítulos. El Capítulo uno corresponde a la introducción general.

El Capítulo dos incluye la revisión de literatura, para esto, se hizo una búsqueda de las principales especies de agave empleadas en la elaboración del mezcal, los métodos de manufactura y los estados productores. También se incluyó los principales compuestos volátiles que caracterizan a esta bebida. Además se describen las principales aplicaciones realizadas con cada una de las técnicas instrumentales empleadas en este proyecto.

El Capítulo tres presenta la implementación de experimentos de resonancia magnética nuclear con métodos estadísticos multivariados para establecer

perfiles metabolómicos del mezcal ancestral y artesanal elaborados en Puebla, San Luis Potosí y Oaxaca con las especies *Agave angustifolia*, *Agave potatorum*, *Agave salmiana*, *Agave cupreata*, *Agave americana* 'Americana', *Agave americana* 'Oaxacensis'. Este capítulo fue publicado como artículo científico en la revista Foods. En la sección de anexos se muestra la primera página del artículo publicado.

El Capítulo cuatro comprende el uso de espectroscopía de infrarrojo y estadística multivariada para discriminar mezcales por especie de agave, origen geográfico y proceso de manufactura. Además, se cuantificaron los alcoholes superiores mediante cromatografía de gases acoplada a detector de ionización de llama con base a la normatividad mexicana para bebidas alcohólicas.

El Capítulo cinco corresponde al diseño e implementación de un método de separación por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas que permitiera, mediante estadística multivariada, establecer las huellas metabolómicas de los mezcales con base a la especie de agave, origen geográfico y proceso de manufactura. Al momento de la escritura de la tesis, el contenido de este capítulo había sido enviado a Food Science and Technology.

Finamente, el Capítulo seis presenta la descripción sensorial de los mezcales elaborados con los agaves *A. angustifolia*, *A. potatorum* y *A. karwinskii*, la cual se llevó a cabo con la implementación de pruebas Napping y análisis descriptivo cuantitativo a través de un panel conformado por 11 personas. La información obtenida sirvió para establecer la correlación entre las variables químicas y sensoriales por medio de regresión de mínimos cuadrados parciales tipo dos.

1.5 Literatura citada

Arslan, M., Tahir, H. E., Zareef, M., Shi, J., Rakha, A., Bilal, M., Xiaowei, H., Zhihua, L., & Xiaobo, Z. (2021). Recent trends in quality control, discrimination and authentication of alcoholic beverages using nondestructive instrumental techniques. *Trends in Food Science & Technology*, 107, 80–113. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.11.021>

- Barraza-Soto, S., Domínguez-Calleros, P. A., Montiel-Antuna, E., Díaz-Vásquez, M., & Návar-Chaidez, J. (2014). La producción de mezcal en el municipio de Durango, México. *Sociedad, Cultura y Desarrollo Sustentable*, 10, 65–74.
- Basalekou, M., Kyraleou, M., & Kallithraka, S. (2022). Authentication of wine and other alcohol-based beverages—Future global scenario. *Future Foods: Global Trends, Opportunities, and Sustainability Challenges*, 669–695. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91001-9.00028-1>
- Cavaglia, J., Schorn-García, D., Giussani, B., Ferré, J., Busto, O., Aceña, L., Mestres, M., & Boqué, R. (2020). ATR-MIR spectroscopy and multivariate analysis in alcoholic fermentation monitoring and lactic acid bacteria spoilage detection. *Food Control*, 109, 106947. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106947>
- Consejo Mexicano Regulador de la Calidad del Mezcal. (2022). *Informe estadístico 2022*. Retrieved from <https://comercam-dom.org.mx/estadisticas/>
- Cozzolino, D., Cynkar, W., Shah, N., & Smith, P. (2011). Feasibility study on the use of attenuated total reflectance mid-infrared for analysis of compositional parameters in wine. *Food Research International*, 44(1), 181–186. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.10.043>
- Cuadros-Rodríguez, L., Ruiz-Samblás, C., Valverde-Som, L., Pérez-Castaño, E., & González-Casado, A. (2016). Chromatographic fingerprinting: An innovative approach for food “identification” and food authentication – A tutorial. *Analytica Chimica Acta*, 909, 9–23. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.12.042>
- de Almeida, F. S., de Andrade Silva, C. A., Lima, S. M., Suarez, Y. R., & da Cunha Andrade, L. H. (2018). Use of Fourier transform infrared spectroscopy to monitor sugars in the beer mashing process. *Food Chemistry*, 263, 112–118. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.109>
- De León-Rodríguez, A., González-Hernández, L., P. Barba de la Rosa, A., Escalante-Minakata, P., & G. López, M. (2006). Characterization of Volatile Compounds of Mezcal, an Ethnic Alcoholic Beverage Obtained from Agave salmiana. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(4), 1337–1341.

<https://doi.org/10.1021/jf052154+>

- Esteki, M., Simal-Gandara, J., Shahsavari, Z., Zandbaaf, S., Dashtaki, E., & Vander Heyden, Y. (2018). A review on the application of chromatographic methods, coupled to chemometrics, for food authentication. *Food Control*, 93, 165–182. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.06.015>
- Fernandez-Lozano, C., Gestal-Pose, M., Pérez-Caballero, G., Revilla-Vázquez, A. L., & Andrade-Garda, J. M. (2019). Multivariate Classification Techniques to Authenticate Mexican Commercial Spirits. *Quality Control in the Beverage Industry: Volume 17: The Science of Beverages*, 259–287. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816681-9.00008-4>
- Gaytán, M. S. (2018). The perils of protection and the promise of authenticity: Tequila, mezcal, and the case of NOM 186. *Journal of Rural Studies*, 58, 103–111. <https://doi.org/10.1016/J.JRURSTUD.2017.12.017>
- Gómez-Zamora, O., De Jesús-Fuentes, K. I., Peñafiel-López, F., & Tovar-Hernández, P. (2016). Perfil químico y organoléptico de los compuestos volátiles del mezcal. *Investigación y Desarrollo En Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 1(1), 916–923. Retrieved from <http://www.fcb.uanl.mx/IDCyTA/files/volume1/1/10/158.pdf>
- Gougeon, L., Da Costa, G., Le Mao, I., Ma, W., Teissedre, P.-L., Guyon, F., & Richard, T. (2018). Wine Analysis and Authenticity Using 1H-NMR Metabolomics Data: Application to Chinese Wines. *Food Analytical Methods*, 11(12), 3425–3434. <https://doi.org/10.1007/s12161-018-1310-2>
- Hernández-López, J. J. (2018). El mezcal como patrimonio social: de indicaciones geográficas genéricas a denominaciones de origen regionales. *Em Questão*, 24(2), 404. <https://doi.org/10.19132/1808-5245242.404-433>
- Hernández-López, J. J. (2019). Mexican mezcals: The importance of their protection as social heritage. *Ilha Revista de Antropologia*, 20(2), 179–205. <https://doi.org/10.5007/2175-8034.2018v20n2p179>
- Hu, B., Gao, J., Xu, S., Zhu, J., Fan, X., & Zhou, X. (2020). Quality evaluation of different varieties of dry red wine based on nuclear magnetic resonance metabolomics. *Applied Biological Chemistry*, 63(1), 24.

<https://doi.org/10.1186/s13765-020-00509-x>

- Iñón, F. A., Garrigues, S., & de la Guardia, M. (2006). Combination of mid- and near-infrared spectroscopy for the determination of the quality properties of beers. *Analytica Chimica Acta*, 571(2), 167–174. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.04.070>
- Jacobson, D., Monforte, A. R., & Ferreira, A. C. S. (2013). Untangling the Chemistry of Port Wine Aging with the Use of GC-FID, Multivariate Statistics, and Network Reconstruction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(10), 2513–2521. <https://doi.org/10.1021/jf3046544>
- Lachenmeier, D. W. (2007). Rapid quality control of spirit drinks and beer using multivariate data analysis of Fourier transform infrared spectra. *Food Chemistry*, 101(2), 825–832. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.12.032>
- Lachenmeier, D. W., Richling, E., G. López, M., Frank, W., & Schreier, P. (2005). Multivariate Analysis of FTIR and Ion Chromatographic Data for the Quality Control of Tequila. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 2151–2157. <https://doi.org/10.1021/jf048637f>
- Li, G., Liu, F., Kun-Farkas, G., & Kiss, Z. (2015). Quantitative Analysis of Flavor Volatiles in Beer Using Headspace Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography–Flame Ionization Detection (HS-SPME-GC-FID). *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 73(3), 261–265. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-2015-0618-01>
- Monakhova, Y. B., Godelmann, R., Kuballa, T., Mushtakova, S. P., & Rutledge, D. N. (2015). Independent components analysis to increase efficiency of discriminant analysis methods (FDA and LDA): Application to NMR fingerprinting of wine. *Talanta*, 141, 60–65. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.03.037>
- Mondragón-Cortez, P., Herrera-López, E., Arriola-Guevara, E., & Guatemala-Morales, G. (2022). Application of Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) in combination with attenuated total reflection (ATR) for rapid analysis of the tequila production process. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*,

- 21(3). Retrieved from <http://www.rmiq.org/ojs311/index.php/rmiq/article/download/2806/1346>
- Niimi, J., Liland, K. H., Tomic, O., Jeffery, D. W., Bastian, S. E. P., & Boss, P. K. (2021). Prediction of wine sensory properties using mid-infrared spectra of Cabernet Sauvignon and Chardonnay grape berries and wines. *Food Chemistry*, 344, 128634. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128634>
- Nolasco-Cancino, H., Jarquín-Martínez, D., Ruiz Terán, F., & Santiago-Urbina, J. (2022). Behavior of the volatile compounds regulated by the Mexican Official Standard NOM-070-SCFI-2016 during the distillation of artisanal Mezcal. *BioTecnia*, 24(2). Retrieved from <https://biotecnia.unison.mx/index.php/biotecnica/article/view/1577>
- NOM-070-SCFI-2016. Bebidas Alcohólicas-Mezcal-Especificaciones. Retrieved December 7, 2020, from https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5472787&fecha=23/02/2017
- Quintero-Arenas, M. A., Meza-Márquez, O. G., Velázquez-Hernández, J. L., Gallardo-Velázquez, T., & Osorio-Revilla, G. (2020). Quantification of adulterants in mezcal by means of FT-MIR and FT-NIR spectroscopy coupled to multivariate analysis. *CyTA - Journal of Food*, 18(1), 229–239. <https://doi.org/10.1080/19476337.2020.1740327>
- Rios-Colín, A. C., Ruiz-Vega, J., Silva-Rivera, M. E., Caballero-Caballero, M., & Montes-Bernabé, J. L. (2022). Evaluación longitudinal de la sustentabilidad del subsistema de producción maguey-mezcal artesanal, en el municipio de Villa Sola de Vega, Oaxaca, México. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 25(1). <https://doi.org/10.56369/tsaes.4105>
- Springer, A. E., Riedl, J., Esslinger, S., Roth, T., Glomb, M. A., & Fauhl-Hassek, C. (2014). Validated Modeling for German White Wine Varietal Authentication Based on Headspace Solid-Phase Microextraction Online Coupled with Gas Chromatography Mass Spectrometry Fingerprinting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(28), 6844–6851. <https://doi.org/10.1021/jf502042c>
- Tabago, M. K. A. G., Calingacion, M. N., & Garcia, J. (2021). Recent advances in NMR-based metabolomics of alcoholic beverages. *Food Chemistry*:

Molecular Sciences, 2, 100009.
<https://doi.org/10.1016/J.FOCHMS.2020.100009>

- Vera-Guzmán, A., Guzmán-Gerónimo, R., & López, M. (2010). Major and Minor Compounds in a Mexican Spirit, Young Mezcal Coming from Two Agave Species. In *Czech J. Food Sci* (Vol. 28).
- Vera-Guzmán, A., Guzmán-Gerónimo, R., López, M., & Chávez-Servia, J. (2018). Volatile Compound Profiles in Mezcal Spirits as Influenced by Agave Species and Production Processes. *Beverages*, 4(1), 9.
<https://doi.org/10.3390/beverages4010009>
- Vera-Guzmán, A., Santiago-García, P., & López, M. (2009). Compuestos volátiles aromáticos generados durante la elaboración de Mezcal de Agave angustifolia Y Agave potatorum. In *Artículo Científico Rev. Fitotec. Mex* (Vol. 32).
- Yadav, P. K., & Sharma, R. M. (2019). Classification of illicit liquors based on their geographic origin using Attenuated total reflectance (ATR) – Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy and chemometrics. *Forensic Science International*, 295, e1–e5.
<https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2018.12.017>.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Mezcal

El mezcal es una bebida emblemática de México (Espejel-García et al., 2019), además es una de las espirituosas químicamente más puras (López-Rosas et al., 2020). La palabra mezcal se compone de dos vocablos náhuatl, *metl* (maguey) e *ixcalli* (cocción) que juntos forman maguey cocido (López-Nava et al., 2012). Puede ser elaborado con maguey silvestre o cultivado. Aunque de manera indistinta se usa agave o maguey, el término maguey hace referencia a una planta silvestre, y agave cuando es cultivado (Hernández-López, 2019), para fines de esta investigación se usará el término agave.

Únicamente el tallo y/o la base del agave, también conocida como piña o cabeza es la materia prima empleada en la elaboración del mezcal (Durán & Pulido, 2007). Dentro de las prácticas agronómicas que se realizan en el cultivo del agave, se incluye el corte del escape floral (capado) ante de desarrollarse, con la finalidad de producir mayor cantidad de aguamiel con alta concentración de azúcares fermentables en lugar de flores (Figueroa et al., 2014). Sin embargo, se recomienda dejar el 10 o 20 % de los agaves para que florezcan, produzcan fruto y generen descendencia fértil que permita la conservación y el enriquecimiento genético (UNAM, 2018). Las plantas de agave alcanzan su madurez entre los 10 y 25 años para especies grandes, mientras que las pequeñas lo hacen entre los cuatro y cinco (Escalante-Minakata et al., 2012; García-Mendoza, 2007).

2.2 Especies empleadas en el mezcal

Los agaves se han empleado por el hombre durante siglos, entre sus usos destacan ser fuente de alimentos y bebidas, combustible, ornato, fibras, abono, y para uso medicinal (García-Mendoza, 2007) y ceremonial (Torres-García et al., 2019). Se conocen 210 especies, de las cuales México posee el 75 % y de éstas 119 son endémicas (García-Mendoza, 2016).

El Consejo Mexicano Regulador de la Calidad del Mezcal (2022) reportó siete especies principales empleadas para obtener mezcal, las cuales aportan el 96 % del volumen total producido; el 4 % es representado por 86 especies menores. Las siete especies importantes son: *Agave angustifolia* (88.11 %), *Agave durangensis* (2.26 %), *Agave salmiana* (1.90 %), *Agave cupreata* (1.29 %), *Agave potatorum* (1.20 %), *Agave tequilana* (0.89 %) y *Agave karwinskii* (0.39 %).

A. angustifolia destaca por presentar altos rendimientos (Sánchez Gómez et al., 2022) y tiene la distribución más amplia del género agave, lo que la convierte en la especie más relevante comparada con el resto; su cultivo abarca desde Sonora y Tamaulipas hasta Panamá (Castañeda-Nava et al., 2019; Trejo et al., 2018).

A. salmiana es un cultivo típico en zonas áridas de México, destinado principalmente para la producción de mezcal. *A. karwinskii* es un recurso local importante, que era considerado un agave de segunda categoría y únicamente se empleaba con otras especies para incrementar rendimiento, sin embargo, actualmente es una especie altamente demandada (Vázquez-Pérez et al., 2020).

Otras especies empleadas son *Agave inaequidens* (largo, lechuguilla, bruto), *Agave convallis* (jabalí), *Agave esperima jacobii* (maguey de cerro, bruto o cenizo), *Agave weberi cela* (maguey de mezcal), *Agave marmorata* (pitzometl, tepeztate), *Agave rhodacantha* (mexicano, cuishe) (Hernández-López, 2019).

2.3 Estados productores de mezcal

El mezcal es un producto con denominación de origen lo que permite la diferenciación de productos locales con características propias relativas a la

región, además aporta legitimidad, reconocimiento y prestigio (Moreno-Calles et al., 2021). La denominación de origen mezcal (Consejo Mexicano Regulador de la Calidad del Mezcal, 2022, 2020) incluye nueve estados de la República Mexicana (Figura 1).

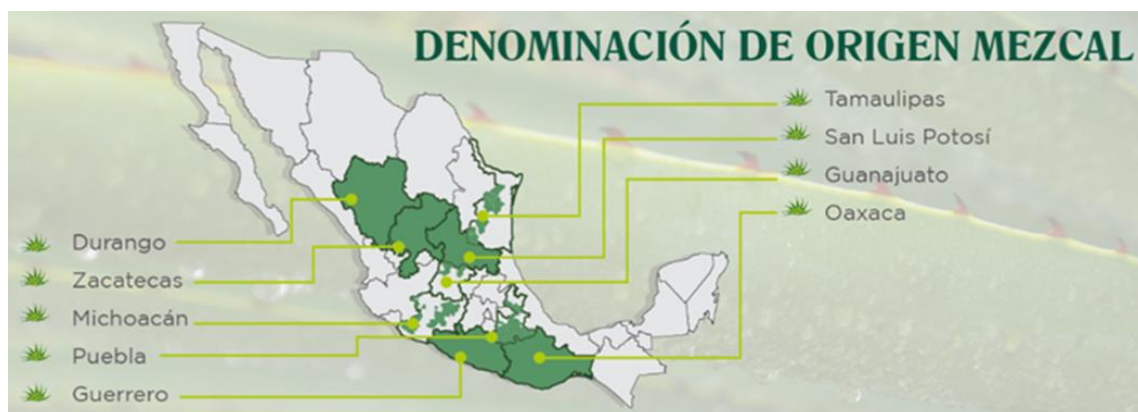


Figura 1. Estados mexicanos que cuentan con Denominación de Origen Mezcal.

Los tres estados con mayor volumen de producción en 2021 (Consejo Mexicano Regulador de la Calidad del Mezcal, 2022) fueron Oaxaca (85.40 %), Zacatecas (5.70 %) y Durango (2.70 %). Los porcentajes citados incluyen únicamente mezcal certificado, dejando fuera la industria informal, por lo que los valores podrían cambiar al tener los datos de productores no certificados (Antonio Bautista et al., 2017; Kirchmayr et al., 2017). La industria de Zacatecas está conformada por 22 micro-pequeñas y medianas empresas y sus principales especies mezcaleras son *A. tequilana* (agave azul) y *A. salmiana* spp. *crassispina* (agave verde) (López-Nava et al., 2012). En Durango se emplea *A. duranguensis* también conocido como cenizo (Barraza-Soto et al., 2014).

En Oaxaca, las regiones de Valles Centrales y Sierra Sur están comprendidas dentro de la Región del Mezcal, cuyos distritos abarca a Sola de Vega, Miahuatlán, Yautepec, Tlacolula, Ocotlán, Ejutla y Zimatlán, destacando Matatlán en Tlacolula, el cual es considerado la capital mundial del mezcal (Antonio Bautista et al., 2017). En Puebla, se emplean *A. potatorum*, *A. marmorata* y *A. angustifolia* (García-Mendoza, 2016; Moreno-Calles et al., 2021).

San Luis Potosí y Zacatecas comparten el empleo de *A. salmiana* spp. *crassispina* para elaboración de mezcal (García-Mendoza, 2016). En el estado potosino existen dos zonas reconocidas por su producción de mezcal: Centro y Altiplano, las cuales incluyen los municipios de San Luis Potosí, Charcas, Mexquitic de Carmona, Ahualulco y Moctezuma (Gobierno de México, 2019). *A. salmiana* no es cultivado en el Altiplano Mexicano, se trata de una especie silvestre colectada, por eso sus contenidos de azúcares fermentables pueden variar y en consecuencia afectar los rendimientos de etanol (Verdugo-Valdez et al., 2011).

La producción de mezcal en Tamaulipas se caracteriza por las especies *Agave americana* (sus tallos pesan de 30-50 kg y contienen de 20-27 °Bx), *Agave montium-sancticaroli* (sus tallos pesan de 20-40 kg y contienen de 25-30 °Bx), *Agave funkiana* y *Agave lophanta* (ambas sus tallos pesan de 3-8 kg y contienen de 28-35 °Bx) (Jacques-Hernández et al., 2007)

En Guerrero se emplea para el mezcal *A. angustifolia* y *A. potatorum* (Soto-García et al., 2009), en Michoacán *Agave cupreata* y *A. inaequidens*, este último se encuentra tanto en su hábitat silvestre como cultivado (Figueredo et al., 2014; Torres-García et al., 2019).

2.4 Proceso de elaboración de mezcal

El proceso de elaboración del mezcal, independientemente de la región de producción, incluye: el corte del agave, la cocción, molienda, fermentación y destilación. En función de cómo se lleven a cabo estas etapas, la NOM-070-SCFI-2016 establece tres categorías: mezcal, mezcal artesanal y mezcal ancestral (Antonio Bautista et al., 2017; Arellano-Plaza et al., 2022).

El carácter artesanal está ligado a la eficiencia de los procesos y lo ancestral está relacionado con el empleo de materiales y equipos rústicos con baja capacidad de procesamiento (Hernández-López, 2019; López-Nava et al., 2012). Lo ancestral se encuentra en la combinación del patrimonio material e inmaterial: en la forma de vida de determinados grupos humanos, en sus procesos adaptativos

evidenciados en las técnicas y herramientas peculiares (Hernández-López, 2018, 2019).

Por ejemplo, en Matatlán, correspondiente a la región de Valles Centrales en Oaxaca, la producción artesanal (Antonio Bautista et al., 2017) se caracteriza por:

Cocción de agave, para ello se construye un horno en la tierra de forma cónica, revestido de piedra volcánica, cuyo diámetro es de 4 m y la profundidad es de 3 m. El calentamiento del horno se realiza con leña hasta que las piedras se vuelven al rojo vivo. Entonces las piñas de agave se colocan al interior del horno, se cubren con petate de palma y tierra para evitar el escape de calor. Después de 72 h se realiza el vaciado del horno y los agaves cocidos son llevados al área de molienda.

Molienda, que consiste en la trituración de los agaves cocidos mediante un molino de forma circular con revestimiento de piedra de cantera, cuyo diámetro es 5 m y paredes de 60 cm de alto. En el centro, se acondiciona un eje horizontal, sobre el cual se coloca una piedra circular, también de cantera, con dimensiones de 2.5 m de diámetro, espesor de 1 m y un peso de 500 kg, la cual gira con el movimiento de animales de tracción.

Fermentación, que emplea tinajas de madera circulares cuyas dimensiones son 3 m de diámetro y altura de 1.6 m, las cuales se llenan al 75 % de su capacidad con las piñas cocidas trituradas y 25 % de agua, que proceda de preferencia de pozo. El periodo de la fermentación puede durar hasta 8 días, aunque en temporada de calor, el tiempo se reduce. Para homogeneizar el mosto, se remueve con un biello mínimo una vez durante la fermentación. En otras regiones, ejemplo Tamaulipas, el criterio empleado por el productor para dar fin a esta etapa consiste en observar cuando termina la generación de espuma (Jacques-Hernández et al., 2007).

Destilación, que se lleva a cabo con equipo de cobre, manufacturado en Ocotlán, Oaxaca, el cual consiste de una olla cuya capacidad es 360 kg, adaptado con

montera, turbante, serpentín y recipiente de 20 L para coleccionar el mezcal. La olla se entierra en el suelo, sobre una fuente continua de calor, se cubre con la montera, la cual conecta con el turbante y éste a su vez con el serpentín. Éste se sumerge en agua fría que está en constante recirculación para condensar los vapores y captarlos por goteo para después vaciarlos en barricas de madera.

Por otro lado, la producción de mezcal ancestral en Sola de Vega (Vera-Guzmán et al., 2018), perteneciente a la región de Sierra Sur, Oaxaca, se realiza como se menciona a continuación:

Cocción, en la cual los tallos se cuecen durante dos o tres días en hornos rústicos (cavidades hechas en la tierra y rellenas con piedras volcánicas). Durante esta etapa se podrían formar compuestos derivados del furano por reacciones de Maillard (Mancilla-Margalli & López, 2002) o por una posible sobrecocción del agave (Vera-Guzmán et al., 2010).

Molienda, consiste en someter el agave cocido a trituración de manera manual con el uso de mazos de madera.

Fermentación, se colocan los tallos de agave desintegrados en tinajas de madera para lograr la fermentación espontánea mediante la flora nativa presente. Para esto, se coloca una tonelada de agave molido y se deja macerar durante dos días. Posteriormente, se adicionan 850 L de agua, se mezcla y se deja fermentar por 30 h.

Destilación, en esta etapa, el fermento es doblemente destilado al calentarlo en ollas de barro, condensando el vapor y coleccionando el producto resultante. Después se ajusta el contenido alcohólico entre 45 a 50 % Alc. Vol. con la última fracción de la destilación (colas).

El mezcal obtenido de la destilación presenta tres partes, conocidas como a) fracción puntas o cabeza y se caracteriza por tener entre 70 y 85 % Alc. Vol.; b) fracción cuerpo que contienen entre 50 y 75 % Alc. Vol.; y c) fracción colas cuyo contenido alcohólico es menor a 50 % Alc. Vol. (Barraza-Soto et al., 2014),

Nolasco-Cancino (2022) encontraron respectivamente en las tres fracciones: hasta 77.71, 28.83 y 14.44 % Alc. Vol en muestras de mezcal oaxaqueño. En Tamaulipas, a la primera destilación se le nombra campañilla o flor y la segunda fracción se llama ordinario; el cual es sometido a segunda destilación y se obtiene el refinado. La mezcla del refinado y la flor da como resultado un mezcal de 53 a 60 % Alc. Vol (Jacques-Hernández et al., 2007).

En la destilación artesanal y ancestral, el contenido alcohólico se evalúa de manera empírica a través del *know-how* de cada productor. Por mencionar, el *venenciado*, que es una práctica tradicional ampliamente utilizada en Oaxaca, consiste en succionar el mezcal mediante un carrizo (Figura 2.A), retener la muestra al tapar el orificio superior con el dedo pulgar, dejarla caer a una altura de 20-40 cm sobre un recipiente local conocido como jícara (Figura 2.B), de tal manera que al caer se formen burbujas cuyo tamaño, cantidad y duración determinará los grados de alcohol de la bebida (López Rosas et al., 2020). En otras regiones, ejemplo Tamaulipas, esta prueba la realizan empleando un vaso de vidrio (Figura 2.C y 2.D), entonces, el productor coloca una muestra del destilado dentro del recipiente de vidrio, las burbujas deberán cubrir toda la superficie del vaso y mantenerse durante unos segundos para saber que el mezcal presenta el contenido alcohólico deseado (Jacques-Hernández et al., 2007).



Figura 2. Materiales empleados para evaluar el contenido alcohólico en la destilación artesanal y ancestral de mezcal en los estados de Oaxaca (A y B) y Tamaulipas (C y D), México.

El Consejo Mexicano Regulador de la Calidad del Mezcal (2022) reportó que el mezcal artesanal representa el 88.92 % del total nacional, el 10.49 % corresponde a categoría mezcal y únicamente el 0.59 % se trata del elaborado bajo proceso ancestral.

2.5 Compuestos volátiles del mezcal

La composición química del mezcal es compleja porque depende de factores como especie de agave, condiciones climáticas, condiciones de fermentación, tipos de microorganismos presentes y proceso de destilación empleado. La

composición química es relacionada con la presencia de compuestos volátiles que confieren el aroma y sabor al mezcal (Martínez et al., 2019).

La fermentación involucra la acción de diversas especies de levaduras y bacterias para la producción de compuestos que influirán sobre las propiedades sensoriales de la bebida (Varela, 2016). En este sentido, Vera-Guzmán et al. (2018) detectaron en mezcal de *A. angustifolia* y *A. potatorum* hexanol, octanol, decanol, alcohol fenetílico y hexadecanol; por otro lado, De León-Rodríguez et al. (2006) investigaron los compuestos volátiles en cinco mezcales provenientes de *A. salmiana* y reportaron etanol, metanol, n-propanol, 2-butanol, 2-metil-propanol y una mezcla de 2-metil-1-butanol y 3-metil-1-butanol. Adame-Soto et al. (2019), durante la fermentación asociaron el tipo de levadura con la formación de compuestos volátiles como el alcohol fenetílico, importante por su contribución al sabor dulce y a rosas presente en las bebidas alcohólicas como el mezcal.

El metanol en bebidas alcohólicas se produce en la etapa de cocción del agave a partir de la demetoxilación de las pectinas presentes en la materia prima por acción de las pectinmetilesterasas (Rodríguez-Madrera et al., 2006; Solís-García et al., 2017) y por la lignina presente en la pared celular de los agaves (Vera-Guzmán et al., 2010). Pinal et al. (2009) encontraron mayor concentración de metanol en las fermentaciones procedentes de *A. tequilana* Weber con 4 años de edad que en aquellas de 8 años, lo cual infiere que en agaves de mayor edad existen menos grupos metoxil de las pectinas para la producción de metanol.

Lachenmeier et al. (2006) reportaron en *A. tequilana* Weber contenidos de metanol de 304 y 308 mg/100 mL de alcohol, valores superiores a lo que indica la NOM-006-SCFI-2012, sin embargo, el estándar en Unión Europea es de máximo 1000 mg/100 mL de alcohol en bebidas alcohólicas a partir de frutas (Paine & Dayan, 2001). Aunque se sabe que los problemas por intoxicación con metanol se presentan con dosis mayores (20 ml de ingesta podría ocasionar la muerte del individuo) que los valores establecidos en la norma, la importancia de

su control se debe a que la presencia de este compuesto podría indicar adulteración de la bebida (González-Seguí et al., 2019).

Sin embargo, esto se contradice con el hecho que el contenido de metanol correlaciona con la cantidad de pectina presente en la materia prima, lo que origina que sea un marcador adecuado para trazar autenticidad en bebidas 100 % de agave, caso contrario se observa en bebidas adulteradas con azúcar de caña o alcohol de caña donde el contenido de metanol debería ser menor (Bauer-Christoph et al., 2003).

Algunas prácticas que podrían controlar el contenido de metanol en bebidas espirituosas derivadas de agave son: cocción de piñas de agave en autoclave con inyección de vapor, e inmediatamente después la liberación del vapor y enfriamiento de las piñas, y filtración del jarabe (Solís-García et al., 2017). Aunque en los procesos artesanales y ancestrales del mezcal es difícil implementar estas medidas por la tecnología con la que se cuenta y por la esencia de los procesos para no perder el típico sabor de esta bebida tradicional.

Por otro lado, la presencia de bacterias ácido-lácticas y ácido-acéticas, durante la fermentación, cobra importancia por la formación de ácidos orgánicos como el láctico y acético que posteriormente funcionarán como sustratos para la generación de ésteres (Kirchmayr et al., 2017). Sin embargo, las altas concentraciones de ácidos como el acético pueden ser debidas a una contaminación por bacterias ácido-acéticas y este compuesto podría ocasionar olores desagradables en la bebida (Vera-Guzmán et al., 2010). En *A. salmiana*, De León-Rodríguez et al. (2008) reportaron la presencia de ácido heptanoico.

Lo ésteres en bebidas alcohólicas son formados durante la fermentación por condensación de ácidos orgánicos y alcoholes (Pires et al., 2014) y se clasifican en: a) ésteres acetato, grupo en el que se encuentran el acetato de etilo, acetato de isoamilo, acetato de isobutilo y acetato fenetílico; b) el segundo grupo comprende los ésteres de etilo, que son ácidos grasos de cadena media en el que se incluyen el hexanoato de etilo y octanoato de etilo (Saerens et al., 2010).

Los ésteres de mayor importancia por su contribución aromática a las bebidas son acetato de etilo, acetato de isoamilo, acetato de isobutilo, acetato fenetílico, hexanoato de etilo y octanoato de etilo (Pires et al., 2014). Nolasco-Cancino et al. (2018) asociaron la producción de ésteres con la especie de levadura identificada durante la fermentación y observaron que la producción de acetato de etilo fue promovida por la fermentación de jugo de agave sin bagazo, contrario a la producción de lactato de etilo (el empleo de bagazo favoreció la formación de este compuesto).

La formación de compuestos furanos puede llevarse durante la cocción del agave (Quintero Arenas et al., 2020). Por ello, Mancilla-Margalli et al. (2002) evaluaron los compuestos formados por reacción de Maillard en el jugo de las piñas de *A. tequilana* Weber Var. Azul cocidas a las 4, 12, 20 y 28 h. El 5-hidroximetilfurfural y furfural se presentaron en el jugo de todas las etapas, el 2-furanmetanol se encontró en jugo obtenido a partir de las 12 h y el 5-metilfurfural a partir de las piñas obtenidas después de 28 h de cocción.

De León-Rodríguez et al. (2006) encontraron terpenos como α -terpineno y limoneno en mezcal proveniente de *A. salmiana*. Vera-Guzmán et al. (2018) reportaron la presencia de farnesol, linalol y α -terpinol tanto en mezcal de *A. angustifolia* como en *A. potatorum*. Botello-Álvarez et al. (2007) destaca que la composición del mezcal y su variabilidad es compleja y cada compuesto requiere estudios adicionales para elucidar su origen, verificar límites permitidos por normas oficiales y conocer el efecto en las características sensoriales del producto final. Para ello se deben emplear técnicas analíticas como las que se mencionan a continuación.

2.6 Métodos de identificación de compuestos

2.6.1 Espectroscopía de Resonancia magnética nuclear

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) es una técnica analítica efectiva, sensible y reproducible capaz de detectar metabolitos primarios y especiales (Aru et al., 2018). Puede ser implementada en productos líquidos y

sólidos sin alterar la muestra o producir residuos peligrosos (Marccone et al., 2013). Algunos alimentos en los que ha sido aplicada esta técnica son: queso Mozzarella (Mazzei & Piccolo, 2012), pulpa y jugo de naranja (Le Gall et al., 2001), mango (Gil et al., 2000), así como en vinagre balsámico de Modena (Papotti et al., 2015).

Brescia et al (2002) llevaron a cabo la caracterización química de vinos rojos italianos a través de espectroscopía ^1H -RMN y encontraron que los metales pesados y los aminoácidos podrían ser los responsables para la discriminación de las muestras. La ^1H -RMN también se ha usado para conocer la cantidad de polifenoles (Todasca et al., 2011), compuestos que determinan atributos sensoriales como color y sabor (Tzachristas et al., 2020).

Godelman et al. (2013) y Monakhova (2015) estudiaron vinos de Alemania bajo un enfoque de análisis dirigido y no dirigido con espectroscopía de ^1H -RMN para ser diferenciados por variedad de uva, origen geográfico y año de cosecha.

Mazzei et al. (2013) confirmaron que la espectroscopía de ^1H -RMN puede diferenciar entre vinos blancos “Fiano di Avellino” producidos con el mismo mosto de uva y mismas prácticas enológicas, pero diferentes cepas de levaduras empleadas durante la fermentación. Respecto a la fermentación, Del Fresno et al. (2020) también utilizaron ^1H -RMN para evaluar el impacto de *Hanseniospora vineae* en la fermentación y añejamiento de vino blanco.

Hu et al. (2015) emplearon espectroscopía de ^1H -RMN para estudiar vino de diferentes cultivares de uva y concluyeron que tiene la capacidad de discriminar aún entre cultivares cercanamente relacionados. Gougeon et al. (2018) realizaron el análisis de vinos de los cultivares Cabernet Sauvignon y Beihong de dos regiones de China (Shanxi y Ningxia) por medio de espectroscopía de ^1H -RMN e indicaron que la RMN es capaz de separar las muestras de vino por *terroir* y variedad dentro del mismo país.

Hu et al. (2020) estudiaron vinos tintos Merlot, Cabernet Sauvignon y Cabernet Gernischt por espectroscopía de ^1H -RMN y encontraron que el acetato de etilo, los ácidos láctico, succínico, málico y gálico, así como los aminoácidos alanina y prolina fueron los principales responsables para diferenciar entre las muestras.

2.6.2 Espectroscopía de infrarrojo

La espectroscopía de infrarrojo (IR) es una técnica analítica no destructiva, sensitiva, rápida, poderosa, amigable con el ambiente; se usa ampliamente para caracterización y clasificación de bebidas alcohólicas (Arslan et al., 2021; Yadav & Sharma, 2019). La espectroscopía IR puede funcionar como una alternativa a los métodos de análisis químicos tradicionales al monitorear en tiempo real del proceso varios compuestos simultáneamente (Di Egidio et al., 2010).

El principio de la espectroscopía MIR (infrarrojo medio) consiste en detectar diferencias composicionales entre muestras gracias a las vibraciones moleculares de diversos grupos químicos a determinadas longitudes de onda dentro de la región infrarroja media del espectro (Cozzolino et al., 2012).

La metodología MIR se ha empleado para predecir la composición de ácidos grasos en aceite vegetal (Kokalj Ladan & Kočevar Glavač, 2022), detectar adulteración en aceite de oliva extra virgen (Ordoudi et al., 2022), determinar los parámetros de calidad en cerveza (Iñón et al., 2006) y monitorear la producción de azúcares durante el macerado en el proceso de cerveza (de Almeida et al., 2018).

Bevin et al. (2008) usaron espectroscopía MIR y concluyeron que los espectros obtenidos fueron útiles para predecir el origen varietal de las muestras de vino, lo que permitió la discriminación entre tintos y blancos. Parpinello et al. (2019) emplearon espectros MIR para estudiar las relaciones entre la variedad de la uva y la composición del vino, específicamente, compuestos fenólicos.

Los avances en instrumentación espectroscópica infrarroja tal como la reflexión total atenuada (ATR) han vuelto atractiva la espectroscopía IR para el análisis

rápido de matrices complejas en diversos campos científicos (Culbert et al., 2015).

La espectroscopía ATR-MIR sirvió para la predicción de atributos sensoriales de vino Cabernet Sauvignon y Chardonnay con indicación geográfica (GI) procedentes del Sur de Australia (Niimi et al., 2021). También Cozzolino et al. (2011) emplearon espectroscopía ATR-MIR para analizar en vino tinto y blanco de Australia parámetros composicionales (glucosa, fructosa, pH, acidez volátil y titulable) ampliamente empleados en la industria vinícola. Durante la fermentación de vino blanco, Cavaglia et al. (2020) emplearon espectroscopía ATR-MIR como herramienta de monitoreo, lo que permitió detectar y corregir a tiempo problemas por contaminación con bacterias acidolácticas. Gambetta et al. (2019) demostraron el uso potencial de ATR-MIR para clasificar uvas Chardonnay con base a su origen geográfico y grados de calidad.

2.6.3 Cromatografía de gases

El análisis químico en bebidas alcohólicas es complicado debido a las altas concentraciones de etanol y agua, por ello se han usado técnicas de separación y concentración de compuestos volátiles; como extracción líquido-líquido, microextracción en fase sólida (SPME) y cromatografía de gases (GC) con espectrometría de masas (MS) (Martínez et al., 2019). La cromatografía separa los diferentes compuestos presentes en mezclas complejas y genera una huella representativa de la composición química de la molécula (Jacobson et al., 2013). En tanto que la técnica de SPME es un método de concentración simple, rápido y sin empleo de solventes (Cuadros-Rodríguez et al., 2016; Li et al., 2015).

Li et al. (2015) emplearon SPME-GC para analizar los compuestos volátiles responsables del sabor en cerveza, los compuestos referidos fueron ésteres, alcoholes y ácidos orgánicos. También en cerveza, Jiao et al. (2011) aplicaron cromatografía de gases acoplada a detector de ionización de flama mediante espacio de cabeza (HS-SPME-GC-FID) para asociar los compuestos volátiles al tipo de cerveza y a la cervecería. En vino, Springer et al. (2014) emplearon HS-SPME-GC-MS para verificar el origen botánico de 198 vinos blancos de Alemania

y encontraron que los terpenos y ésteres fueron los responsables de la clasificación botánica. Xiao et al. (2015) aplicaron HS-SPME-GC-MS para identificar y cuantificar compuestos volátiles en vinos cherry con el objetivo de asociarlos en función a su origen geográfico.

En mezcal, Vera-Guzmán et al. (2009) estudiaron su composición volátil por GC-FID y observaron que el metanol, etanol y ácido acético se formaron a partir de la cocción, por otro lado, el 2-metil-1-propanol y 3-metil-1-butanol se presentaron a partir de la fermentación. En otro estudio, Vera-Guzmán et al. (2010) emplearon SPME-GC-MS y atribuyeron la variación cuantitativa de los compuestos volátiles del mezcal al método de manufactura. Mientras que las similitudes entre compuestos, fue atribuida a la especie de agave empleada. También Vera-Guzmán et al. (2018) emplearon GC-MS para identificar compuestos volátiles en mezcal, previo a las rutinas de GC-MS usaron extracción líquido líquido para concentrar la muestra, de este modo encontraron 84 compuestos volátiles, de los cuales 10 fueron usados como diferenciadores entre especies de agave (*A. potatorum* y *A. angustifolia*), origen de las muestras (localización geográfica de la mezcalería) y estación del año (primavera, otoño e invierno).

De León-Rodríguez et al. (2006) aplicaron SPME-GC-MS para caracterizar los compuestos volátiles en mezcales de *A. salmiana* y encontraron que los compuestos identificados son similares a los reportados en tequila, aunque otros fueron considerados únicos, como limoneno y pentilbutanoato, lo que indica que estos compuestos referidos pueden ser usados como marcadores para diferenciar una bebida auténtica.

2.7 Literatura citada

- Adame-Soto, P. J., Aréchiga-Carvajal, E. T., López, M. G., González-Herrera, S. M., Moreno-Jiménez, M. R., Urtiz-Estrada, N., & Rutiaga-Quñones, O. M. (2019). Potential production of 2-phenylethanol and 2-phenylethylacetate by non-Saccharomyces yeasts from Agave durangensis. *Annals of Microbiology*, 69(9), 989–1000. <https://doi.org/10.1007/s13213-019-01489-0>
- Antonio Bautista, J., Orozco Cirilo, S., & Terán Melchor, E. (2017). La disminución

- de la producción artesanal de mezcal en la Región del mezcal de Oaxaca, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 6(6), 1291–1305. <https://doi.org/10.29312/remexca.v6i6.577>
- Arellano-Plaza, M., Paez-Lerma, J. B., Soto-Cruz, N. O., Kirchmayr, M. R., & Gschaedler Mathis, A. (2022). Mezcal Production in Mexico: Between Tradition and Commercial Exploitation. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 6. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2022.832532>
- Arslan, M., Tahir, H. E., Zareef, M., Shi, J., Rakha, A., Bilal, M., Xiaowei, H., Zhihua, L., & Xiaobo, Z. (2021). Recent trends in quality control, discrimination and authentication of alcoholic beverages using nondestructive instrumental techniques. *Trends in Food Science & Technology*, 107, 80–113. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.11.021>
- Aru, V., Sørensen, K., Khakimov, B., Toldam-Andersen, T., & Balling Engelsen, S. (2018). Cool-Climate Red Wines—Chemical Composition and Comparison of Two Protocols for ^1H -NMR Analysis. *Molecules*, 23(1), 160. <https://doi.org/10.3390/molecules23010160>
- Barraza-Soto, S., Domínguez-Calleros, P. A., Montiel-Antuna, E., Díaz-Vásquez, M., & Návar-Chaidez, J. (2014). La producción de mezcal en el municipio de Durango, México. *Sociedad, Cultura y Desarrollo Sustentable*, 10, 65–74.
- Bauer-Christoph, C., Christoph, N., Aguilar-Cisneros, B., López, M., Richling, E., Rossmann, A., & Schreier, P. (2003). Authentication of tequila by gas chromatography and stable isotope ratio analyses. *Eur Food Res Technol*, 217, 438–443. <https://doi.org/10.1007/s00217-003-0782-4>
- Bevin, C. J., Dambergs, R. G., Fergusson, A. J., & Cozzolino, D. (2008). Varietal discrimination of Australian wines by means of mid-infrared spectroscopy and multivariate analysis. *Analytica Chimica Acta*, 621(1), 19–23. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.10.042>
- Botello-Álvarez, J. E., Estrada-Baltazar, A., Jiménez-Islas, H., Rico-Martínez, R., Navarrete-Bolaños, J. L., Cárdenas-Manríquez, M., & Molina-Guerrero, J. A. (2007). Compuestos volátiles en el mezcal. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 6(1), 41–50. Retrieved from

<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=62060106>

- Brescia, M. ., Caldarola, V., De Giglio, A., Benedetti, D., Fanizzi, F., & Sacco, A. (2002). Characterization of the geographical origin of Italian red wines based on traditional and nuclear magnetic resonance spectrometric determinations. *Analytica Chimica Acta*, 458(1), 177–186. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)01532-X](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)01532-X)
- Castañeda-Nava, J. J., Rodríguez-Domínguez, J. M., Camacho-Ruiz, R. M., Gallardo-Valdez, J., Villegas-García, E., & Gutiérrez-Mora, A. (2019). Morphological comparison among populations of *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck (Asparagaceae), a species used for mezcal production in Mexico. *Flora*, 255, 18–23. <https://doi.org/10.1016/J.FLORA.2019.03.019>
- Cavaglia, J., Schorn-García, D., Giussani, B., Ferré, J., Busto, O., Aceña, L., Mestres, M., & Boqué, R. (2020). ATR-MIR spectroscopy and multivariate analysis in alcoholic fermentation monitoring and lactic acid bacteria spoilage detection. *Food Control*, 109, 106947. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106947>
- Consejo Mexicano Regulador de la Calidad del Mezcal. (2022). *Informe estadístico 2022*. Retrieved from <https://comercam-dom.org.mx/estadisticas/>
- Consejo Mexicano Regulador de la Calidad del Mezcal, A. C. (2020). Denominación de origen mezcal. Retrieved from http://www.crm.org.mx/Quienes_Somos.php
- Cozzolino, D., Cynkar, W., Shah, N., & Smith, P. (2011). Feasibility study on the use of attenuated total reflectance mid-infrared for analysis of compositional parameters in wine. *Food Research International*, 44(1), 181–186. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.10.043>
- Cozzolino, D., Cynkar, W., Shah, N., & Smith, P. (2012). Varietal Differentiation of Grape Juice Based on the Analysis of Near- and Mid-infrared Spectral Data. *Food Analytical Methods*, 5(3), 381–387. <https://doi.org/10.1007/s12161-011-9249-6>
- Cuadros-Rodríguez, L., Ruiz-Samblás, C., Valverde-Som, L., Pérez-Castaño, E., & González-Casado, A. (2016). Chromatographic fingerprinting: An

- innovative approach for food “identification” and food authentication – A tutorial. *Analytica Chimica Acta*, 909, 9–23. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.12.042>
- Culbert, J., Cozzolino, D., Ristic, R., & Wilkinson, K. (2015). Classification of Sparkling Wine Style and Quality by MIR Spectroscopy. *Molecules*, 20(5), 8341–8356. <https://doi.org/10.3390/molecules20058341>
- de Almeida, F. S., de Andrade Silva, C. A., Lima, S. M., Suarez, Y. R., & da Cunha Andrade, L. H. (2018). Use of Fourier transform infrared spectroscopy to monitor sugars in the beer mashing process. *Food Chemistry*, 263, 112–118. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.109>
- De León-Rodríguez, A., Escalante-Minakata, P., Jiménez-García, M. I., Ordoñez-Acevedo, L. G., Flores, J. L. F., & de la Rosa, A. P. B. (2008). Characterization of Volatile Compounds from Ethnic Agave Alcoholic Beverages by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Food Technology and Biotechnology*, 46, 448–455.
- De León-Rodríguez, A., González-Hernández, L., P. Barba de la Rosa, A., Escalante-Minakata, P., & G. López, M. (2006). Characterization of Volatile Compounds of Mezcal, an Ethnic Alcoholic Beverage Obtained from Agave salmiana. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(4), 1337–1341. <https://doi.org/10.1021/jf052154+>
- Del Fresno, J. M., Escott, C., Loira, I., Herbert-Pucheta, J. E., Schneider, R., Carrau, F., ... Morata, A. (2020). Impact of *Hanseniaspora Vineae* in Alcoholic Fermentation and Ageing on Lees of High-Quality White Wine. *Fermentation*, 6(3), 66. <https://doi.org/10.3390/fermentation6030066>
- Di Egidio, V., Sinelli, N., Giovanelli, G., Moles, A., & Casiraghi, E. (2010). NIR and MIR spectroscopy as rapid methods to monitor red wine fermentation. *European Food Research and Technology*, 230(6), 947–955. <https://doi.org/10.1007/s00217-010-1227-5>
- Durán, H. M., & Pulido, J. L. (2007). Análisis de la Molienda en el Proceso de Elaboración de Mezcal. *Información Tecnológica*, 18(1). <https://doi.org/10.4067/S0718-07642007000100008>

- Escalante-Minakata, P., Barba De La Rosa, A. P., Santos, L., & De León-Rodríguez, A. (2012). Aspectos Químicos y Moleculares del Proceso de Producción del Mezcal. *BioTecnología*, 16(1).
- Espejel-García, A., Barrera Rodríguez, A., Ramírez García, A. G., & Cuevas Reyes, V. (2019). Innovación en la cadena agroindustrial de mezcal en tres municipios en Oaxaca, México. *Revista Venezolana de Gerencia*. <https://doi.org/10.37960/revista.v24i2.31488>
- Figueredo, C. J., Casas, A., Colunga-GarcíaMarín, P., Nassar, J. M., & González-Rodríguez, A. (2014). Morphological variation, management and domestication of ‘maguey alto’ (*Agave inaequidens*) and ‘maguey manso’ (*A. hookeri*) in Michoacán, México. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 10(1), 66. <https://doi.org/10.1186/1746-4269-10-66>
- Gambetta, J. M., Cozzolino, D., Bastian, S. E. P., & Jeffery, D. W. (2019). Classification of Chardonnay Grapes According to Geographical Indication and Quality Grade Using Attenuated Total Reflectance Mid-infrared Spectroscopy. *Food Analytical Methods*, 12(1), 239–245. <https://doi.org/10.1007/s12161-018-1355-2>
- García-Mendoza, A. (2007). Los agaves de México. *Ciencias*.
- García-Mendoza, A. (2016). México, país de magueyes. Retrieved from México, país de magueyes
- Gil, A. M., Duarte, I. F., Delgadillo, I., Colquhoun, I. J., Casuscelli, F., Humpfer, E., & Spraul, M. (2000). Study of the Compositional Changes of Mango during Ripening by Use of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(5), 1524–1536. <https://doi.org/10.1021/jf9911287>
- Gobierno de México. (2019). Mezcales Potosinos. Retrieved from <https://www.gob.mx/agricultura/sanluispotosi/articulos/mezcales-potosinos?idiom=es>
- Godelmann, R., Fang, F., Humpfer, E., Schütz, B., Bansbach, M., Schäfer, H., & Spraul, M. (2013). Targeted and Nontargeted Wine Analysis by ¹H NMR Spectroscopy Combined with Multivariate Statistical Analysis. Differentiation

- of Important Parameters: Grape Variety, Geographical Origin, Year of Vintage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(23), 5610–5619. <https://doi.org/10.1021/jf400800d>
- González Seguí, H. O., Hernández López, J. D. J., & Hendrik Giersiepen, J. (2019). Metanol: tolerancias y exigencias en las normas para mezcal y bebidas de agave. *Revista RIVAR*, 7(19), 1–21. <https://doi.org/10.35588/rivar.v7i19.4246>
- Gougeon, L., Da Costa, G., Le Mao, I., Ma, W., Teissedre, P.-L., Guyon, F., & Richard, T. (2018). Wine Analysis and Authenticity Using 1H-NMR Metabolomics Data: Application to Chinese Wines. *Food Analytical Methods*, 11(12), 3425–3434. <https://doi.org/10.1007/s12161-018-1310-2>
- Hernández-López, J. J. (2018). El mezcal como patrimonio social: de indicaciones geográficas genéricas a denominaciones de origen regionales. *Em Questão*, 24(2), 404. <https://doi.org/10.19132/1808-5245242.404-433>
- Hernández-López, J. J. (2019). Mexican mezcals: The importance of their protection as social heritage. *Ilha Revista de Antropologia*, 20(2), 179–205. <https://doi.org/10.5007/2175-8034.2018v20n2p179>
- Hu, B., Gao, J., Xu, S., Zhu, J., Fan, X., & Zhou, X. (2020). Quality evaluation of different varieties of dry red wine based on nuclear magnetic resonance metabolomics. *Applied Biological Chemistry*, 63(1), 24. <https://doi.org/10.1186/s13765-020-00509-x>
- Hu, B., Yue, Y., Zhu, Y., Wen, W., Zhang, F., & Hardie, J. W. (2015). Proton Nuclear Magnetic Resonance-Spectroscopic Discrimination of Wines Reflects Genetic Homology of Several Different Grape (*V. vinifera* L.) Cultivars. *PLOS ONE*, 10(12), e0142840. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142840>
- Iñón, F. A., Garrigues, S., & de la Guardia, M. (2006). Combination of mid- and near-infrared spectroscopy for the determination of the quality properties of beers. *Analytica Chimica Acta*, 571(2), 167–174. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.04.070>
- Jacobson, D., Monforte, A. R., & Ferreira, A. C. S. (2013). Untangling the

- Chemistry of Port Wine Aging with the Use of GC-FID, Multivariate Statistics, and Network Reconstruction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(10), 2513–2521. <https://doi.org/10.1021/jf3046544>
- Jacques-Hernández, C., Herrera Pérez, O., & Ramírez De León, J. A. (2007). El maguey mezcalero y la agroindustria del mezcal en Tamaulipas. In *ResearchGate*. Retrieved from <https://www.researchgate.net/publication/236586645%0AEI>
- Jiao, J., Ding, N., Shi, T., Chai, X., Cong, P., & Zhu, Z. (2011). Study of Chromatographic Fingerprint of the Flavor in Beer by HS-SPME-GC. *Analytical Letters*, 44(4), 648–655. <https://doi.org/10.1080/00032711003783044>
- Kirchmayr, M. R., Segura-García, L. E., Lappe-Oliveras, P., Moreno-Terrazas, R., de la Rosa, M., & Gschaedler Mathis, A. (2017). Impact of environmental conditions and process modifications on microbial diversity, fermentation efficiency and chemical profile during the fermentation of Mezcal in Oaxaca. *LWT - Food Science and Technology*, 79, 160–169. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.12.052>
- Kokalj, L. M., & Kočevár, G. N. (2022). Statistical FT-IR Spectroscopy for the Characterization of 17 Vegetable Oils. *Molecules*, 27(10), 3190. <https://doi.org/10.3390/molecules27103190>
- Lachenmeier, D. W., Sohnius, E.-M., Attig, R., & López, M. G. (2006). Quantification of Selected Volatile Constituents and Anions in Mexican Agave Spirits (Tequila, Mezcal, Sotol, Bacanora). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(11), 3911–3915. <https://doi.org/10.1021/jf060094h>
- Le Gall, G., Puaud, M., & Colquhoun, I. J. (2001). Discrimination between Orange Juice and Pulp Wash by ¹H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy: Identification of Marker Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(2), 580–588. <https://doi.org/10.1021/jf001046e>
- Li, g, Liu, F., Kun-Farkas, G., & Kiss, Z. (2015). Quantitative Analysis of Flavor Volatiles in Beer Using Headspace Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography–Flame Ionization Detection (HS-SPME-GC-FID). *Journal*

- of the American Society of Brewing Chemists, 73(3), 261–265.
<https://doi.org/10.1094/ASBCJ-2015-0618-01>
- López-Nava, G., Martínez-Flores, J. L., Cavazos-Arroyo, J., & Moreno-Mayett, Y. (2012). La cadena de suministro del mezcal del estado de Zacatecas Situación actual y perspectivas de desarrollo. *Contaduría y Administración*, 59(2), 227–252.
- López Rosas, C., Espinoza-Ortega, A., & Amaya Corchuelo, S. (2020). El mezcal como activo patrimonial y el papel del consumidor en su preservación. *Patrimonio Cultural de Oaxaca: Investigaciones Recientes*. Retrieved from <http://hdl.handle.net/10498/24476>
- Mancilla-Margalli, N. A., & López, M. G. (2002). Generation of Maillard Compounds from Inulin during the Thermal Processing of *Agave tequilana* Weber Var. azul. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(4), 806–812. <https://doi.org/10.1021/jf0110295>
- Marcone, M. F., Wang, S., Albabish, W., Nie, S., Somnarain, D., & Hill, A. (2013). Diverse food-based applications of nuclear magnetic resonance (NMR) technology. *Food Research International*, 51(2), 729–747. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.12.046>
- Martínez, S., Nuñez-Guerrero, M., Gurrola-Reyes, J. N., Rutiaga-Quiñones, O. M., Paredes-Ortíz, A., Soto, O. N., Flores-Gallegos, A. C., & Rodríguez-Herrera, R. (2019). Mescal an Alcoholic Beverage From *Agave* spp. With Great Commercial Potential. In *Alcoholic Beverages* (pp. 113–140). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815269-0.00004-0>
- Mazzei, P., & Piccolo, A. (2012). 1H-HRMAS-NMR metabolomic to assess quality and traceability of mozzarella cheese from Campania buffalo milk. *Food Chemistry*, 132(3), 1620–1627. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.142>
- Mazzei, P., Spaccini, R., Francesca, N., Moschetti, G., & Piccolo, A. (2013). Metabolomic by ¹ H NMR Spectroscopy Differentiates “Fiano Di Avellino” White Wines Obtained with Different Yeast Strains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(45), 10816–10822.

<https://doi.org/10.1021/jf403567x>

- Monakhova, Y. B., Godelmann, R., Kuballa, T., Mushtakova, S. P., & Rutledge, D. N. (2015). Independent components analysis to increase efficiency of discriminant analysis methods (FDA and LDA): Application to NMR fingerprinting of wine. *Talanta*, *141*, 60–65. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.03.037>
- Moreno-Calles, A. I., María, A., Rosas, R., Angélica, Y., Bautista, R., Katchu, O. S., & Hernández, G. (2021). Agrosilviculturas en territorios semiáridos de Puebla, México. *Agrosilvicultoriedad Del México Semiárido*, *19*, 6–28. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/357064428_AGROSILVICULTURAS_EN_TERRITORIOS_SEMIARIDOS_DE_PUEBLA_MEXICO
- Niimi, J., Liland, K. H., Tomic, O., Jeffery, D. W., Bastian, S. E. P., & Boss, P. K. (2021). Prediction of wine sensory properties using mid-infrared spectra of Cabernet Sauvignon and Chardonnay grape berries and wines. *Food Chemistry*, *344*, 128634. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128634>
- Nolasco-Cancino, H., Jarquín-Martínez, D., Ruiz Terán, F., & Santiago-Urbina, J. (2022). Behavior of the volatile compounds regulated by the Mexican Official Standard NOM-070-SCFI-2016 during the distillation of artisanal Mezcal. *BioTecnia*, *24*(2). Retrieved from <https://biotecnia.unison.mx/index.php/biotecnia/article/view/1577>
- Nolasco-Cancino, H., Santiago-Urbina, J. A., Wachter, C., & Ruíz-Terán, F. (2018). Predominant Yeasts During Artisanal Mezcal Fermentation and Their Capacity to Ferment Maguey Juice. *Frontiers in Microbiology*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02900>
- NOM-006-SCFI-2012. Bebidas alcohólicas-Tequila-Especificaciones. Retrieved December 8, 2020, from http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.%0Aphp?codigo=5282165&fecha=13/12/2012
- NOM-070-SCFI-2016. Bebidas Alcohólicas-Mezcal-Especificaciones. Retrieved December 7, 2020, from

https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5472787&fecha=23/02/2017

- Ordoudi, S. A., Özdikicierler, O., & Tsimidou, M. Z. (2022). Detection of ternary mixtures of virgin olive oil with canola, hazelnut or safflower oils via non-targeted ATR-FTIR fingerprinting and chemometrics. *Food Control*, 142, 109240. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109240>
- Paine, A. J., & Dayan, A. D. (2001). Defining a tolerable concentration of methanol in alcoholic drinks. *Human & Experimental Toxicology*, 20(11), 563–568. <https://doi.org/10.1191/096032701718620864>
- Papotti, G., Bertelli, D., Graziosi, R., Maietti, A., Tedeschi, P., Marchetti, A., & Plessi, M. (2015). Traditional balsamic vinegar and balsamic vinegar of Modena analyzed by nuclear magnetic resonance spectroscopy coupled with multivariate data analysis. *LWT - Food Science and Technology*, 60(2), 1017–1024. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2014.10.042>
- Parpinello, G. P., Ricci, A., Arapitsas, P., Curioni, A., Moio, L., Riosegade, S., Ugliano, M., & Versari, A. (2019). Multivariate characterisation of Italian monovarietal red wines using MIR spectroscopy. *OENO One*, 53(4). <https://doi.org/10.20870/oenone.2019.53.4.2558>
- Pinal, L., Cornejo, E., Arellano, M., Herrera, E., Nuñez, L., Arrizon, J., & Gschaedler, A. (2009). Effect of Agave tequilana age, cultivation field location and yeast strain on tequila fermentation process. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 36(5), 655–661. <https://doi.org/10.1007/s10295-009-0534-y>
- Pires, E. J., Teixeira, J. A., Brányik, T., & Vicente, A. A. (2014). Yeast: the soul of beer's aroma—a review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(5), 1937–1949. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5470-0>
- Quintero-Arenas, M. A., Meza-Márquez, O. G., Velázquez-Hernández, J. L., Gallardo-Velázquez, T., & Osorio-Revilla, G. (2020). Quantification of adulterants in mezcal by means of FT-MIR and FT-NIR spectroscopy coupled to multivariate analysis. *CyTA - Journal of Food*, 18(1), 229–239. <https://doi.org/10.1080/19476337.2020.1740327>

- Rodríguez-Madrera, R., Suárez Valles, B., García Hevia, A., García Fernández, O., Fernández Tascón, N., & Mangas Alonso, J. J. (2006). Production and Composition of Cider Spirits Distilled in “Alquitara.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(26), 9992–9997. <https://doi.org/10.1021/jf062316h>
- Saerens, S. M. G., Delvaux, F. R., Verstrepen, K. J., & Thevelein, J. M. (2010). Production and biological function of volatile esters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Biotechnology*, 3(2), 165–177. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2009.00106.x>
- Sánchez-Gómez, J., Pardo Núñez, J., Cuevas Reyes, V., & Romero Romero, Y. (2022). Characteristics and socio-productive problems of women mezcal producers in Oaxaca, México. *Agro Productividad*. <https://doi.org/10.32854/agrop.v15i3.2134>
- Solís-García, A., Rivas-García, P., Bravo-Sánchez, M. G., Escamilla-Alvarado, C., Botello-Álvarez, J. E., & Rico-Martínez, R. (2017). Methanol production Kinetics during agave cooking for mezcal industry. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 16(3), 827–834. Retrieved from <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=62053304012>
- Soto-García, E., Rutiaga-Quñones, M., López-Miranda, J., Montoya-Ayón, L., & Soto-Cruz, O. (2009). Effect of fermentation temperature and must processing on process productivity and product quality in mescal fermentation. *Food Control*, 20(3), 307–309. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.04.006>
- Springer, A. E., Riedl, J., Esslinger, S., Roth, T., Glomb, M. A., & Fauhl-Hassek, C. (2014). Validated Modeling for German White Wine Varietal Authentication Based on Headspace Solid-Phase Microextraction Online Coupled with Gas Chromatography Mass Spectrometry Fingerprinting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(28), 6844–6851. <https://doi.org/10.1021/jf502042c>
- Todasca, M. C., Fotescu, L., Chira, N. A., & Deleanu, C. (2011). Composition changes in wines produced by different growing techniques examined through ¹H-NMR spectroscopy. *Revista de Chimie*, 62(2), 131–134.
- Torres-García, I., Rendón-Sandoval, F. J., Blancas, J., Casas, A., & Moreno-

- Calles, A. I. (2019). The genus *Agave* in agroforestry systems of Mexico. *Botanical Sciences*, 97(3), 263. <https://doi.org/10.17129/botsci.2202>
- Trejo, L., Limones, V., Peña, G., Scheinvar, E., Vargas-Ponce, O., Zizumbo-Villarreal, D., & Colunga-García, M. P. (2018). Genetic variation and relationships among agaves related to the production of Tequila and Mezcal in Jalisco. *Industrial Crops and Products*, 125, 140–149. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2018.08.072>
- Tzachristas, A., Pasvanka, K., Liouni, M., Calokerinos, A. C., Tataridis, P., & Proestos, C. (2020). Effect of *Hippophae rhamnoides* L. Leaves Treatment on the Antioxidant Capacity, Total Phenol Content and Sensory Profile of Moschofilero Wines Vinified with and without Added Sulphites. *Applied Sciences*, 10(10), 3444. <https://doi.org/10.3390/app10103444>
- UNAM. (2018). No Title. Retrieved from https://www.dgcs.unam.mx/boletin/bdboletin/2018_045.html
- Varela, C. (2016). The impact of non-Saccharomyces yeasts in the production of alcoholic beverages. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100, 9861–9874. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7941-6>
- Vázquez-Pérez, N., Blancas, J., Torres-García, I., García-Mendoza, A., Casas, A., Moreno-Calles, A. I., Maldonado-Almanza, B., & Rendón-Aguilar, B. (2020). Conocimiento y manejo tradicional de *Agave karwinskii* en el sur de México. *Botanical Sciences*, 98(2), 328–347. <https://doi.org/10.17129/botsci.2421>
- Vera-Guzmán, A., Guzmán-Gerónimo, R., & López, M. (2010). Major and Minor Compounds in a Mexican Spirit, Young Mezcal Coming from Two Agave Species. In *Czech J. Food Sci* (Vol. 28).
- Vera-Guzmán, A., Guzmán-Gerónimo, R., López, M., & Chávez-Servia, J. (2018). Volatile Compound Profiles in Mezcal Spirits as Influenced by Agave Species and Production Processes. *Beverages*, 4(1), 9. <https://doi.org/10.3390/beverages4010009>
- Vera-Guzmán, A., Santiago-García, P., & López, M. (2009). Compuestos volátiles aromáticos generados durante la elaboración de Mezcal de Agave

- angustifolia Y Agave potatorum. In *Artículo Científico Rev. Fitotec. Mex* (Vol. 32).
- Verdugo-Valdez, A., Segura-Garcia, L., Kirchmayr, M., Ramírez-Rodríguez, P., González-Esquinca, A., Coria, R., & Gschaedler-Mathis, A. (2011). Yeast communities associated with artisanal mezcal fermentations from Agave salmiana. *Antonie van Leeuwenhoek*, 100(4), 497–506. <https://doi.org/10.1007/s10482-011-9605-y>
- Xiao, Z., Zhou, X., Niu, Y., Yu, D., Zhu, J., & Zhu, G. (2015). Optimization and application of headspace-solid-phase micro-extraction coupled with gas chromatography–mass spectrometry for the determination of volatile compounds in cherry wines. *Journal of Chromatography B*, 978–979, 122–130. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.12.006>
- Yadav, P. K., & Sharma, R. M. (2019). Classification of illicit liquors based on their geographic origin using Attenuated total reflectance (ATR) – Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy and chemometrics. *Forensic Science International*, 295, e1–e5. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2018.12.017>

3. PERFILES METABOLÓMICOS DE MEZCALES ARTESANALES Y ANCESTRALES BASADOS EN RMN Y MSA PARA DISCRIMINAR ORÍGENES GEOGRÁFICOS, ESPECIES DE AGAVE Y PROCESOS DE MANUFACTURA, EN FUNCIÓN DE SUS ATRIBUTOS DE CALIDAD

Resumen

La industria enológica se ha beneficiado del uso de espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protón (^1H -NMR) en combinación con análisis estadístico multivariado (MSA) como herramienta foodómica para obtener características discriminantes relacionadas a orígenes geográficos, variedades de uvas, y otros controles de calidad. Estos métodos ómicos han adquirido tal importancia para que Organizaciones Intergubernamentales y Agencias de Control recomienden su uso masivo entre países como cumplimiento de calidad para el seguimiento de parámetros estándares y de degradación, productos de fermentación, contenido de polifenoles y aminoácidos, orígenes geográficos, denominación de origen controlada y tipo de cepa monovarietal en vinos. Este estudio presenta, por primera vez, un perfil de ^1H -NMR / MSA para discriminar, por primera vez, entre regiones, especies de agave y procesos de manufactura en mezcales ancestrales y artesanales mexicanos con análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales ortogonales (OPLS-DA). El propósito central de este estudio fue extrapolar el saber hacer de la ómica del vino a la industria no profesionalizada del mezcal que a su vez permitió establecer la metodología experimental de ^1H -NMR, preprocesamiento, y análisis estadístico para implementar controles de calidad novedosos, no invasivos y altamente reproducibles ligados a la región de origen, a la especie de agave y proceso de manufactura.

Palabras clave: mezcales ancestrales y artesanales; resonancia magnética nuclear de protón; análisis discriminante supervisado de mínimos cuadrados parciales ortogonales.

METABOLOMIC PROFILES OF ARTISANAL AND ANCESTRAL MEZCALES BASED ON NMR AND MSA TO DISCRIMINATE GEOGRAPHICAL ORIGINS, AGAVE SPECIES AND MANUFACTURING PROCESSES, ACCORDING TO THEIR QUALITY ATTRIBUTES

Abstract

The oenological industry has benefited from the use of proton nuclear magnetic resonance (^1H -NMR) spectroscopy in combination with Multivariate Statistical Analysis (MSA) as a foodomics tool for retrieving discriminant features related to geographical origins, grape varieties, and further quality controls. Said omics methods have gained such attention that Intergovernmental Organizations and Control Agencies are currently recommending their massive use amongst countries as quality compliances for tracking standard and degradation parameters, fermentation products, polyphenols, amino acids, geographical origins, appellations d'origine contrôlée and type of monovarietal strains in wines. This study presents, for the first time, a ^1H -NMR / MSA profiling of ancestral and artisanal Mexican mezcals to discriminate between regions, agave species and manufacturing processes with supervised orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA). The central aim of this was to extrapolate the know-how of wine-omics into the non-professionalized mezcal industry for establishing the NMR acquisition, preprocessing and statistical analysis basis to implement novel, non-invasive and highly reproducible regional, agave species and manufacturing-quality controls.

Key words: ancestral and artisanal mezcals; proton nuclear magnetic resonance; supervised orthogonal partial least squares discriminant analysis.

Doctoral Thesis in Ciencias Agroalimentarias, Universidad Autónoma Chapingo.
Author: M.C. Rosa López Aguilar
Advisor: Arturo Hernández Montes, PhD.

3.1 Introducción

Los métodos analíticos robustos para determinar atributos de calidad, identidad y autenticidad en alimentos permanecen como una tarea prioritaria dentro de la cadena de abasto para preservar la protección del consumidor. Cada matriz alimentaria posee metabolitos intrínsecos relacionados a su manufactura tales como los ácidos shiquímico o caftárico en vinos (Godelmann et al., 2013) o residuos de furfural en bebidas espirituosas (Palmqvist & Hahn-Hägerdal, 2000; Sárvári Horváth et al., 2003). El conjunto de metabolitos primarios y especiales antes referidos, que son intrínsecos a la conformación de cada matriz alimentaria y a su manufactura, bajo condiciones y lugares específicos, puede ser identificada y direccionada con el uso de tecnología ómica por multimuestreo tales como técnicas espectroscópicas, con el fin de obtener discriminantes observables relacionados a su origen geográfico, variedad, proceso de manufactura y autenticidad, entre otros (Deborde et al., 2017; Esslinger et al., 2014).

La combinación de espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protón ($^1\text{H-NMR}$) altamente reproducible, no invasiva, de uso rápido y simple con análisis estadístico multivariable para metabolómica de alimentos (Foodómica) (Hatzakis, 2019) ha emergido en las últimas décadas con la implementación de modelos para trazar la calidad, origen, manufactura o autenticidad de alimentos.

La metabolómica de $^1\text{H-NMR}$ ha sido implementada en matrices de alimentos para: trazar la autenticidad y adulteración en mieles acacia por medio de su perfil de azúcares (Schievano et al., 2020), discriminar entre jugos de naranja como herramienta de control de las prácticas de adulteración (Le Gall et al., 2001), caracterizar los cambios composicionales en jugo de mango cultivar “Tommy Atkins” como control de su calidad poscosecha (Gil et al., 2000), evaluar vinagre tradicional balsámico de Modena de acuerdo a su proceso de añejamiento (Papotti et al., 2015) y determinar algunos compuestos clave que definen la originalidad del queso Emmental Suizo ligado a discriminación por origen geográfico (Corsaro et al., 2016; Shintu & Caldarelli, 2006).

El análisis de bebidas alcohólicas con metabolómica de ^1H -NMR y análisis estadístico multivariado ha tenido lugar en la última década. Godelmann et al. (2013) aplicaron las bases de multipresaturación de agua y etanol durante tiempos de mezclado e intervalos de recuperación con experimentos 1D-NOESY (Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy) en alrededor de 600 vinos alemanes, para obtener una matriz de datos que permitiera clasificar la variedad de uva, origen geográfico y añejamiento de cinco regiones productoras de Alemania del Sur (Rheinpfalz, Rheinhessen, Mosel, Baden, and Württemberg) con análisis de componentes principales, análisis discriminante lineal y análisis multivariante de varianza. Monakhova et al. (2015) encontraron mejoras notables al generar características discriminantes dentro de la matriz de datos de NMR en muestras de vino alemán con análisis de componentes independientes combinado con análisis discriminante lineal. Mazzei et al. (2013) evaluaron el perfil de ^1H -NMR, mediante el uso de un filtro de relajación- T_1 para la supresión del etanol en vez de la multisupresión de agua y etanol, combinado con análisis de componentes principales, análisis discriminante lineal y análisis de conglomerados jerárquicos para discriminar entre vinos “Fiano di Avellino” producidos con la misma variedad de uva, pero fermentados con dos tipos de levadura (autóctona y comercial). La metabolómica dirigida por ^1H -NMR se usó para discriminar entre regiones vinícolas chinas (Gougeon et al., 2018) y en vino tinto de variedades Cabernet Sauvignon, Merlot y Cabernet Gernischt (Hu et al., 2020), así como diferentes vinos blancos Chardonnay tratados con diferentes levaduras inactivas antes del añejamiento (Hu et al., 2019). Características discriminantes en vino tinto fueron proporcionadas por acetato de etilo, ácido láctico, alanina, ácido succínico, prolina, ácido málico, ácido gálico, y en vino blanco por 2,3-butanodiol, acetato de etio, ácido málico, valina, ácido succínico, ácido láctico, ácido tartárico, glicerol, ácido gálico, colina, prolina y alanina. Además, las mejoras enológicas específicas como el uso de cepas de levadura de *Hanseniospora vineae* para alcanzar los perfiles aromáticos en vino blanco español “Albillo”, con respecto a fermentaciones estándares, fue evaluada tanto

con metabolómica dirigida por cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID) y con ^1H -NMR (Del Fresno et al., 2020).

También se han reportado diversas mejoras para otras bebidas comerciales como cerveza (Duarte et al., 2002; Rodrigues & Gil, 2011) o whisky (Kew et al., 2017, 2019). En contraste, pocos reportes existen que contemplen el uso de metabolómica por NMR acoplada al análisis multivariado para el perfilamiento y direccionamiento de bebidas alcohólicas de agave de América Latina Central y Norte como el tequila y mezcal.

En lo que a mezcal se refiere, su manufactura involucra cosecha, cocción, molienda, fermentación y doble destilación del mosto fermentado (Escalante-Minakata et al., 2008; Kirchmayr et al., 2017; Nolasco-Cancino et al., 2018; Villanueva-Rodriguez & Escalona-Buendia, 2012), en concordancia con su etimología náhuatl: *Metlīxcalli* que significa agaves cocidos en horno. Los mezcales certificados son clasificados por la Normatividad Mexicana en tres categorías: mezcal, mezcal ancestral y mezcal artesanal, de acuerdo con su proceso de elaboración, específicamente, la cocción del agave, molienda, fermentación y destilación (Castañeda-Nava et al., 2019; NOM-070-SCFI-2016). El mezcal ancestral es definido como la bebida elaborada, exclusivamente por cocción del agave en hornos de pozo, molienda con mazo o molino chileno, fermentación en recipientes de madera o barro y la destilación con fuego directo en olla de barro y montera de barro o madera. El uso de acero inoxidable y energía eléctrica no está permitido en la producción ancestral. En tanto que, para el mezcal artesanal se pueden usar trituradores mecánicos para la molienda y alambiques de cobre o contenedores de acero inoxidable para la destilación. El uso de autoclaves para la cocción, difusores para extraer el jugo del agave cocido y destilador continuo para la destilación está prohibido en la producción artesanal. La denominación de origen controlada o appellation d'origine contrôlée (AOC) para los mezcales es otorgada a regiones específicas en los estados de Oaxaca, San Luis Potosí, Puebla, Guerrero, Guanajuato, Durango, Tamaulipas, Zacatecas y Michoacán. En su mayoría, los mezcales de estas regiones son

producidos bajo prácticas artesanales (Chavez-Parga et al., 2016). Los mezcales denominados 100% no tendrán otra fuente de azúcares durante la fermentación más allá que la proporcionada por el agave.

A pesar de la herencia humana intrínseca que implica la fusión entre fermentaciones prehispánicas con procesos de destilación europeas que derivó en mezcales ancestrales y artesanales (UNESCO, 2020), no sorprende que los procesos carezcan de estandarizaciones que puedan garantizar la calidad y reproducibilidad entre lotes (Kirchmayr et al., 2017). El mezcal es regulado por la Norma Oficial Mexicana NOM-070-SCFI-2016 en la que se establecen los atributos de calidad requeridos para dar cumplimiento: i) alcohol volumen (% Alc. Vol.) a 20 °C (NMX-V-013-NORMEX-2019), ii) contenido de alcoholes superiores (NMX-V-014-1986), iii) contenido de metanol (NMX-V-021-1986) y iv) contenido de extracto seco y cenizas (NMX-V-017-S-2014). Los controles técnicos referidos son adaptados al proceso tradicional del mezcal y no son tan estrictos como los requisitos establecidos para una bebida similar como el tequila (NOM-006-SCFI-2012), revelando, en este sentido, la necesidad de encontrar estrategias para proporcionar la estandarización del proceso artesanal y ancestral de elaboración del mezcal.

Como se ha podido ver, la información espectroscópica por NMR en bebidas destiladas es limitada y en México los estudios de resonancia aún son incipientes, por ello el presente trabajo usa espectroscopía de ^1H -NMR acoplada a análisis estadístico multivariado (NMR-MSA) aplicado por primera vez en una serie de mezcales artesanales y ancestrales de tres diferentes regiones y producidos con los tipos de agaves más representativos de México. Este estudio propone la aplicación de la rutina de trabajo de NMR-MSA en el mezcal como una forma cualitativa de obtener huellas metabolómicas relacionadas a su origen geográfico, especie de agave y proceso de manufactura entre lotes individuales. Finalmente, se revelan las diferencias en el procedimiento de estandarización entre los mezcales gracias a las características estadísticas y espectroscópicas del análisis realizado. El objetivo de este trabajo fue establecer la metodología

experimental por resonancia magnética nuclear para la obtención de perfiles metabolómicos estadísticamente aceptables, asociados a la distinción por origen geográfico, especies de agave y proceso de manufactura en mezcal.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Muestras de mezcal

El conjunto de muestras de mezcal comprendió 26 unidades pertenecientes a las categorías artesanal y ancestral de tres diferentes estados de México: Puebla, San Luis Potosí y Oaxaca. Las especies de agave utilizadas para la fabricación de las bebidas alcohólicas fueron *Agave angustifolia*, *Agave potatorum*, *Agave salmiana*, *Agave cupreata*, *Agave americana* 'Americana', *Agave americana* 'Oaxacensis'. Un resumen de las especies de agave empleadas, la región con su nomenclatura y la categoría del mezcal se muestran en el Cuadro 1.

3.2.2 Adquisición ^1H -NMR

La espectroscopía en estado líquido se llevó a cabo en un Espectrómetro Bruker Avance IIIHD de 600 MHz (Bruker Biospin, Rheinstetten, Germany) con un cabezal de prueba $^1\text{H}/\text{D}$ BBO y un gradiente z. La muestra de mezcal se preparó como se indica a continuación: a 540 μl de mezcal se le agregó 60 μl de solución de óxido de deuterio 99.9 % D, que, a su vez, contenía 0.05 % p/p de sal sódica de ácido 2,2,3,3-d(4)-3-(trimetilsilil) propionato de sodio (No. CAS 7789-20-0) como referencia interna y 0.1 % p/p de buffer fosfato de monopotasio (KH_2PO_4) (No. CAS 7778-70-0), finalmente se ajustó el pH a 3.1 (Godelmann et al., 2013; Herbert-Pucheta, Mejía-Fonseca, et al., 2019).

Cuadro 1. Conjunto de muestras de mezcal utilizados para el perfilamiento por ¹H-NMR/MSA arreglados por especie de agave, región y categoría del mezcal.

Código	Especie	Municipio ^x	Región	Proceso
1	<i>Agave potatorum</i>	TM	Oaxaca	Artesanal
2	<i>Agave angustifolia</i>	TM	Oaxaca	Artesanal
3	<i>Agave angustifolia</i>	SJT	Oaxaca	Artesanal
4	<i>Agave angustifolia</i>	TV	Oaxaca	Artesanal
5	<i>Agave potatorum</i>	TV	Oaxaca	Artesanal
6	<i>Agave angustifolia</i>	VSV	Oaxaca	Ancestral
7	<i>Agave potatorum</i>	VSV	Oaxaca	Ancestral
8	<i>Agave angustifolia</i>	VSV	Oaxaca	Ancestral
9	<i>Agave potatorum</i>	VSV	Oaxaca	Ancestral
10	<i>Agave potatorum</i>	VSV	Oaxaca	Ancestral
11	<i>Agave angustifolia</i>	VSV	Oaxaca	Ancestral
12	<i>Agave angustifolia</i>	VSV	Oaxaca	Ancestral
13	<i>Agave cupreata</i>	SFS	Oaxaca	Ancestral
14	Ensamble No. 1 ^z	SFS	Oaxaca	Ancestral
15	<i>Agave angustifolia</i>	VSV	Oaxaca	Ancestral
16	<i>Agave potatorum</i>	VSV	Oaxaca	Ancestral
17	Ensamble No. 2 ^y	VSV	Oaxaca	Ancestral
18	<i>Agave angustifolia</i>	ZA	Oaxaca	Artesanal
19	<i>Agave angustifolia</i>	ZA	Oaxaca	Artesanal
20	<i>Agave potatorum</i>	SAA	Oaxaca	Artesanal
21	<i>Agave potatorum</i>	SBC	Oaxaca	Artesanal
22	<i>Agave angustifolia</i>	SM	Oaxaca	Artesanal
23	<i>Agave potatorum</i>	CA	Puebla	Artesanal
24	<i>Agave angustifolia</i>	AT	Puebla	Artesanal
25	<i>Agave salmiana</i>	AH	San Luis Potosí	Artesanal
26	<i>Agave salmiana</i>	MC	San Luis Potosí	Artesanal

^z **Ensamble No. 1:** Mezcla de *Agave potatorum*, *Agave angustifolia* y *Agave cupreata*.

^y **Ensamble No. 2:** Mezcla de *Agave americana* ‘Americana’ y *Agave americana* ‘Oaxacensis’.

^x **TM:** Tlacolula de Matamoros (16°59'10"N, 96°30'47"W), **SJT:** San Jerónimo Tlacoahuaya (17°00'45"N, 96°33'08"W), **TV:** Teotitlán del Valle (17°01'13"N, 96°34'43"W), **VSV:** Villa Sola de Vega (16°29'30"N, 96°58'34"W), **SFS:** San Francisco Sola (16°29'48" N, 96°57'26"W), **ZA:** Zimatlán de Álvarez (16°52'16"N, 96°46'42"W), **SAA:** San Agustín Amatengo (16°30'36" N, 96°47'19" W), **SBC:** San Baltazar Chichicapam (16°45'43"N, 96°29'23"W), **SM:** Santiago Matatlán (16°51'60"N, 96°22'58"W), **CA:** Caltepec (18°10'53"N, 97°28'47"W), **AT:** Atlixco (19°1'25"N, 98°14'29"W), **AH:** Ahualulco (22°24'1"N, 101°10'0"W), **MC:** Mezquitic de Carmona (22°16'0"N, 101°6'47"W).

Los experimentos para la adquisición de los espectros de protón de las muestras de mezcal consistieron de:

a) Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón en una dimensión (1D ^1H -NMR) por excitación directa, necesarios para eliminar multipresaturaciones de agua y etanol (Herbert-Pucheta, Padilla-Maya, et al., 2019; López-Morales et al., 2019; Vázquez-Leyva et al., 2019) fueron obtenidos mediante un experimento con 64 scans, que a su vez fueron colectados con 28k puntos, la amplitud espectral fue de 20 ppm (12019 Hz), el tiempo de recuperación entre transientes fue de 6 s y el tiempo de adquisición de 1.2 s. El tiempo experimental fue de 6 minutos por espectro. No se aplicó función de apodización durante la transformada de Fourier.

b) Los ensayos NOESY (Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy) por 1D- ^1H -NMR fueron ejecutados con un experimento de multipresaturación simultánea de agua y etanol, irradiando (con una potencia de 1.18×10^{-3} W) la señal del agua (H_2O) a 4.7 ppm, la señal CH_2 del etanol a 3.51 ppm y la señal CH_3 del etanol a 1.05 ppm. Los experimentos NOESY fueron ejecutados con 128 scans, que a su vez fueron colectados con 28k puntos, la amplitud espectral fue de 20 ppm (12,019 Hz), el tiempo de recuperación entre transientes fue de 10 s, tiempos de mezclado de 100 milisegundos y el tiempo de adquisición de 1.2 s. El tiempo experimental fue de 16 min.

3.2.3 Post-procesamiento ^1H -NMR y análisis estadístico multivariado (MSA)

El postprocesamiento para la obtención de variables de entrada para el MSA fue realizado como se menciona a continuación: la corrección de fase manual y calibración de desplazamiento químico fue realizada con el software TopSpin® versión 4.0.8. Las correcciones de línea base intermedia y global, los alineamientos de ^1H -NMR por cuadrados mínimos, la selección de las regiones espectrales de frecuencia variable para perfilamiento no dirigido y la normalización de la matriz de datos fueron ejecutadas con el software NMRProcFlow versión 1.4 (Jacob et al., 2017).

El análisis estadístico consistió de análisis supervisados como el análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales ortogonales (OPLS-DA) y no supervisados como el análisis de componentes principales (PCA); y fueron desarrollados en la plataforma BioStatFlow versión 2.9.2. El intervalo de confianza al 95 % fue denotado por regiones Hotelling T2 representadas por elipses (Holmes et al., 2008). El análisis OPLS-DA fue realizado con validación cruzada de MonteCarlo (MCCV) con 10 particiones por 100 permutaciones (Xu & Liang, 2001). Los parámetros estadísticos como valores de p, R^2X y Q^2 definieron la calidad de cada modelo (De Meyer et al., 2008).

3.3 Resultados y discusión

Los espectros de ^1H -NMR para el mezcal proveniente de *Agave angustifolia*, *Agave potatorum*, *Agave salmiana*, *Agave cupreata* y sus mezclas (Figura 3) fueron obtenidos mediante la aplicación de un experimento NOESY bajo un esquema de multipresaturación de agua y etanol (Figura 4), la potencia de los pulsos fue de 1.18×10^{-3} W. La frecuencia del transmisor se centró en 4.83 ppm para la señal del agua; para etanol el CH_2 en 3.51 ppm y el CH_3 en 1.14 ppm, ésto fue con el objetivo de obtener multipresaturaciones precisas de todas las señales (Herbert-Pucheta, Mejía-Fonseca, et al., 2019).

La región de la Figura 3A comprende el rango de frecuencia de los desplazamientos del ^1H entre 6 y 10 ppm correspondiente a los compuestos aromáticos mientras que en la región de la Figura 3B los desplazamientos químicos de ^1H NMR son de 0.5 a 4.5 ppm y se debe a los compuestos alifáticos. Las regiones sombreadas en color gris representan las frecuencias seleccionadas para obtener matrices de datos que posteriormente fueron sometidas al análisis estadístico multivariado. La obtención de las regiones fue mediante el algoritmo de selección variable frecuencial inteligente (plataforma NMRProcFlow) que comprendió los desplazamientos de $10 \text{ ppm} \leq \omega \text{ } ^1\text{H} \leq 5.5 \text{ ppm}$ para compuestos aromáticos y de $4.5 \text{ ppm} \leq \omega \text{ } ^1\text{H} \leq 0.5 \text{ ppm}$ para los alifáticos.

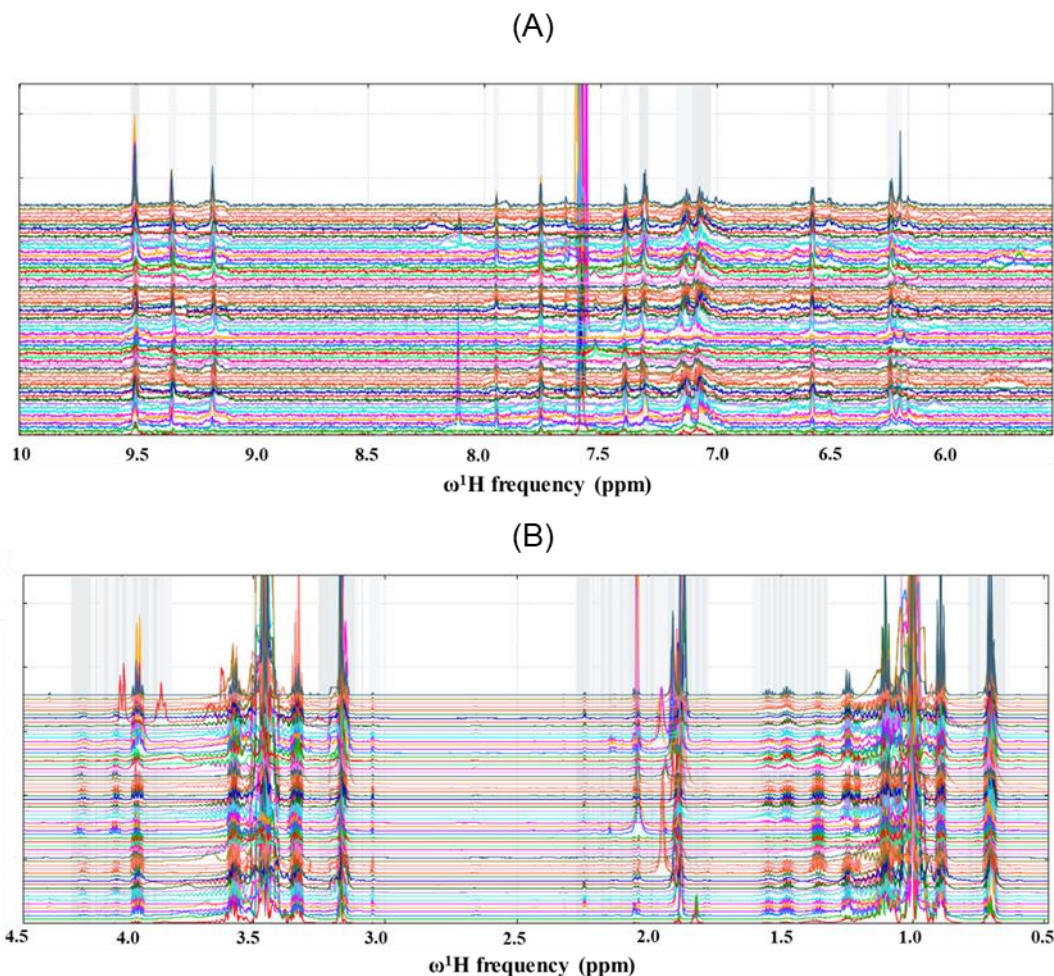


Figura 3. Espectro {1Hwater_presat NMR} de muestras de mezcal de *A. angustifolia*, *A. potatorum*, *A. salmiana*, *A. cupreata* y sus mezclas.

La región de la Figura 3A comprende el rango de frecuencia de los desplazamientos del ^1H entre 6 y 10 ppm correspondiente a los compuestos aromáticos mientras que en la región de la Figura 3B los desplazamientos químicos de ^1H -NMR son de 0.5 a 4.5 ppm y se debe a los compuestos alifáticos. Las regiones sombreadas en color gris representan las frecuencias seleccionadas para obtener matrices de datos que posteriormente fueron sometidas al análisis estadístico multivariado. La obtención de las regiones fue mediante el algoritmo de selección variable frecuencial inteligente (plataforma NMRProcFlow) que comprendió los desplazamientos de $10 \text{ ppm} \leq \omega \text{ } ^1\text{H} \leq 5.5 \text{ ppm}$ para compuestos aromáticos y de $4.5 \text{ ppm} \leq \omega \text{ } ^1\text{H} \leq 0.5 \text{ ppm}$ para los alifáticos.

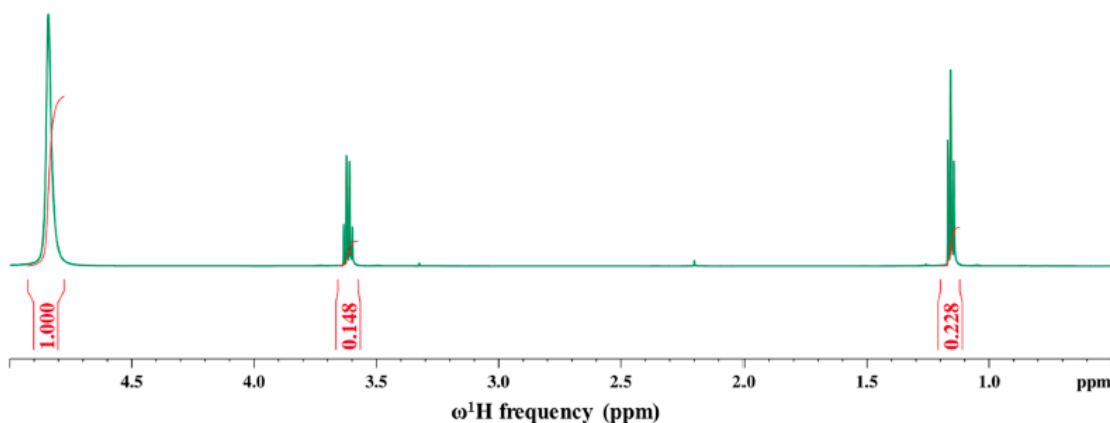


Figura 4. Esquema de multipresaturación agua-etanol mediante experimento NOESY-1D {1Hwater_presat NMR} en mezcales oaxaqueños artesanales y ancestrales.

Las Figuras 5 a 11 presentan el conjunto de análisis estadísticos multivariados que incluye los análisis discriminantes OPLS-DA y PLS-DA, así también el análisis de componentes principales. El PCA es un método no supervisado usado para reducir la dimensionalidad de los datos a un número pequeño de componentes y examinar los posibles agrupamientos de las muestras para el factor evaluado (Cozzolino et al., 2019).

Los análisis de componentes principales en los tres factores evaluados mostraron discriminaciones pobres (Figura 6C, 8C y 10C) por eso se recurrió al análisis supervisado OPLS-DA para maximizar la separación entre muestras. Para este fin se empleó la validación cruzada de Monte-Carlo (MCCV), la cual selecciona el número de componentes que el modelo debe contener (Xu & Liang, 2001) mediante un conjunto de particiones por número de permutaciones. Al realizar la validación del modelo nos aseguramos que las conclusiones derivadas de éste sean confiables (Worley & Powers, 2016).

La Figura 5 muestra con un 95 % de confianza que después de aplicar el análisis OPLS-DA, las muestras de mezcal procedentes de tres estados de la República Mexicana pueden ser diferenciadas ($R^2X = 0.8756$; $Q^2 = 0.822$; $p\text{-value} = 8.48 \times 10^{-5}$). La cercanía geográfica entre las regiones de Oaxaca y Puebla, denotada por su ubicación geográfica (alrededor de 16-17 ° N, 96° O para Oaxaca y alrededor de 18-19° N, 97-98° O para Puebla) puede limitar la discriminación de mezcales

procedentes de estas regiones; en cambio, las bebidas de San Luis Potosí son elaboradas en poblaciones localizadas alrededor de 22°16–24' N, 101° 6–100' O, es decir, a mayor separación geográfica con respecto a las ubicaciones de Oaxaca y Puebla.

Las Figuras 7 y 8 muestran los análisis OPLS-DA y PCA para los mezcales evaluados de acuerdo a su especie. El modelo supervisado OPLS-DA ($R^2X=0.7049$; $Q^2=0.504$; $p\text{-value} < 7.6 \times 10^{-4}$) puede discriminar los mezcales de *Agave salmiana* (diamantes color magenta en la Figura 7), procedentes de San Luis Potosí, del resto de las especies. El uso de dos componentes PLS (Figura 8A) fue suficiente para representar el 50 % de la discriminación en mezcal de acuerdo con la especie con que fue elaborado, puesto que si incrementamos el número de componentes del modelo de PLS, disminuye la precisión de la predicción.

También se observa que las muestras consideradas ensamble (mezclas entre especies de agave) de *A. potatorum*, *A. angustifolia* y *A. cupreata* fueron excluidas de las regiones Hotelling T2 (intervalo de confianza del 95 %) que delimita a *A. angustifolia* (denotado por círculos color verde en la Figura 7) y *A. potatorum* (denotado por diamantes color cian en la Figura 7), aún así, se observa cercanía entre el ensamble referido y la región delimitada por *A. potatorum* (tp, to), lo que podría sugerir la contribución de *A. potatorum* a la mezcla. La discriminación entre especies es complicada por algunas posibles razones: i) los valores de cargas limitados que produce la matriz de datos de $^1\text{HNMR}$ de mezcal, ii) la incertidumbre acerca de la autenticidad de los agaves que los maestros mezcaleros dicen, y que no puede comprobarse debido a la falta de un método analítico de fraccionamiento isotópico para plantas de metabolismo ácido crasuláceo (CAM) como el maguey (O'Leary, 1981), y iii) la falta de control que implica el intercambio de plantas nativas de agave entre regiones productoras de diferentes estados, principalmente entre estados fronterizos como Oaxaca y Puebla. En general, las diferencias en los mezcales producidos en México se deben principalmente a la especie de agave empleada y a los métodos tradicionales usados en diversas regiones productoras (Ávila-Reyes et al., 2010).

Las Figuras 9 y 10 muestran los análisis OPLS-DA y PCA para los mezcales evaluados de acuerdo a su proceso de elaboración, para esto la NOM-070-SCFI-2016 ha establecido tres categorías: 1) mezcal, 2) mezcal artesanal y 3) mezcal ancestral. En la Figura 9 se observa en el gráfico de puntuaciones a los mezcales ancestrales con valores en el componente predictivo (tp,1) mayores a cero y los artesanales con valores en el componente tp,1 menores a cero, lo que indica que el modelo del OPLS-DA ($R^2X= 0.6012$; $Q^2= 0.178$; $p\text{-value} < 6.38 \times 10^{-3}$) puede discriminar mezcal ancestral del artesanal. El uso de tres componentes del modelo PLS fue suficiente para representar el 18 % de las discriminaciones observadas (Figura 10C). Las regiones Hotelling T2, denotadas por un intervalo de confianza del 95 %, agrupan gran parte de las muestras de mezcal ancestral (denotado por cuadros color rojo en Figura 9) como corresponde, sin embargo, también se observa un traslape entre muestras ancestrales y artesanales (denotado por círculos color azul en la Figura 9), lo cuál pudiera deberse a que dentro de las prácticas realizadas por los mezcaleros, algunos de ellos realizan la primera destilación en alambiques de cobre y la segunda en ollas de barro, por tanto, el proceso puede ser 100% artesanal, 100% ancestral o una combinación de ambos.

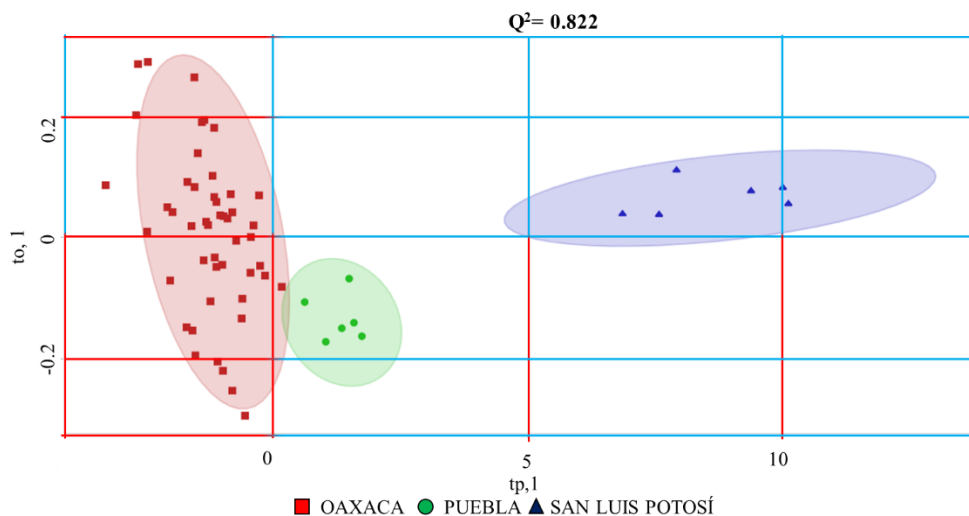


Figura 5. Análisis estadístico multivariado del OPLS-DA generados de la matriz de datos de NMR-1D: {1Hwater_presat NMR} para el factor región de procedencia del mezcal.

Las regiones Hotelling T2 de las elipses representan el 95 % de intervalo de confianza.

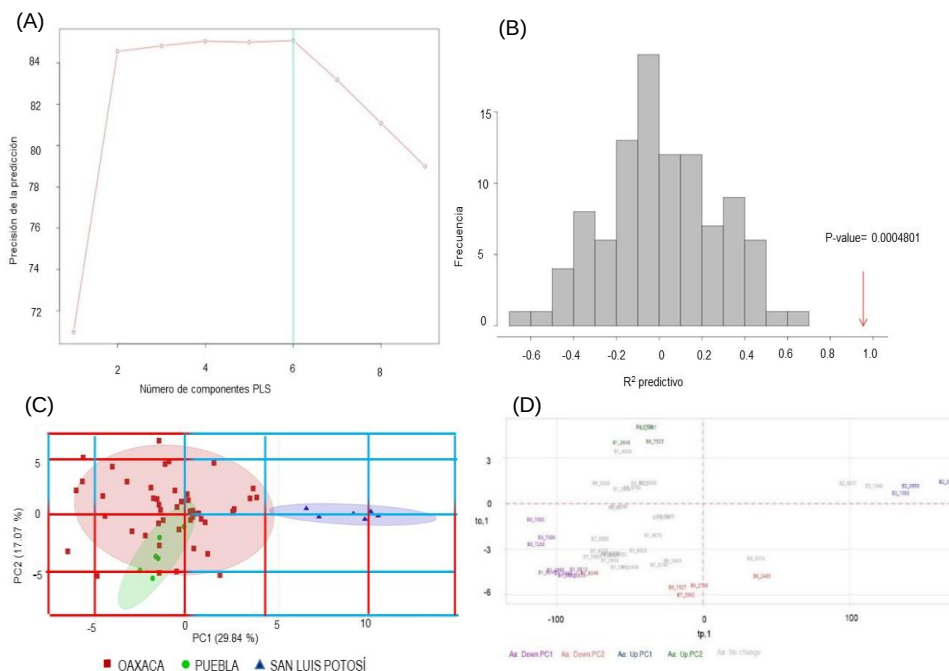


Figura 6. Curvas de precisión de la predicción como una función de los componentes del PLS-DA (A), significancia de la prueba de permutación (B), análisis de componentes principales (C) obtenidos de la matriz de datos de NMR y gráfico de cargas del OPLS-DA de mezcales (D).

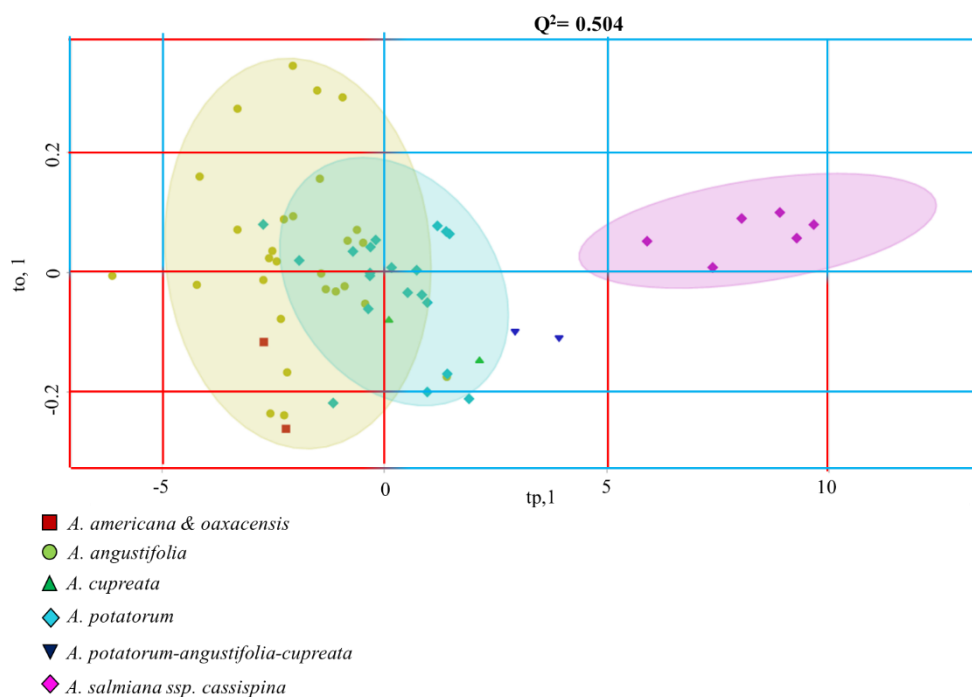


Figura 7. Análisis estadístico multivariado del OPLS-DA generados de la matriz de datos de NMR-1D: {1Hwater_presat NMR} para el factor especie de agave utilizada en la manufactura del mezcal.

Las regiones Hotelling T2 de las elipses representan el 95 % de intervalo de confianza.

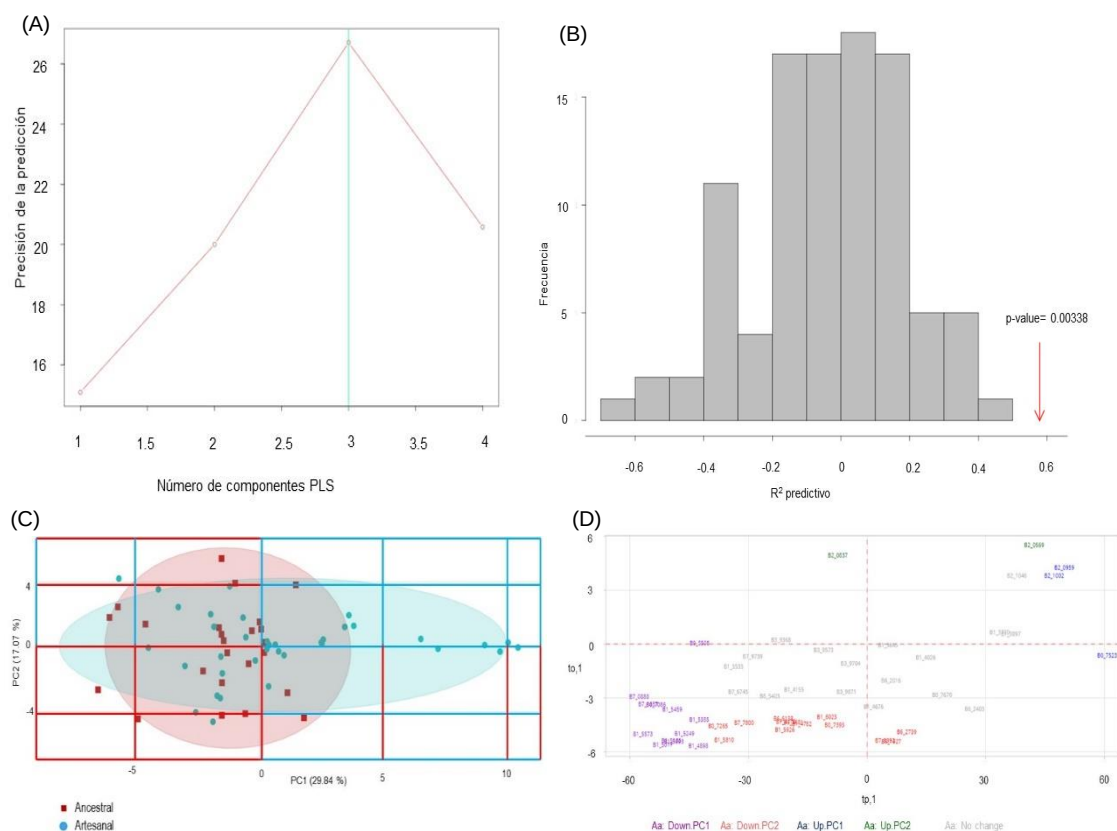


Figura 10. Curvas de precisión de la predicción como una función de los componentes del PLS-DA (A), significancia de la prueba de permutación (B), análisis de componentes principales (C) obtenidos de la matriz de datos de ^1H -NMR y gráfico de cargas del análisis discriminante OPLS-DA de mezcales (D).

Un resumen de lo anteriormente descrito se presenta en la Figura 11, que abrevia algunos aspectos clave en los gráficos de cargas del análisis OPLS-DA de la matriz de datos de NMR de mezcal, que básicamente son: i) variabilidad en los procesos de manufactura del mezcal como responsable de la baja reproducibilidad espectral de la ^1H -NMR, a su vez evidenciada en la rutina de análisis estadístico multivariado que directamente afecta la identificación de regiones espectroscópicas específicas para la discriminación, ii) derivado de esto, una cantidad importante de valores de cargas se distribuyen alrededor del cuadrante to,1 negativo / tp,1 negativo (-,-), lo que ocasiona baja calidad discriminativa del modelo OPLS-DA sobre todo para el factor proceso, iii) finalmente, los gráficos del to,1 = f(frecuencia $\omega^1\text{H}$) (Figura 10 derecha) muestran

que las resonancias discriminantes de ^1H -NMR se encuentran en ciertos rangos de frecuencia espectral del mezcal, a desplazamientos químicos que van de 6 a 10 ppm.

A pesar de la falta de controles de calidad rigurosos en la manufactura del mezcal, reflejada en la matriz de datos de ^1H -NMR, que a su vez origina menos valores ponderados de la variable independiente (cargas) y que directamente influyen en las discriminaciones antes mencionadas, es posible proponer discriminaciones en mezcal por región ligadas a su localización geográfica. También se evidencia que la dificultad de proponer una huella metabolómica holística robusta al discriminar mezcales por especie está relacionada con la falta de buenas prácticas de manufactura referidas anteriormente. Discriminaciones ligeras entre mezcal ancestral y artesanal se deben a una importante concentración de valores de cargas dentro del cuadrante negativo (cuadrante $t_{0,1}$ negativo / $t_{p,1}$ negativo), como se nota en la Figura 11C (inferior izquierda). Se observó también que la mayoría de los desplazamientos químicos de ^1H -NMR discriminantes pertenecen a compuestos aromáticos en los mezcales y correlacionan con valores de cargas definidos en los cuadrantes negativos ($t_{0,1}$), tal como se expondrá en la Figura 12.

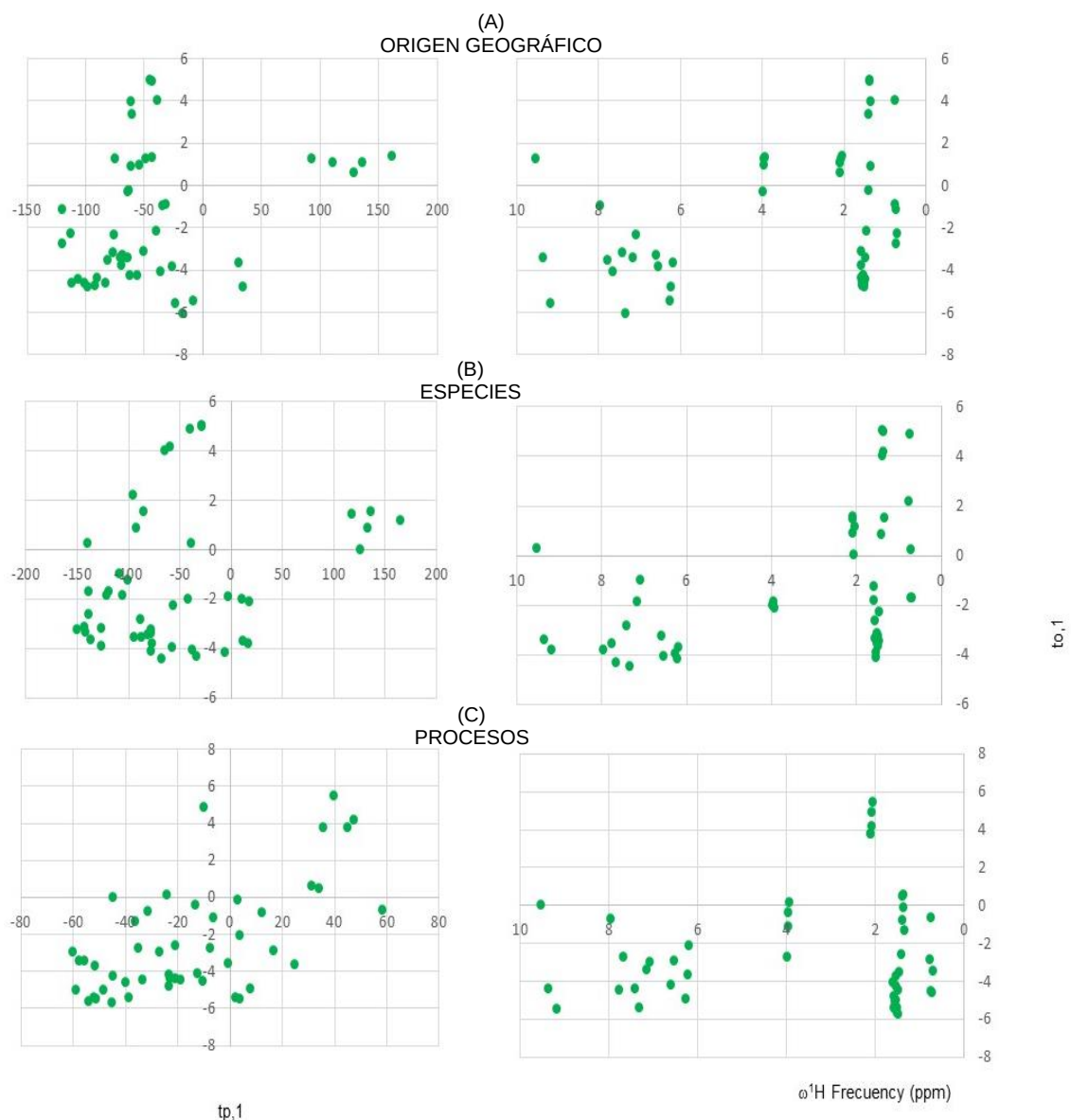


Figura 11. Gráfico de cargas del modelo OPLS-DA de los factores discriminantes: región (A), especie (B) y proceso (C) evaluado en una matriz de ^1H -NMR obtenida en mezcal.

Los componentes ortogonales ($to,1$) son expresados como una función de componentes predictivos ($tp,1$, gráficos de la izquierda) y desplazamientos químicos de protón (frecuencia $\omega^1\text{H}$, gráficos de la derecha) de las matrices de datos de ^1H -NMR del mezcal.

La espectroscopía de ^1H -NMR acoplada a análisis estadístico multivariado permitió la identificación de 11 metabolitos discriminantes en mezcal (Figura 12), los cuales fueron: acetaldehído, 5-substituido furanaldehído (posiblemente 5-hidroximetil-2-furfural), 2-furfural, ácido 2-furoico, 2-furanmetanol, alcohol fenético, acetato fenético, acetato de etilo, 1-butanol, 2-butanol y 2-metil-1-

propanol. El reporte actual presenta el primer esfuerzo de un perfilamiento por $^1\text{H-NMR}$ en una dimensión basado en desplazamientos químicos (δ , ppm), acoplamiento escalar homonuclear de protón (J , Hz) y multiplicidad de las resonancias de $^1\text{H-NMR}$ de los metabolitos discriminantes (Cuadro 2) en comparación con las investigaciones que reportan compuestos principales en mezcales de diferentes especies de agave analizados mediante técnicas cromatográficas (Nolasco-Cancino et al., 2018; Palmqvist & Hahn-Hägerdal, 2000; Torres-García et al., 2019).

Todos los derivados del furano que se identificaron (2-furfural, 5-substituido furanaldehído, ácido 2-furoico y 2-furanmetanol), además del alcohol fenetílico, acetato fenetílico, acetato de etilo y las especies de n-butanol presentaron valores de cargas negativos como las huellas responsables para la discriminación del modelo OPLS-DA de procesos de manufactura, especie y región. Caso contrario se observó únicamente en 2-metil-1-propanol que presentó valores positivos. La presencia de compuestos furánicos en bebidas a base de agave se debe a la hidrólisis de la inulina durante la etapa de cocción de las piñas (Flores et al., 2009; Quintero Arenas et al., 2020). Aunque Ebeler et al. (2000) encontraron que el 2-furfural se formó durante la destilación en alambique a causa de las temperaturas empleadas y Medina-Valtierra et al. (2011) atribuyeron las concentraciones de compuestos carbonilos, principalmente aldehídos como acetaldehído y furfural, a las especies de agave estudiadas y a los procesos artesanales empleados para la manufactura del mezcal. Las concentraciones de acetato de etilo son indicadoras de un proceso de fermentación bajo condiciones aeróbicas, a causa de bacterias acéticas o una incorrecta separación de las fracciones de cabezas durante la destilación (Cortés et al., 2011; Mesas & Alegre, 1999). La destilación juega un papel preponderante en la calidad final de la bebida, su correcta ejecución reflejará la cantidad y concentración de compuestos presentes tanto en las fracciones de cabeza, como en el corazón y las colas (Xiang et al., 2020).

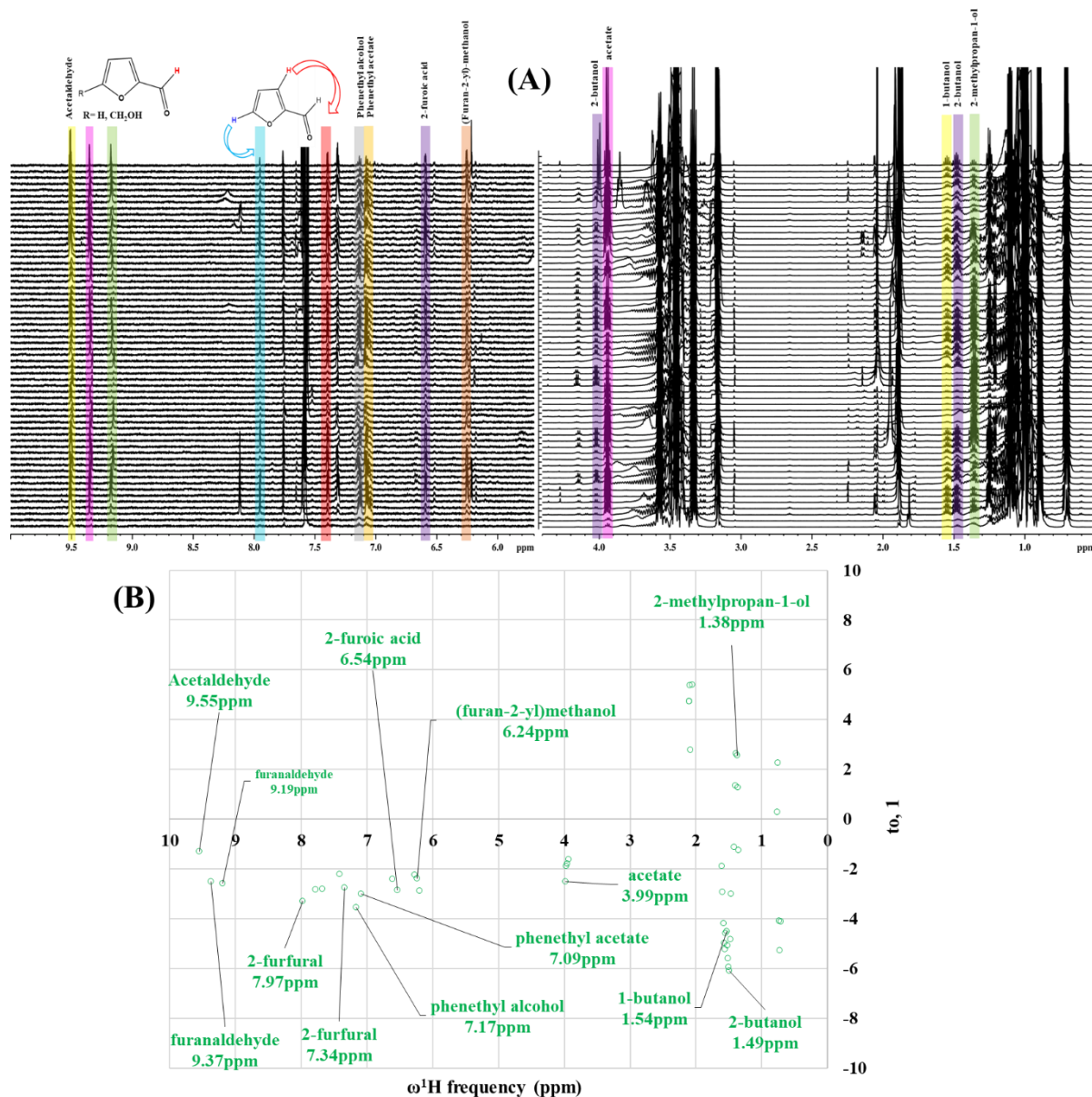
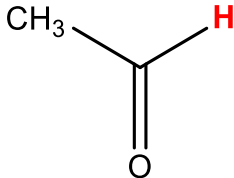
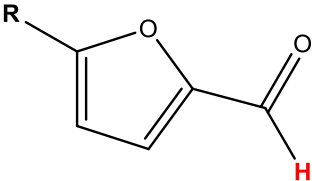
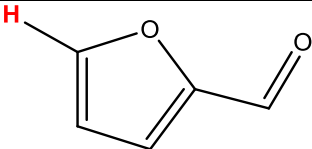
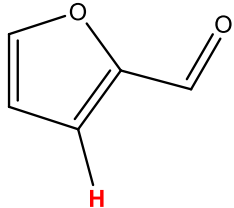
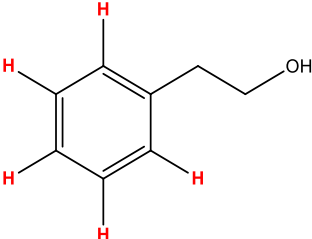
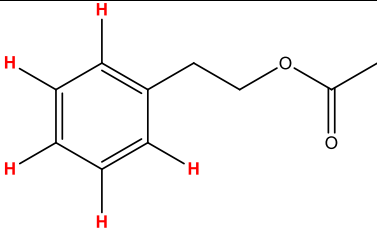
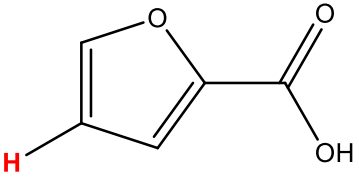
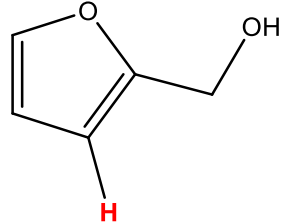
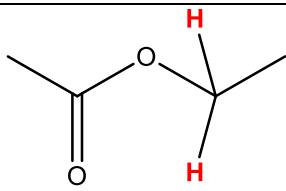
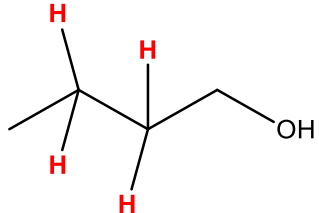
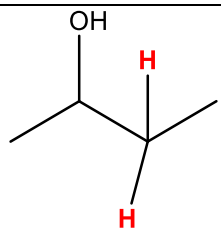
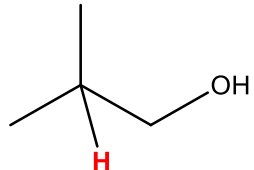


Figura 12. Gráficos apilados de los espectros de ^1H -NMR de mezcales Mexicanos, con asignación preliminar de señales basada en literatura (A) y gráfico de cargas del OPLS-DA [to,1] como una función de los desplazamientos químicos de protón de los metabolitos identificados y sus desplazamientos químicos asignados (B).

Cuadro 2. Resonancias de ^1H -NMR con desplazamientos químicos (δ , ppm), acoplamiento escalar homonuclear de protón (J, Hz) y multiplicidad de las señales de los metabolitos identificados en mezcales mexicanos, que muestran en cada caso los desplazamientos correspondientes

Fórmula molecular reducida ²	(δ , ppm), (J, Hz), Multiplicidad
 Acetaldehído	$\delta=9.55$ ppm, J=2.82 Hz, cuarteto
 5-furaldehído y 2-furfural	$\delta=9.37$ ppm, singulete $\delta=9.19$ ppm, singulete
 2-furfural	$\delta=7.97$ ppm, multiplete
 2-furfural	$\delta=7.34$ ppm, multiplete
 Alcohol fenético	$\delta=7.17$ ppm, J=7.47 Hz, multiplete
 Acetato fenético	$\delta=7.09$ ppm, J=7.48 Hz, multiplete

Cuadro 2. Continuación

Fórmula molecular reducida ^z	(δ , ppm), (J, Hz), Multiplicidad
 Ácido 2-furoico	$\delta=6.54$ ppm, J=3.6 Hz/1.57 Hz, doble de dobles
 2-furanmetanol	$\delta=6.24$ ppm, J=3.3 Hz, doblete
 Acetato de etilo	$\delta=3.99$ ppm, J=7.2 Hz, cuarteto
 1-butanol	$\delta=1.54$ ppm, J=6.67 Hz, multiplete
 2-butanol	$\delta=1.49$ ppm, J=6.67 Hz, multiplete
 2-metil-1-propanol	$\delta=1.38$ ppm, J=7.1 Hz, heptuplete

^z El protón (¹H) asignado es representado con color rojo

3.4 Conclusiones

El uso de metabolómica no dirigida mediante espectroscopía de $^1\text{H-NMR}$ acoplada a análisis estadístico multivariado permitió, por primera vez, la evaluación de mezcales nativos mexicanos ancestrales y artesanales, con el fin de obtener perfiles holísticos con base al proceso de manufactura, especie de agave y región geográfica. La capacidad discriminante y validez del modelo OPLS-DA, apoyadas por los parámetros estadísticos R^2X , Q^2 y p-value, definieron la calidad de cada modelo.

El análisis estadístico multivariado de la matriz de datos de $^1\text{H-NMR}$ produce capacidad discriminante limitada en el mezcal de diversas especies de agave y regiones geográficas, lo que es atribuido a la calidad de la matriz de $^1\text{H-NMR}$ del mezcal, que a su vez refleja la falta de controles de calidad rigurosos en la producción de la bebida. Sin embargo, los resultados estadísticamente aceptables del análisis discriminante OPLS-DA obtenido para discriminar entre regiones y especies en mezcales será un punto de partida para impulsar a los productores y agencias locales a usar la metodología de $^1\text{H-NMR-MSA}$ aquí propuesta como el comienzo del establecimiento de bases de datos para el control de calidad dentro de la industria mezcalera tal como sucede con las bases de datos enológicas.

El análisis OPLS-DA fuertemente sugiere que con incrementar la base de datos de la $^1\text{H-NMR}$ mejorará la forma de distinguir entre procesos en la medida que se use el modelo de $^1\text{H-NMR-MSA}$ para control de calidad puesto que se ha evidenciado que la composición química del mezcal es compleja y depende de factores como especie de agave y proceso empleado que al final influirán sobre las características sensoriales de la bebida.

3.5 Literatura citada

Ávila-Reyes, J. A., Almaraz-Abarca, N., Delgado-Alvarado, E. A., González-Valdez, L. S., del Toro, G. V., & Durán Páramo, E. (2010). Phenol profile and antioxidant capacity of mescal aged in oak wood barrels. *Food Research International*, 43(1), 296–300.

<https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2009.10.002>

- Castañeda-Nava, J. J., Rodríguez-Domínguez, J. M., Camacho-Ruiz, R. M., Gallardo-Valdez, J., Villegas-García, E., & Gutiérrez-Mora, A. (2019). Morphological comparison among populations of *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck (Asparagaceae), a species used for mezcal production in Mexico. *Flora*, 255, 18–23. <https://doi.org/10.1016/J.FLORA.2019.03.019>
- Chavez-Parga, M. D. C., Pérez Hernández, E., & González Hernández, J. C. (2016). Revisión del agave y el mezcal. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 18(1). <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v18n1.49552>
- Corsaro, C., Cicero, N., Mallamace, D., Vasi, S., Naccari, C., Salvo, A., Vincenzo, G., S., & Dugo, G. (2016). HR-MAS and NMR towards Foodomics. *Food Research International*, 89, 1085–1094. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2016.09.033>
- Cortés, S., Rodríguez, R., Salgado, J. M., & Domínguez, J. M. (2011). Comparative study between Italian and Spanish grape marc spirits in terms of major volatile compounds. *Food Control*, 22(5), 673–680. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.09.006>
- Cozzolino, D., Power, A., & Chapman, J. (2019). Interpreting and Reporting Principal Component Analysis in Food Science Analysis and Beyond. *Food Analytical Methods*, 12(11), 2469–2473. <https://doi.org/10.1007/s12161-019-01605-5>
- De Meyer, T., Sinnaeve, D., Van Gasse, B., Tsiorkova, E., Rietzschel, E., L. De Buyzere, M., Gillebert, T. C., Bekaert, S., Martins, J. C., & Van Crielinge, W. (2008). NMR-Based Characterization of Metabolic Alterations in Hypertension Using an Adaptive, Intelligent Binning Algorithm. *Analytical Chemistry*, 80(10), 3783–3790. <https://doi.org/10.1021/ac7025964>
- Deborde, C., Moing, A., Roch, L., Jacob, D., Rolin, D., & Giraudeau, P. (2017). Plant metabolism as studied by NMR spectroscopy. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 102–103, 61–97. <https://doi.org/10.1016/j.pnmrs.2017.05.001>
- Del Fresno, J. M., Escott, C., Loira, I., Herbert-Pucheta, J. E., Schneider, R.,

- Carrau, F., Cuerda, R., & Morata, A. (2020). Impact of *Hanseniaspora Vineae* in Alcoholic Fermentation and Ageing on Lees of High-Quality White Wine. *Fermentation*, 6(3), 66. <https://doi.org/10.3390/fermentation6030066>
- Duarte, I., Barros, A., Belton, P. S., Righelato, R., Spraul, M., Humpfer, E., & Gil, A. M. (2002). High-Resolution Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and Multivariate Analysis for the Characterization of Beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(9), 2475–2481. <https://doi.org/10.1021/jf011345j>
- Ebeler, S. E., Terrien, M. B., & Butzke, C. E. (2000). Analysis of brandy aroma by solid-phase microextraction and liquid-liquid extraction. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(5), 625–630. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(200004\)80:5<625::AID-JSFA584>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(200004)80:5<625::AID-JSFA584>3.0.CO;2-5)
- Escalante-Minakata, P., Blaschek, H. P., Barba De La Rosa, A. P., Santos, L., & De León-Rodríguez, A. (2008). Identification of yeast and bacteria involved in the mezcal fermentation of *Agave salmiana*. *Letters in Applied Microbiology*, 46(6), 626–630. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02359.x>
- Esslinger, S., Riedl, J., & Fahl-Hassek, C. (2014). Potential and limitations of non-targeted fingerprinting for authentication of food in official control. *Food Research International*, 60, 189–204. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.10.015>
- Flores, C. R., Figueroa, J. A. L., Wrobel, K., & Wrobel, K. (2009). ICP-MS multi-element profiles and HPLC determination of furanic compounds in commercial tequila. *European Food Research and Technology*, 228(6), 951–958. <https://doi.org/10.1007/s00217-009-1010-7>
- Gil, A. M., Duarte, I. F., Delgadillo, I., Colquhoun, I. J., Casascelli, F., Humpfer, E., & Spraul, M. (2000). Study of the Compositional Changes of Mango during Ripening by Use of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(5), 1524–1536. <https://doi.org/10.1021/jf9911287>

- Godelmann, R., Fang, F., Humpfer, E., Schütz, B., Bansbach, M., Schäfer, H., & Spraul, M. (2013). Targeted and Nontargeted Wine Analysis by ¹H NMR Spectroscopy Combined with Multivariate Statistical Analysis. Differentiation of Important Parameters: Grape Variety, Geographical Origin, Year of Vintage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(23), 5610–5619. <https://doi.org/10.1021/jf400800d>
- Gougeon, L., Da Costa, G., Le Mao, I., Ma, W., Teissedre, P.-L., Guyon, F., & Richard, T. (2018). Wine Analysis and Authenticity Using ¹H-NMR Metabolomics Data: Application to Chinese Wines. *Food Analytical Methods*, 11(12), 3425–3434. <https://doi.org/10.1007/s12161-018-1310-2>
- Hatzakis, E. (2019). Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy in Food Science: A Comprehensive Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(1), 189–220. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12408>
- Herbert-Pucheta, J. E., Mejía-Fonseca, I., Zepeda-Vallejo, L. G., Milmo-Brittingham, D., & Maya, G. P. (2019). The “Wine-T1” NMR experiment for novel wine-metabolome fingerprinting with nuclear-spin relaxation. *BIO Web of Conferences*, 12, 02029. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20191202029>
- Herbert-Pucheta, J. E., Padilla-Maya, G., Milmo-Brittingham, D., Lojero, D., Gilmore, A. M., Raventós-Llopart, L., Hernández-Pulido, K. E., & Zepeda-Vallejo, L. G. (2019). Multivariate spectroscopy for targeting phenolic choreography in wine with A-TEEM™ and NMR crosscheck non-targeted metabolomics. *BIO Web of Conferences*, 15, 02006. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20191502006>
- Holmes, E., Loo, R.L., Stamler, J., Bictash, M., Yap, I.K., Chan, Q., Ebbels, T.M., Iorio, M.D., Brown, I.J., Veselkov, K.A., Daviglus, M.L., Kesteloot, H.E., Ueshima, H., Zhao, L., Nicholson, J.K., & Elliott, P. (2008). Human metabolic phenotype diversity and its association with diet and blood pressure. *Nature*, 453(7193), 396–400. <https://doi.org/10.1038/nature06882>
- Hu, B., Cao, Y., Zhu, J., Xu, W., & Wu, W. (2019). Analysis of metabolites in chardonnay dry white wine with various inactive yeasts by ¹H NMR

- spectroscopy combined with pattern recognition analysis. *AMB Express*, 9(1), 140. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0861-y>
- Hu, B., Gao, J., Xu, S., Zhu, J., Fan, X., & Zhou, X. (2020). Quality evaluation of different varieties of dry red wine based on nuclear magnetic resonance metabolomics. *Applied Biological Chemistry*, 63(1), 24. <https://doi.org/10.1186/s13765-020-00509-x>
- Jacob, D., Deborde, C., Lefebvre, M., Maucourt, M., & Moing, A. (2017). NMRProcFlow: a graphical and interactive tool dedicated to 1D spectra processing for NMR-based metabolomics. *Metabolomics*, 13(4), 36. <https://doi.org/10.1007/s11306-017-1178-y>
- Kew, W., Bell, N. G. A., Goodall, I., & Uhrín, D. (2017). Advanced solvent signal suppression for the acquisition of 1D and 2D NMR spectra of Scotch Whisky. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 55(9), 785–796. <https://doi.org/10.1002/mrc.4621>
- Kew, W., Goodall, I., & Uhrín, D. (2019). Analysis of Scotch Whisky by ^1H NMR and chemometrics yields insight into its complex chemistry. *Food Chemistry*, 298, 125052. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125052>
- Kirchmayr, M. R., Segura-García, L. E., Lappe-Oliveras, P., Moreno-Terrazas, R., de la Rosa, M., & Gschaedler Mathis, A. (2017). Impact of environmental conditions and process modifications on microbial diversity, fermentation efficiency and chemical profile during the fermentation of Mezcal in Oaxaca. *LWT - Food Science and Technology*, 79, 160–169. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.12.052>
- Le Gall, G., Puaud, M., & Colquhoun, I. J. (2001). Discrimination between Orange Juice and Pulp Wash by ^1H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy: Identification of Marker Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(2), 580–588. <https://doi.org/10.1021/jf001046e>
- López-Morales, C.A., Vázquez-Leyva, S., Vallejo-Castillo, L., Carballo-Uicab, G., Muñoz-García, L., Herbert-Pucheta, J.E., Zepeda-Vallejo, L.G., Velasco-Velázquez, M.A., Pavón, L., Pérez-Tapia, S.M., & Medina-Rivero, E. (2019). Determination of Peptide Profile Consistency and Safety of Collagen

- Hydrolysates as Quality Attributes. *Journal of Food Science*, 84(3), 430–439.
<https://doi.org/10.1111/1750-3841.14466>
- Mazzei, P., Spaccini, R., Francesca, N., Moschetti, G., & Piccolo, A. (2013). Metabolomic by ^1H NMR Spectroscopy Differentiates “Fiano Di Avellino” White Wines Obtained with Different Yeast Strains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(45), 10816–10822.
<https://doi.org/10.1021/jf403567x>
- Medina Valtierra, G., Juárez Ciprés, R., & Peña Álvarez, A. (2011). Identification and Quantification of Aldehydes in Mezcal by Solid Phase Microextraction with On-fiber Derivatization-Gas Chromatography Article. In *J. Mex. Chem. Soc* (Vol. 55).
- Mesas, J. M., & Alegre, M. T. (1999). El papel de los microorganismos en la elaboración del vino. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 2(4), 174–183.
<https://doi.org/10.1080/11358129909487599>
- Monakhova, Y. B., Godelmann, R., Kuballa, T., Mushtakova, S. P., & Rutledge, D. N. (2015). Independent components analysis to increase efficiency of discriminant analysis methods (FDA and LDA): Application to NMR fingerprinting of wine. *Talanta*, 141, 60–65.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.03.037>
- NMX-V-013-NORMEX-2019. Bebidas Alcohólicas-Determinación del Contenido Alcohólico. Retrieved December 8, 2020, from https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5594809&fecha=11/06/2020
- NMX-V-014.1986. Bebidas Alcohólicas Destiladas. Determinación de Alcoholes Superiores. Retrieved December 8, 2020, from <https://www.colpos.mx/bancodenormas/%0Anmexicanas/NMX-V-014-1986.PDF>
- NMX-V-017-S-2014. Bebidas Alcohólicas. Determinación De Extracto Seco y Cenizas. Retrieved December 8, 2020, from https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5594808&fecha=11/06/%0A2020

- NMX-V-021-1986. Bebidas Alcohólicas Destiladas. Determinación de Metanol. Retrieved December 8, 2020, from <https://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-V-021-1986.PDF>
- Nolasco-Cancino, H., Santiago-Urbina, J. A., Wachter, C., & Ruíz-Terán, F. (2018). Predominant Yeasts During Artisanal Mezcal Fermentation and Their Capacity to Ferment Maguey Juice. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02900>
- NOM-006-SCFI-2012. Bebidas alcohólicas-Tequila-Especificaciones. Retrieved December 8, 2020, from http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.%0Aphp?codigo=5282165&fecha=13/12/2012
- NOM-070-SCFI-2016. Bebidas Alcohólicas-Mezcal-Especificaciones. Retrieved December 7, 2020, from https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5472787&fecha=23/02/2017
- O'Leary, M. H. (1981). Carbon isotope fractionation in plants. *Phytochemistry*, 20(4), 553–567. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(81\)85134-5](https://doi.org/10.1016/0031-9422(81)85134-5)
- Palmqvist, E., & Hahn-Hägerdal, B. (2000). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*, 74(1), 25–33. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00161-3](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00161-3)
- Papotti, G., Bertelli, D., Graziosi, R., Maietti, A., Tedeschi, P., Marchetti, A., & Plessi, M. (2015). Traditional balsamic vinegar and balsamic vinegar of Modena analyzed by nuclear magnetic resonance spectroscopy coupled with multivariate data analysis. *LWT - Food Science and Technology*, 60(2), 1017–1024. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2014.10.042>
- Quintero-Arenas, M. A., Meza-Márquez, O. G., Velázquez-Hernández, J. L., Gallardo-Velázquez, T., & Osorio-Revilla, G. (2020). Quantification of adulterants in mezcal by means of FT-MIR and FT-NIR spectroscopy coupled to multivariate analysis. *CyTA - Journal of Food*, 18(1), 229–239. <https://doi.org/10.1080/19476337.2020.1740327>
- Rodrigues, J. E., & Gil, A. M. (2011). NMR methods for beer characterization and quality control. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 49, S37–S45.

<https://doi.org/10.1002/mrc.2844>

- Sárvári-Horváth, I., Franzén, C. J., Taherzadeh, M. J., Niklasson, C., & Lidén, G. (2003). Effects of Furfural on the Respiratory Metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* in Glucose-Limited Chemostats. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(7), 4076–4086. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.7.4076-4086.2003>
- Schievano, E., Sbrizza, M., Zuccato, V., Piana, L., & Tessari, M. (2020). NMR carbohydrate profile in tracing acacia honey authenticity. *Food Chemistry*, 309, 125788. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125788>
- Shintu, L., & Caldarelli, S. (2006). Toward the Determination of the Geographical Origin of Emmental(er) Cheese via High Resolution MAS NMR: A Preliminary Investigation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(12), 4148–4154. <https://doi.org/10.1021/jf060532k>
- Torres-García, I., Rendón-Sandoval, F. J., Blancas, J., Casas, A., & Moreno-Calles, A. I. (2019). The genus Agave in agroforestry systems of Mexico. *Botanical Sciences*, 97(3), 263. <https://doi.org/10.17129/botsci.2202>
- UNESCO. (2020). Agave Landscape and Ancient Industrial Facilities of Tequila. Retrieved December 7, 2020, from <https://whc.unesco.org/en/list/1209/>
- Vázquez-Leyva, S., Vallejo-Castillo, L., López-Morales, C. A., Herbert-Pucheta, J. E., Zepeda-Vallejo, L. G., Velasco-Velázquez, M., ... Medina-Rivero, E. (2019). Identity Profiling of Complex Mixtures of Peptide Products by Structural and Mass Mobility Orthogonal Analysis. *Analytical Chemistry*, 91(22), 14392–14400. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b02873>
- Villanueva-Rodriguez, S., & Escalona-Buendia, H. (2012). Tequila and mezcal: sensory attributes and sensory evaluation. *Alcoholic Beverages*, 359–378. <https://doi.org/10.1533/9780857095176.3.359>
- Worley, B., & Powers, R. (2016). PCA as a Practical Indicator of OPLS-DA Model Reliability. *Current Metabolomics*, 4(2), 97–103. <https://doi.org/10.2174/2213235X04666160613122429>
- Xiang, X., Lan, Y., Gao, X., Xie, H., An, Z., Lv, Z., Yin-Shi, Duan, C., & Wu, G. F. (2020). Characterization of odor-active compounds in the head, heart, and

tail fractions of freshly distilled spirit from Spine grape (*Vitis davidii* Foex) wine by gas chromatography-olfactometry and gas chromatography-mass spectrometry. *Food Research International*, 137, 109388. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109388>

Xu, Q.-S., & Liang, Y.-Z. (2001). Monte Carlo cross validation. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 56(1), 1–11. [https://doi.org/10.1016/S0169-7439\(00\)00122-2](https://doi.org/10.1016/S0169-7439(00)00122-2)

4. ANÁLISIS METABOLÓMICO DE MEZCAL POR ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO Y CROMATOGRAFÍA DE GASES PARA SU DISCRIMINACIÓN POR ESPECIE, ORIGEN GEOGRÁFICO Y PROCESO DE ELABORACIÓN

Resumen

Se utilizó espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier con reflectancia total atenuada (ATR-FTIR) y cromatografía de gases para discriminar mezcales por especie de agave, origen geográfico y proceso de manufactura. La cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID) ayudó a determinar el contenido de alcoholes superiores y se encontró que todos los valores corresponden con lo establecido por la NOM-070-SCFI-2016. La espectroscopía ATR-FTIR permitió asociar la vibración intramolecular con los grupos funcionales de compuestos presentes en el mezcal, que posteriormente fueron identificados por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas mediante microextracción en fase sólida (SPME-GC-MS). El modelo discriminante de mínimos cuadrados parciales ortogonales (OPLS-DA) con matriz de datos de ATR-FTIR fue significativo para los factores origen ($Q^2=0.58$, $R^2Y=0.99$ y $p\text{-value}=0.02$) y proceso ($Q^2=0.57$, $R^2Y=0.93$ y $p\text{-value}=0.01$) mientras que el modelo discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) con matriz de datos de SPME-GC-MS fue significativo únicamente para el factor especie ($Q^2=0.48$, $R^2Y=0.90$ y $p\text{-value}=0.03$).

Palabras clave: ATR-FTIR, SPME-GC-MS, GC-FID, compuestos volátiles, alcoholes superiores.

METABOLOMIC PROFILING OF MEZCAL BY INFRARED SPECTROSCOPY AND GAS CHROMATOGRAPHY FOR ITS DISCRIMINATION BY SPECIES, GEOGRAPHICAL ORIGIN AND ELABORATION PROCESS

Abstract

Attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR) and gas chromatography were used to discriminate mezcals by agave species, geographical origin and manufacturing process. Gas chromatography coupled with a flame ionization detector (GC-FID) was performed to determinate the content of higher alcohols and it was found in accordance with the Mexican Official Standard (NOM-070-SCFI-2016). ATR-FTIR spectroscopy allowed to associate the intramolecular vibration with the functional groups of compounds present in mezcal, which were later identified through solid-phase microextraction and gas chromatography coupled to mass spectrometry (SPME-GC-MS). The orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) of the ATR-FTIR data matrix was statistically significant for the origin ($Q^2=0.58$, $R^2Y=0.99$ and $p\text{-value}=0.02$) and process ($Q^2=0.57$, $R^2Y=0.93$ and $p\text{-value}=0.01$) factors while the partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) of the SPME-GC-MS data was significant only for the species factor ($Q^2=0.48$, $R^2Y=0.90$ and $p\text{-value}=0.03$).

Keywords: ATR-FTIR, SPME-GC-MS, GC-FID, volatile compounds, higher alcohols.

4.1 Introducción

La evaluación de la identidad y autenticidad de los alimentos es de importancia no sólo para la protección del consumidor sino también para fabricantes y distribuidores. Dentro de los métodos instrumentales para la evaluación de calidad en alimentos podemos encontrar a la metabolómica por A) resonancia magnética nuclear, la cual ha sido aplicada en pulpa y jugo de naranja (Le Gall et al., 2001), en mango (Gil et al., 2000), así como en vinagre balsámico de Modena (Papotti et al., 2015). B) cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas que se ha aplicado en tofu (Tang et al., 2018), leche ultrapasteurizada (Dursun et al., 2017), cerveza (Castro-Marin et al., 2021), en vino tinto (Issa-Issa et al., 2021) y C) espectroscopía de infrarrojo que se ha aplicado en aceite de oliva extra virgen (Tapp et al., 2003) y café (Briandet et al., 1996).

Existe una creciente necesidad en la evaluación de la autenticidad por métodos analíticos confiables que puedan proporcionar una respuesta decisiva rápida acerca de la trazabilidad de productos alimenticios (Danezis et al., 2016). En este sentido, Godelman et al. (2013) aplicaron análisis de componentes principales (PCA), análisis discriminante lineal y análisis multivariado de la varianza para predecir la clasificación por variedad, origen geográfico y año de cosecha de muestras de vino procedentes de Alemania.

El PCA involucra una transformación de la matriz de datos en un nuevo espacio llamado componentes principales (Minoja & Napoli, 2014), con una consecuente reducción de la dimensionalidad de la información inicial (Hu et al., 2015). Se han implementado rutinas de análisis multivariado mediante PCA; por ejemplo, (Ali et al., 2011) utilizaron PCA en análisis de vinos de la región Palatinado, Alemania pero no encontraron un patrón que permitiera explicar el comportamiento observado debido a la alta variabilidad entre las muestras. Por esto, el análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales ortogonales (OPLS-DA) es un método alternativo cuando el análisis PCA no identifica separación entre grupos,

para ello la validación debe ser rigurosa, de lo contrario el modelo no será estadísticamente confiable (Worley & Powers, 2016).

En cuanto al mezcal, la elaboración involucra la recolección de las plantas de agave, también conocidas como piñas, y remoción de sus hojas, cocción y molienda, fermentación y destilación; la maduración del mezcal en madera es opcional (Escalante-Minakata et al., 2012; Kirchmayr et al., 2017; Villanueva-Rodriguez & Escalona-Buendia, 2012).

La producción de mezcal involucra principalmente procesos de manufactura bajo sistemas artesanales (Chavez-Parga et al., 2016), por ejemplo, en Oaxaca, en donde la mayor parte de las fábricas mezcaleras son localizadas en áreas rurales y la fermentación ocurre naturalmente (Nolasco-Cancino et al., 2018). Debido a esto, muchas veces no se aplica ningún control durante la elaboración y la calidad del producto varía entre lotes (Kirchmayr et al., 2017) lo que puede ocasionar no conformidades (Chavez-Parga et al., 2016). Verdugo-Valdez et al. (2011) concluyeron que es esencial tener estándares de calidad en el proceso; por ejemplo en la materia prima, particularmente en la concentración de azúcares para obtener compuestos volátiles similares.

Como se ha descrito hasta el momento el mezcal es una bebida obtenida mediante proceso ancestral y artesanal lo que sugiere que la composición es variable y podría representar una no conformidad, además al ser una bebida con denominación de origen requiere un control de la producción. Por ello, el objetivo fue proponer un método experimental por espectroscopía de infrarrojo que permita discriminar las muestras por especie de agave, origen geográfico y proceso de manufactura, de tal forma que la información generada contribuya a mantener la calidad de la bebida.

4.2 Materiales y métodos

4.2.1 Reactivos y estándares

Los reactivos y estándares fueron de grado analítico y se compraron a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

4.2.2 Muestras

Las muestras de mezcal (Cuadro 3) correspondieron a los agaves espadín (*Agave angustifolia*), tobalá (*Agave potatorum*) y salmiana (*Agave salmiana*). El origen de los mezcales fue Mexquitic de Carmona y Ahualulco (San Luis Potosí, Méx.) y los distritos Sola de Vega, Tlacolula, Ocotlán y Zimatlán (Oaxaca, Méx). El conjunto de muestras comprendió mezcal de proceso ancestral y artesanal.

Cuadro 3. Mezcales empleados en el análisis de espectroscopía de infrarrojo y cromatografía de gases. Se presenta la especie de agave empleada, origen geográfico, proceso de elaboración, contenido alcohólico y pH.

Código	Especie	Origen geográfico	Proceso	% ABV ^w	pH
1	<i>A. angustifolia</i>	Sola de Vega, Oax ^z	Ancestral	46.7	3.2
2	<i>A. angustifolia</i>	Tlacolula, Oax	Artesanal	41.9	4.0
3	<i>A. angustifolia</i>	Tlacolula, Oax.	Artesanal	40.6	3.5
4	<i>A. angustifolia</i>	Tlacolula, Oax.	Artesanal	46.0 ^v	3.7
5	<i>A. angustifolia</i>	Tlacolula, Oax.	Artesanal	38.2	3.5
6	<i>A. angustifolia</i>	Sola de Vega, Oax.	Ancestral	46.3	3.4
7	<i>A. angustifolia</i>	Tlacolula, Oax.	Artesanal	46.8	3.7
8	<i>A. angustifolia</i>	Sola de Vega, Oax.	Ancestral	47.1	3.6
9	<i>A. angustifolia</i>	Sola de Vega, Oax.	Ancestral	46.9	3.6
10	<i>A. potatorum</i> Zucc	Sola de Vega, Oax.	Ancestral	48.2	3.6
11	<i>A. potatorum</i> Zucc	Ocotlán, Oax.	Artesanal	48.0 ⁵	3.5
12	<i>A. potatorum</i> Zucc	Sola de Vega, Oax.	Ancestral	48.2	3.8
13	<i>A. potatorum</i> Zucc	Sola de Vega, Oax.	Ancestral	49.2	4.6
14	<i>A. salmiana</i> ssp. <i>crassispina</i>	Ahualulco, SLP ^y	Artesanal	38.9	3.8
15	<i>A. salmiana</i> ssp. <i>crassispina</i>	MdC ^x , SLP	Artesanal	39.8	4.2

^z Oax: Oaxaca.

^y SLP: San Luis Potosí.

^x Mexquitic de Carmona.

^w Contenido alcohólico (ABV: Alcohol by volumen) corregido a 20 °C.

^v Valor declarado en la etiqueta.

4.3 Métodos analíticos

4.3.1 Análisis químicos básicos

El contenido alcohólico (NMX-V-013-NORMEX-2019) se determinó con alcoholímetros certificados OIML ISO 4801 -NF B 35-515 (Alla France, Chemillé,

Francia), uno con escala de medición de 30-40 y otro con escala de 40-50 % Alc Vol., calibrados a 20 °C, división de 0.1 y precisión de ± 0.1 . El pH se midió con un potenciómetro HI 98103 (Hanna Instruments, Italia).

4.3.2 Espectroscopía de infrarrojo medio

La espectroscopía de infrarrojo medio por transformada de Fourier (FT-MIR) se desarrolló con un espectrofotómetro (Thermo ScientificTM NicoletTM iSTM 5 ZnSe, Waltham, MA, USA) provisto de un cristal diamante de reflectancia total atenuada (ATR iD7), el ángulo de incidencia fue de 45°. Los espectros se registraron en modo absorbancia, en escala de 650-4000 cm^{-1} , con una resolución de 4 cm^{-1} y 64 scans, a temperatura controlada (25 ± 1 °C). La muestra (100 μL) se colocó en el cristal ATR cuidadosamente para no generar burbujas de aire e inmediatamente se cubrió con su tapa para evitar la evaporación del mezcal (Quintero Arenas et al., 2020).

4.3.3 Análisis de compuestos volátiles por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

La extracción de compuestos se realizó por microextracción en fase sólida (SPME). Un mililitro de muestra se colocó en un vial con tapa de goma y la extracción fue con una fibra de Polydimethylsiloxane/Divinylbenzene/Carboxen 50/30 μm (Supelco®, U.S.A.) mediante inmersión directa durante 1 min. Posteriormente la fibra contenida en el holder se insertó, durante 1 min, en el inyector (programado a 270 °C) del cromatografo de gases (Agilent GC 7860, Santa Clara, Ca., USA). Las inyecciones se aplicaron en modo splitless a razón de 50 mL min^{-1} y la columna empleada fue HP-5ms de 30m x 0.25mm x 0.25 μm (Agilent, Santa Clara, Ca., USA). La temperatura del horno se programó inicialmente a 50 °C durante 1 min, después se incrementó a razón de 7 °C min^{-1} hasta alcanzar los 300 °C y se mantuvo durante 3 min. El cromatógrafo fue acoplado a un espectrómetro de masas (Agilent 5977B, GC-EM, Santa Clara, Ca., USA) y la respuesta del detector en modo ionización de electrones (EI) se generó a 70 Ev y en formato TIC SCAN (Total ion current) de 50 a 650 m/z. El

gas acarreador utilizado fue helio a razón de 1 mL min⁻¹ (Budner et al., 2021; Vera-Guzmán et al., 2018; Vera-Guzmán et al., 2009).

4.3.4 Cuantificación de alcoholes superiores y furfural por cromatografía de gases acoplada a detector de ionización de llama

Se realizó la cuantificación de metanol, alcoholes superiores y furfural en los mezcales mediante cromatografía de gases acoplada a un detector de ionización de llama (GC-FID). Un mililitro de muestra se colocó en un vial con tapa de goma y se transfirieron 0.3 µL al inyector (programado a 180 °C) del cromatografo de gases Tracer 1300 (Thermo Fisher, Italia) en modo de inyección split con una division de flujo de 30 mL min⁻¹. La columna empleada fue SUPELCOWAX®10 de 30m x 0.25mm x 0.25µm (Sigma-Aldrich Co. LLC, St Luis Mo, USA). La temperatura del horno se programó inicialmente a 40 °C durante 4 min, después se establecieron dos rampas de calentamiento, la primera a razón de 5 °C min⁻¹ hasta alcanzar los 100 °C y la segunda a 10 °C min⁻¹ hasta alcanzar los 180 °C. El gas acarreador utilizado fue helio con un flujo de 1 mL min⁻¹ (NMX-V-014-1986). Los estándares empleados para la curva de calibración fueron 2-butanol, propanol, 1-butanol, 3-metil-1-butanol, metanol y furfural (Sigma-Aldrich Co. LLC, St Luis Mo, USA).

4.4 Procesamiento de los datos

4.4.1 Identificación de grupos funcionales por espectroscopía de infrarrojo medio

Los espectros obtenidos mediante FT-MIR se sometieron a una búsqueda de grupos funcionales en el Sistema Informático KnowItAll 2021 (John Wiley Sons, Inc, EUA) y se compararon con la base de datos de la biblioteca spectral Wiley. El parámetro de búsqueda fue una tolerancia del pico de 100 cm⁻¹.

4.4.2 Integración e identificación de compuestos volátiles por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

La integración consiste en localizar los picos en una señal y calcular su tamaño. Es un proceso controlado por parámetros llamados eventos de integración. Los

eventos de integración en esta investigación fueron establecidos por el algoritmo integrador Openlab con un cambio de pendiente de 10 000 y un área de rechazo de 50 000.

El cromatógrafo de gases separa los compuestos volátiles de interés y el espectrómetro de masas se utiliza para identificarlos mediante el patrón único de fragmentación de la molécula (Gujar et al., 2018; Stein, 2012). La biblioteca de espectros de masas NIST 19 (National Institute of Standards and Technology) se utilizó para comparar los espectros experimentales y conocer la identidad de los compuestos presentes. Los reportes se procesaron con las señales que presentaron al menos 0.1 % de área.

4.4.3 Cuantificación de alcoholes superiores y furfural por cromatografía de gases acoplada a detector de ionización de llama

El procesamiento de los cromatogramas se realizó con el software Thermo Xcalibur version 4.0.2 (Thermo Fisher, Italia) empleando el algoritmo de integración de picos ICIS con suavizado de datos de 15 puntos para mejorar la resolución de las señales (Li et al., 2002) y una relación señal ruido (S/N) de 0.5. La curva de calibración externa se construyó con siete puntos (Desde 12.5 a 800 mg L⁻¹)

4.4.4 Análisis estadístico de los datos

Las variables químicas de pH, contenido alcohólico y los datos de alcoholes superiores se analizaron mediante un diseño completamente al azar ($\alpha= 0.05$) para evaluar la significancia de los factores de estudio (Agave, distrito y proceso). La unidad experimental fue de 250 mL de mezcal. Se realizaron comparaciones de medias con la prueba de la diferencia mínima significativa (LSD) y el procesamiento de los datos se realizó con el software SAS version 9.4 (SAS Institute, Cary NC, USA).

También se aplicó análisis estadístico multivariado no supervisado y supervisado con la plataforma Metaboanalyst 5.0 a las matrices de datos proveniente del análisis de FT-MIR y SPME-GC-MS. Las variables que se ingresaron a

Metaboanalyst fueron número de onda y absorbancia para los datos FT-MIR y tiempo de retención y porcentaje de área para los datos de SPME-GC-MS. Se realizó un pre-procesamiento de los datos que consistió de normalización por suma, transformación log y escalamiento automático (autoscaling). Posteriormente se realizó análisis de componentes principales (PCA), análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) y análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales ortogonales (OPLS-DA). Se implementó validación cruzada para PLS-DA y para OPLS-DA se realizaron 100 permutaciones por prueba. Los intervalos de confianza se denotaron por elipses al 95 % de confianza ($\alpha=0.05$) (Chong et al., 2019; Dasenaki et al., 2019; Pang et al., 2021).

Finalmente, los compuestos volátiles identificados por SPME-GC-MS considerados importantes fueron aquellos que presentaron un porcentaje de coincidencia $\geq$ a 70 % de acuerdo con lo reportado en la base de datos NIST. La lista de compuestos y su porcentaje de área se sometieron a análisis multivariado no supervisado mediante componentes principales con el software RStudio Versión 4.1.2. (RStudio PBC, Boston, MA, USA). La variable fue el área de cada compuesto identificado y el criterio de clasificación fue la especie de agave y el origen del mezcal. Se normalizaron los datos (Wilson et al., 2021) y se graficaron dos componentes principales para representar los compuestos que describen a cada mezcal.

4.5 Resultados y discusión

4.5.1 Variables químicas

Los mezcales evaluados (Cuadro 3) fueron elaborados con agaves de las especies *A. angustifolia*, *A. salmiana* y *A. potatorum* mediante procesos ancestrales y artesanales, todos originarios de Oaxaca y San Luis Potosí. El mezcal de *A. angustifolia* del estado de Oaxaca es de las bebidas más conocidas, el de *A. salmiana* es elaborado principalmente en San Luis Potosí y Zacatecas (De León-Rodríguez et al., 2008; Martínez-Aguilar & Peña-Álvarez, 2009). La diversidad de mezcales encontrados en Oaxaca permitió establecer dos clases

denotadas por el distrito donde se elaboraron (Sola de Vega y Tlacolula), sin embargo, esta variabilidad no se considera indicador de falta de calidad, sino un reflejo de particularidades propias y distintivas de cada región mezcalera (Chavez-Parga et al., 2016).

El pH (Cuadro 4) de los mezcales no presentó diferencias significativas ($p > 0.05$) entre las especies empleadas, el origen evaluado y el proceso; el pH como medida indirecta de la acidez de una bebida alcohólica es debido a la presencia de ácidos orgánicos (Thibodeau & Pickering, 2021), estos ácidos son arrastrados durante la destilación junto con el alcohol y su presencia podría tener un efecto negativo en la calidad sensorial de la bebida (Silva et al., 2000), además Russell, (2003) relacionó la longitud de la cadena de carbonos con la impartición de aromas y sabores ácidos o rancios.

Por otro lado, el contenido alcohólico fue mayor para el mezcal elaborado con *A. potatorum* (48.4 % Alc. Vol.), que para este caso es elaborado, en su mayoría, bajo proceso ancestral. El etanol es el principal producto de la fermentación y la cantidad formada depende principalmente del total de azúcares fermentables y de la cuenta inicial de levaduras (Silva et al., 2000). El contenido de etanol puede jugar un papel clave en la percepción sensorial al provocar múltiples sabores y sensaciones quínestésicas (Thibodeau & Pickering, 2021, 2019).

Los mezcales de San Luis Potosí presentaron el menor contenido alcohólico (39.4 % Alc. Vol) junto con las muestras de Tlacolula, Oax. (42.7 % Alc. Vol), en tanto que, las muestras de Villa Sola de Vega, Oax. se caracterizaron por tener el mayor valor (47.5 % Alc. Vol). Las diferencias pueden constatare mediante los espectros de FT-MIR (Figura 17). A pesar de este comportamiento, todas las muestras se encontraron dentro de lo especificado por la NOM-070-SCFI- 2016, la cual establece un contenido de 35 a 55 % Alc. Vol.

Cuadro 4. Contenido alcohólico y pH en mezcales provenientes de Oaxaca y San Luis Potosí, México.

Especie	pH	Contenido alcohólico (%)
<i>A. potatorum</i> (n=4)	4.0a ^z ± 0.3	48.4a ± 0.5
<i>A. angustifolia</i> (n=9)	3.6a ± 0.2	44.5b ± 3.4
<i>A. salmiana</i> (n=2)	4.0a ± 0.5	39.4c ± 0.6

Origen	pH	Contenido alcohólico (%)
Sola de Vega, Oax (n=7)	3.7a ± 0.4	47.5a ± 1.0
Tlacolula, Oax (n=5)	3.7a ± 0.2	42.7b ± 3.6
SLP ^y (n=2)	4.0a ± 0.3	39.4b ± 0.6

Proceso	pH	Contenido alcohólico (%)
Ancestral (n=7)	3.7a ± 0.4	47.5a ± 1.0
Artesanal (n=8)	3.7a ± 0.3	42.5b ± 3.9

^z Valores seguidos por la misma letra dentro de la misma columna no fueron significativamente diferentes ($p > 0.05$) de acuerdo con la prueba de la diferencia mínima significativa.

^y SLP: San Luis Potosí.

4.5.2 Discriminación de mezcales por espectroscopía de infrarrojo medio

Análisis estadístico multivariado de los espectros obtenidos por infrarrojo medio

Los datos de espectroscopía de FT-MIR se emplearon para realizar análisis estadísticos multivariado mediante análisis de componentes principales (PCA), análisis discriminante PLS y análisis discriminante OPLS. El análisis PCA (Figura 13) para el factor especie permitió explicar el 61.2 % de la varianza de los datos en los mezcales de *A. angustifolia*, *A. potatorum* y *A. salmiana*; y el 61.9 % para origen en los mezcales de San Luis Potosí, Sola de Vega y Tlacolula, Oax. Mientras en los mezcales de proceso ancestral y artesanal únicamente se logró explicar el 54.8 %. Lachenmeier et al. (2005) usaron espectroscopía FT-MIR y análisis de componentes principales como una forma de evaluar la autenticidad de una manera eficiente al analizar hasta 30 muestras por hora.

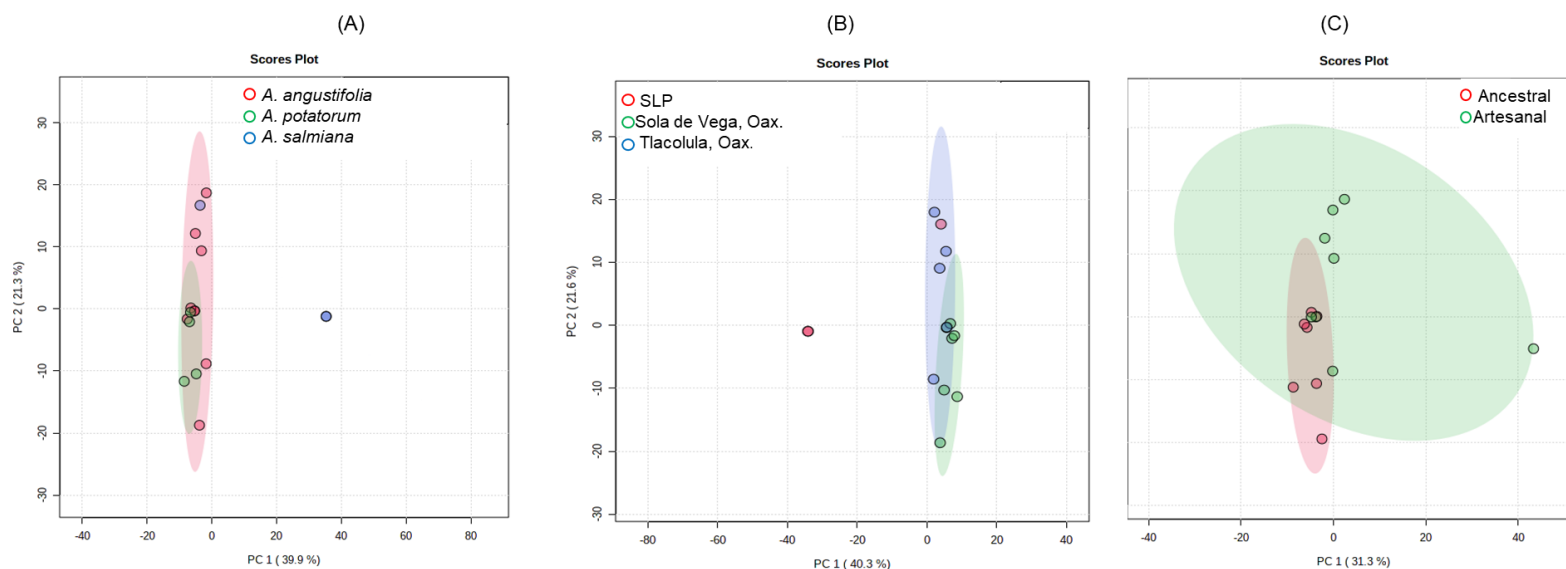


Figura 13. Análisis de componentes principales implementado en la matriz de datos obtenida por FT-MIR para discriminar mezcales por especie: *A. angustifolia*, *A. potatorum* y *A. salmiana* (A); por origen geográfico: San Luis Potosí (SLP), Sola de Vega y Tlacolula, Oax (B) y por proceso: ancestral y artesanal (C). Las regiones denotadas por elipses tienen un nivel de confianza del 95 %.

El análisis PCA es una técnica exploratoria de reducción de datos y algunas veces es difícil que las dimensiones empleadas sean interpretables por lo que otros métodos estadísticos multivariado deben implementarse (Cozzolino et al., 2019; Wilson et al., 2021). Por ello se recurrió al análisis discriminante PLS-DA y OPLS-DA que son de los métodos más utilizados en metabolómica. Un modelo discriminante es válido en función de sus parámetros R^2 (ajuste del modelo), Q^2 (estadístico que valida el modelo) y p-value que establece la significancia del modelo (Szymańska et al., 2012; Worley & Powers, 2016).

El análisis discriminante PLS (Figura 14) a partir de la matriz de datos de FT-MIR permitió discriminar las muestras de mezcal por especie con aproximadamente el 45.5 % ($Q^2=0.18$, $R^2Y=0.48$ y $p\text{-value}=0.50$), por origen geográfico 48.9 % ($Q^2=0.30$, $R^2Y=0.98$ y $p\text{-value}=0.14$) y proceso 44.8 % ($Q^2=0.46$, $R^2Y=0.95$ y $p\text{-value}=1.0$). Sin embargo, los modelos del análisis PLS-DA fueron no significativos ($p\text{-value} > 0.05$). Los bajos porcentajes de discriminación aunados a la no validez del modelo pueden deberse a la falta de transformación espectral antes del análisis multivariado, dado que (Formosa et al., 2020) recomiendan remover artefactos espectrales como desplazamientos de línea base, esto es con la finalidad de revelar información oculta y enfatizar variaciones espectrales pequeñas.

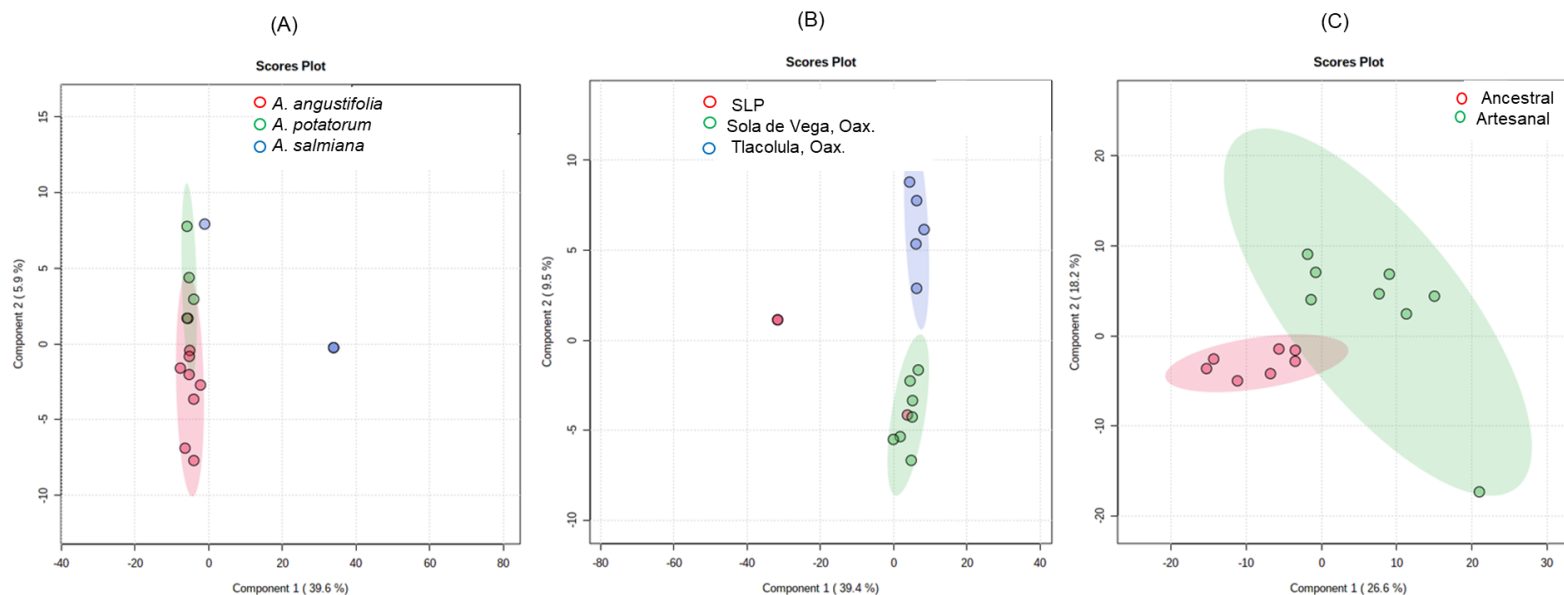


Figura 14. Análisis discriminante PLS implementado en la matriz de datos obtenida por FT-MIR- para discriminar mezcales por especie: *A. angustifolia*, *A. potatorum* y *A. salmiana* (A), por origen geográfico: San Luis Potosí: SLP, Sola de Vega y Tlacolula, Oax (B) y por proceso: ancestral y artesanal (C). Las regiones denotadas por elipses tienen un nivel de confianza del 95 %.

El análisis discriminante OPLS (Figuras 15 y 16) generó modelos que permitieron discriminar las muestras de mezcal por especie 35 % ($Q^2=-0.04$, $R^2Y=0.993$ y $R^2X=0.66$, $p\text{-value}=0.73$), por origen 39 % ($Q^2=0.588$, $R^2Y=0.995$ y $R^2X=0.69$, $p\text{-value}=0.02$) y por proceso 40 % ($Q^2=0.573$, $R^2Y=0.931$ y $R^2X=0.59$, $p\text{-value}<0.01$). La significancia del modelo fue para los factores origen y proceso ($p\text{-value}= 0.02$ y <0.01 respectivamente). A pesar de los bajos valores de explicación del análisis OPLS, es rescatable el modelo para proceso puesto que se logró explicar el 40 % con un valor de $Q^2=0.573$, algo que con la matriz de datos de resonancia magnética nuclear (Figura 9) únicamente se obtuvo un valor de $Q^2=0.178$. Por esto, el uso combinado de técnicas instrumentales debería ser implementado para lograr la máxima discriminación posible; tal es el caso del estudio realizado por Lee et al., (2014) en el que lograron discriminar el origen de dos plantas medicinales de China y Japón (*G. elata* y *R. glutinosa*) mediante espectroscopía de FTIR, cromatografía de líquidos acoplada a espectroscopía de masas (LC-MS) y cromatografía GC-MS con análisis discriminante OPLS.

Identificación de grupos funcionales

El análisis de espectroscopía de FT-MIR fue llevado a cabo con el objetivo de realizar un análisis exploratorio de los grupos funcionales correspondientes a diferentes compuestos que podrían estar presentes en los mezcales. El Cuadro 5 indica la presencia de dos grupos alcoholes identificados como $R-CH_2-OH$ y $Ph-CH_2-OH$, sus bandas de absorción de 3000 a 3700 cm^{-1} se pueden observar en la Figura 17. Los compuestos identificados en la biblioteca espectral Wiley® fueron 2-metilbutano-1,3-diol (probabilidad de 78.90 %) y 1,2,4 butanotriol (probabilidad de 84%). Quintero-Arenas et al. (2020) asoció la banda de 3000 a 3650 a la presencia de enlaces $O-H$ de moléculas como agua y etanol. El 3-buten-1,2-diol se identificó con un 77.50 % y se clasificó como alqueno.

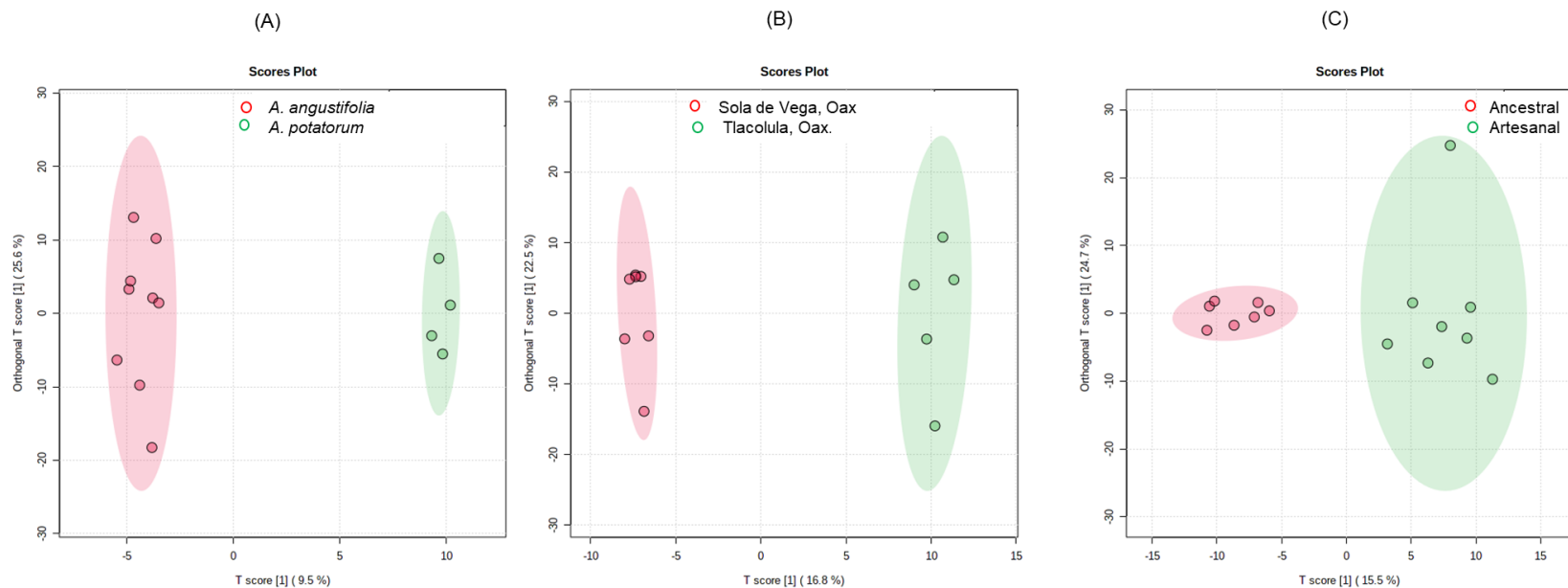


Figura 15. Análisis discriminante OPLS implementado en la matriz de datos obtenida por FT-MIR para discriminar mezcales por especie: *A. angustifolia* y *A. potatorum* (A), por origen geográfico: Sola de Vega y Tlacolula, Oax (B) y por proceso: ancestral y artesanal (C). Las regiones denotadas por elipses tienen un nivel de confianza del 95 %.

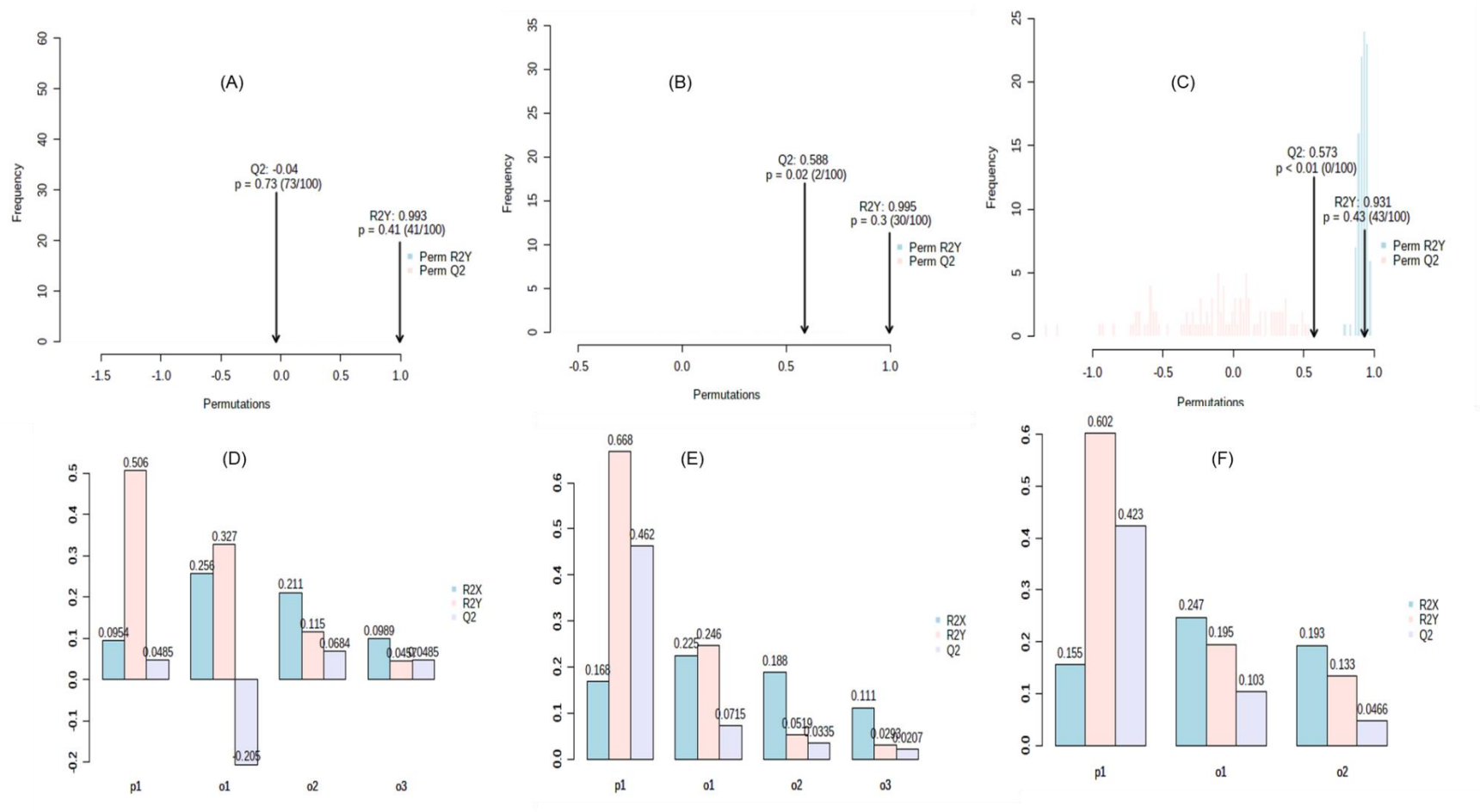


Figura 16. Parámetros del modelo OPLS-DA implementado en la matriz de datos obtenida por FT-MIR para discriminar mezclas por especie: *A. angustifolia* y *A. potatorum* (A y D), por origen geográfico: Sola de Vega y Tlacolula, Oax (B y E) y por proceso: ancestral y artesanal (C y F).

El grupo C=N-OH perteneciente a la clase oxima presenta un número de onda de 1600-1700 cm^{-1} para el enlace C=N, 920-950 cm^{-1} para el enlace N-O y la banda típica del O-H de 3100-3300 cm^{-1} . A nuestro entender no se ha reportado este compuesto en mezcal. Las oximas se forman cuando los aldehídos o cetonas reaccionan con compuestos nitrogenados y su presencia en alimentos es asociada con el tratamiento térmico al que son sometidos (Dursun et al., 2017).

Por otro lado, la señal a 880 cm^{-1} se atribuye a vibraciones de enlaces C-H de compuestos aromáticos como furfural que se forma por reacción de Maillard durante la cocción del agave (Mancilla-Margalli & López, 2002). El comportamiento de los espectros (Figura 17) por la presencia de grupos funcionales podría indicar diferencias en la composición química entre los mezcales elaborados con una especie de agave en particular. Diferencias notables se observan entre el espectro del mezcal elaborado con *A. salmiana* respecto a los otros dos. En mezcal de *A. salmiana* proveniente de San Luis Potosí también se identificó geraniol con una probabilidad del 72.21 %. El geraniol es un monoterpeno producto de la fermentación de levaduras del género *Saccharomyces* (Gamero et al., 2011).

4.5.3 Compuestos volátiles identificados por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

Análisis estadístico multivariado de la matriz de datos

Los datos generados del análisis de SPME-GC-MS se sometieron a rutinas de análisis multivariado para discriminación por especie, origen geográfico y proceso mediante análisis de componentes principales (PCA), análisis discriminante PLS y análisis discriminante OPLS. El análisis PCA (Figura 18) de los mezcales explicó el 44 % de la varianza para los factores especie y proceso, y para el factor origen se obtuvo una explicación del 46 %. En la Figura 18A se observa que los mezcales de *A. salmiana* se separan del resto de las muestras, lo cual coincide con lo descrito en las Figuras 14A y 17 donde el comportamiento espectral mediante FT-MIR separa el mezcal de esta especie de las otras.

Cuadro 5. Grupos funcionales identificados en mezcales provenientes de Oaxaca y San Luis Potosí, México.

Clase	Grupo funcional
Alcohol	R-CH ₂ -OH
Alcohol	Ph-CHR-OH
Alqueno	RCH=CHR
Peróxido	R-O-O-R
Oxima	C=N-OH
Aldehído	R-CHO
Éster	R-COOR

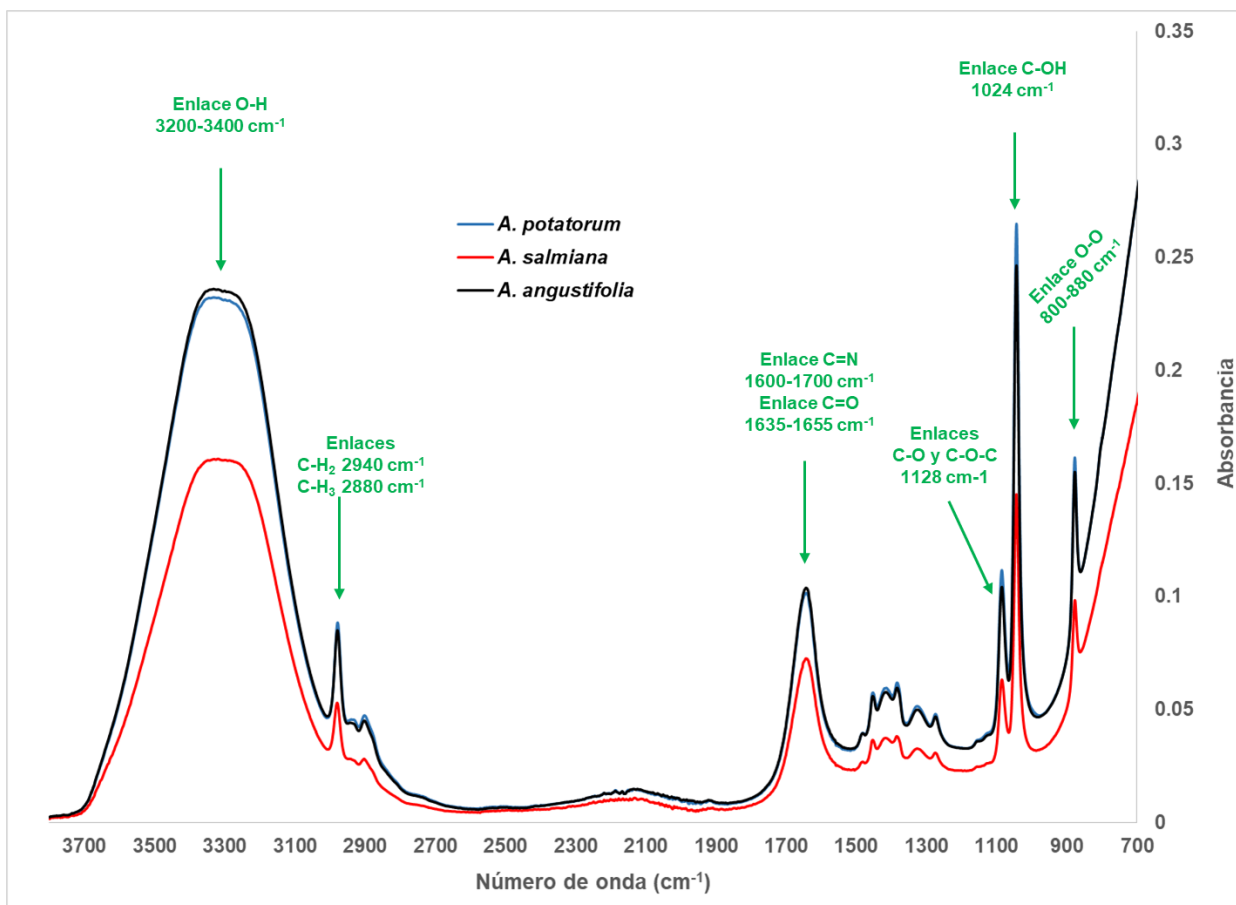


Figura 17. Espectroscopía de infrarrojo por FT-MIR en mezcales provenientes de Oaxaca y San Luis Potosí, México. Espectro promedio con n=4 (*A. potatorum*), n=2 (*A. salmiana*) y n=9 (*A. angustifolia*).

El análisis por PLS (Figura 19) permitió discriminar los mezcales por especie con un 42 % ($Q^2=0.48$, $R^2Y=0.90$ y $p\text{-value}=0.03$), por origen 38 % ($Q^2=0.17$, $R^2Y=0.86$ y $p\text{-value}=0.60$) y por proceso 40 % ($Q^2=0.05$, $R^2Y=0.50$ y $p\text{-value}=0.41$). El modelo PLS entre *A. angustifolia* y *A. potatorum* fue significativo ($p\text{-value} = 0.03$), por tanto, se puede observar las muestras agrupadas conforme a la especie con que fueron elaboradas.

El análisis por OPLS (Figuras 20 y 21) permitió discriminar los mezcales de *A. angustifolia* de los de *A. potatorum* con un 41 % ($Q^2=-0.03$, $R^2Y=0.99$ y $R^2X=0.49$, $p\text{-value}=0.71$); los de Sola de Vega de los de Tlacolula con un 44 % ($Q^2=0.21$, $R^2Y=0.99$ y $R^2X=0.53$, $p\text{-value}=0.38$) y los artesanales de los ancestrales con 39 % ($Q^2=0.02$, $R^2Y=0.99$ y $R^2X=0.45$, $p\text{-value}=0.64$). El análisis OPLS-DA no mostró significancia en los modelos ($p\text{-value}$ es mayor que 0.05) para los tres factores evaluados a pesar de ser un método supervisado.

Identificación de compuestos volátiles

En el Cuadro 6 se puede observar que los mezcales provenientes de *A. angustifolia* y de *A. potatorum* presentaron la mayor cantidad de los compuestos identificados (13 y 12 respectivamente). Los metabolitos identificados fueron alcoholes como 2,3-butanodiol; alcohol fenetílico y carbitol. Ésteres como acetato de isoamilo; ácido octanoico, etil éster; ácido decanoico, etil éster; ácido dodecanoico, etil éster y ácido hexadecanoico etil éster. Aldehídos como 5-metilfurfural; 5-hidroximetilfurfural y ácido 4-hexil-2,5-dioxofuran-3-acético. Fenoles como 2,4,6-tris (1-feniletil) fenol; 2,4-bis (1-feniletil) fenol y bisfenol A. Otros compuestos identificados fueron acetilcitrato de tributilo, 2-acetilpirrol y oxima metoxifenilo.

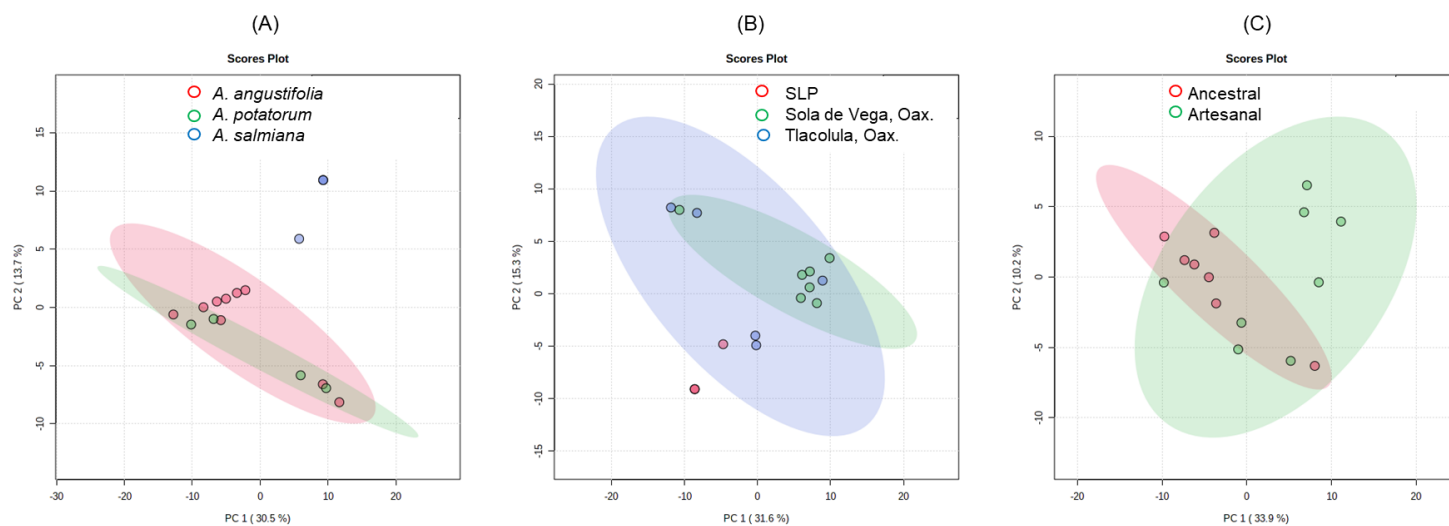


Figura 18. Análisis de componentes principales implementado en la matriz de datos obtenida por GC-MS para discriminar mezcales por especie: *A. angustifolia*, *A. potatorum* y *A. salmiana* (A), por origen: procedentes de San Luis Potosí (SLP), Sola de Vega y Tlacolula, Oax. (B) y por proceso: ancestral y artesanal (C). Las regiones denotadas por elipses tienen un nivel de confianza del 95 %.

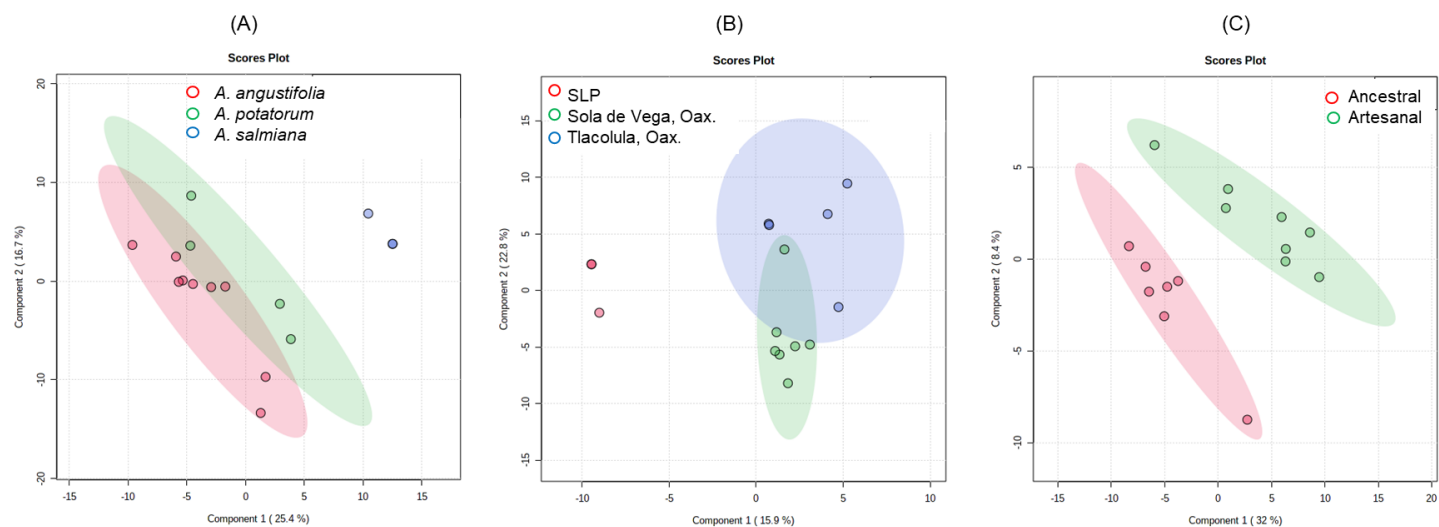


Figura 19. Análisis discriminante por PLS implementado en la matriz de datos obtenida por GC-MS para discriminar mezcales por especie: *A. angustifolia*, *A. potatorum* y *A. salmiana* (A), por origen geográfico: San Luis Potosí (SLP), Sola de Vega y Tlacolula, Oax (B) y por proceso: ancestral y artesanal (C). Las regiones denotadas por elipses tienen un nivel de confianza del 95 %.

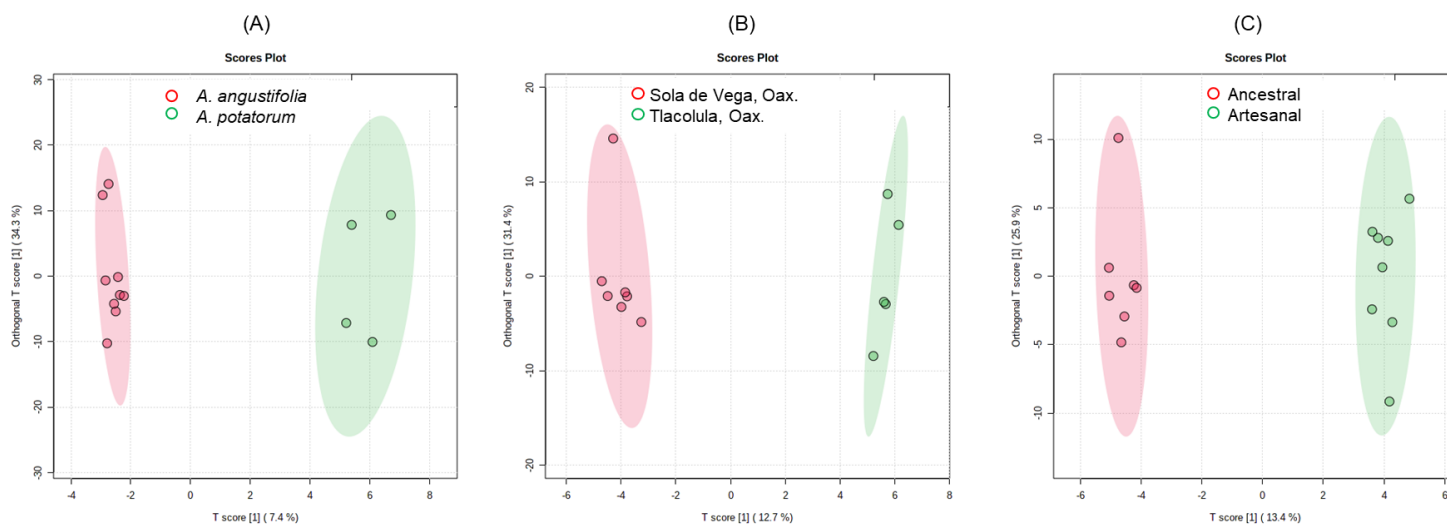


Figura 20. Análisis discriminante OPLS implementado en la matriz de datos obtenida por GC-MS para discriminar mezcales por especie: *A. angustifolia* y *A. potatorum* (A); por origen geográfico: Sola de Vega y Tlacolula, Oax. (B) y por proceso: ancestral y artesanal (C). Las regiones denotadas por elipses tienen un nivel de confianza del 95%.

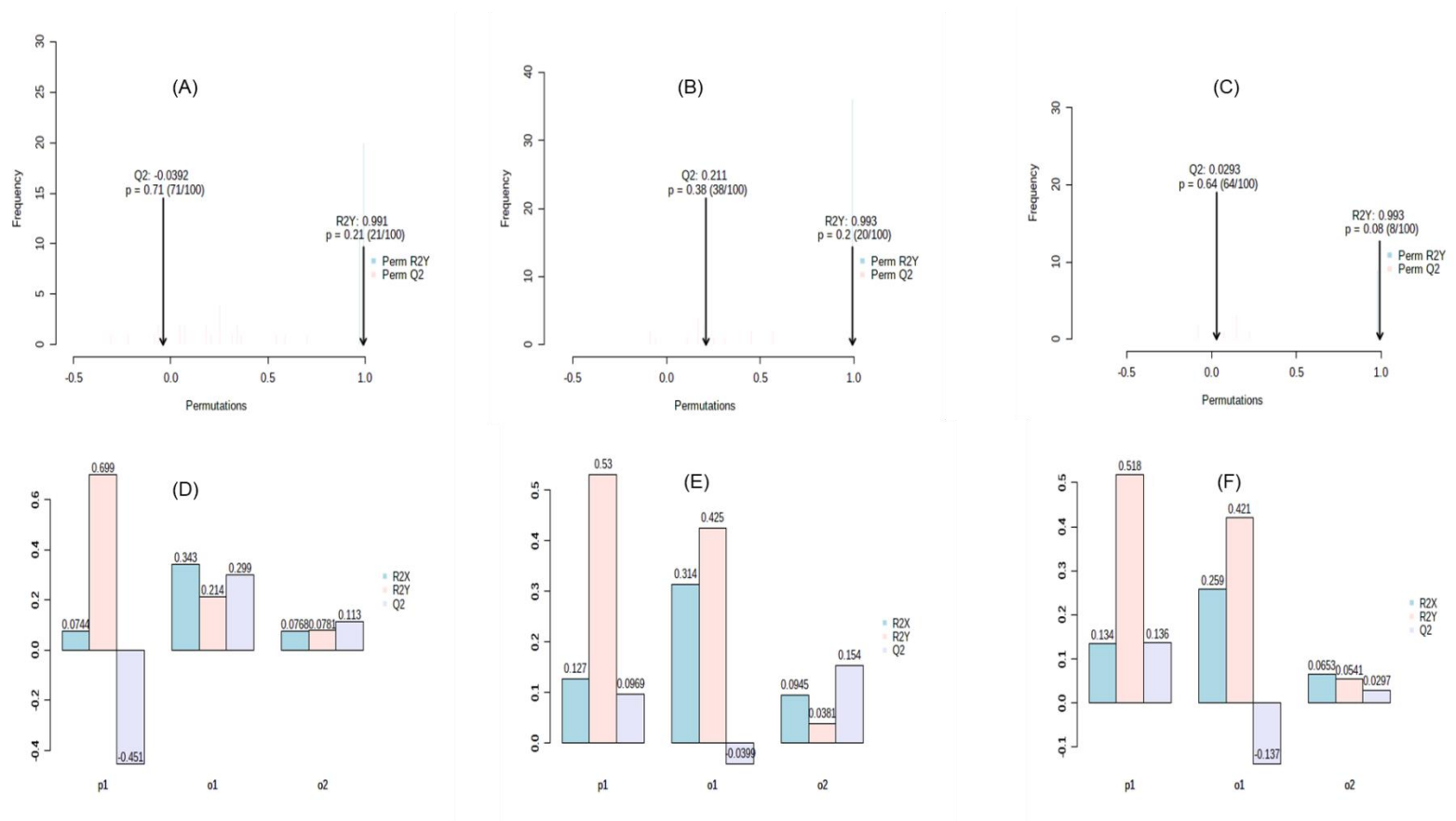


Figura 21. Parámetros del modelo OPLS-DA implementado en la matriz de datos obtenida por GC-MS para discriminar mezclas por especie: *A. angustifolia* y *A. potatorum* (A y D), por origen geográfico: Sola de Vega y Tlacolula, Oax. (B y E) y por proceso: ancestral y artesanal (C y F).

La presencia de alcoholes está directamente relacionada con el proceso de elaboración del mezcal, específicamente, con la fermentación (Verdugo-Valdez et al., 2011). Durante la fermentación, las células de las levaduras poseen las enzimas necesarias para la formación de determinados compuestos, por mencionar, la formación de 2,3-butanodiol a partir del diacetilo (2,3-butanodiona) al final de la fermentación y durante la maduración de las bebidas alcohólicas (Ferreira & Guido, 2018; Stewart, 2017).

Los ésteres proporcionan notas aromáticas frutales y florales a las bebidas alcohólicas (Botello-Álvarez et al., 2007; Ferreira & Guido, 2018). Por ejemplo, se ha reportado que el acetato de isoamilo proporciona notas frutales como banana y manzana (Russell, 2003). Por otro lado, los compuestos fenólicos son generados durante un proceso de maduración de bebidas alcohólicas en barricas de madera; la presencia de fenoles en el mezcal puede ser utilizado como marcador para discriminar un mezcal añejado de uno joven (Magaña-Alcazar et al., 2015). En cuanto al bisfenol A, es un compuesto contaminante y su presencia ha sido reportada en cerveza enlatada por lo que éste no solo forma parte de contenedores plásticos sino también de recubrimientos empleados en envases de alimentos (Fasano, 2012; He & Bayen, 2020)

Cuadro 6. Compuestos identificados mediante GC-MS en mezcales *A. angustifolia*; *A. salmiana* y *A. potatorum* provenientes de Oaxaca y San Luis Potosí, México.

Compuesto	Número CAS ^z	Mezcal A ^y	Mezcal B ^x	Mezcal C ^w
Alcoholes				
2,3-Butanodiol (tr: 3.8 min)	513-85-9	* ^v		
Carbitol (tr: 7.6 min)	111-90-0	*		
Alcohol fenetílico (tr: 9.6 min)	60-12-8	*		*
Ácido carboxílico				
Acetilcittrato de tributilo (28.1 min)	77-90-7		*	*
Ésteres				
Acetato de isoamilo (tr: 4.8 min)	123-92-2	*		
Ácido octanoico, etil éster (tr: 11.2 min)	106-32-1	*		*
Ácido decanoico, etil éster (tr: 15.1 min)	110-38-3	*		*
Ácido dodecanoico, etil éster (tr: 18.6 min)	106-33-2	*		
Ácido hexadecanoico, etil éster (tr: 24.6 min)	628-97-7	*		*
Aldehídos				
5-Metilfurfural (tr: 6.3 min)	620-02-0	*		*
5-Hidroximetilfurfural (tr: 11.9 min)	67-47-0			*
Ácido 4-hexil-2,5-dioxofuran-3-acético (tr: 16.8 min)	39212-21-0			*

Continuación Cuadro 6

Compuesto	Número CAS ¹	Mezcal A	Mezcal B	Mezcal C
Imina				
Oxima, metoxifenilo (tr: 5.7 min)	-	*	*	*
Fenoles				
Bisfenol A (tr: 25.3 min)	80-05-7	*		
2,4-bis (1-feniletil) fenol (tr: 30.7 min)	2769-94-0	*	*	*
2,4,6-tris (1-feniletil) fenol (tr: 36.5 min)	18254-13-2			*
Pirrol				
2-Acetilpirrol (tr: 8.5 min)	1072-83-9	*	*	*

^Z Identificador numérico CAS (Chemicals Abstract Service).

^Y Mezcal A: *A. angustifolia*.

^X mezcal B: *A. salmiana*.

^W mezcal C: *A. potatorum*.

^V Indica que el compuesto estuvo presente en el mezcal referido.

Referente al compuesto oxima metoxifenilo ha sido identificado en leche ultrapasteurizada (UHT), pasteurizada y reconstituida; además de queso elaborado con leche reconstituida (Dursun et al., 2017; Solano-López et al., 2005; Wang et al., 2015; Wang et al., 2012; Yue et al., 2015). Todos los productos citados tienen en común el empleo de tratamiento térmico durante su procesamiento como en la elaboración del mezcal.

Los compuestos volátiles identificados por SPME-GC-MS fueron sometidos a análisis estadístico multivariado para explicar y asociarlos con la especie de agave empleada y al origen geográfico de las muestras. En este sentido, en la Figura 22 se observa que el mezcal de *A. angustifolia* fue descrito por los ésteres acetato de isoamilo y ácido hexadecanoico, etil éster; 2-acetilpirrol; 2,3-butanodiol y bisfenol A, en tanto que, *A. potatorum* fue descrito por 5-metilfurfural; 5-hidroximetilfurfural; ácido octanoico, etil éster; alcohol fenetílico y 2,4,6-tris (1-feniletil) fenol y, finalmente, el mezcal de *A. salmiana* por acetilcitrato de tributilo y 2,4-bis (1-feniletil) fenol. En tanto que, para el factor origen geográfico (Figura 23), el mezcal de Tlacolula, Oax. quedó descrito por 5-metil-furfural, ácido-3-furanacético y acetato de isoamilo; el mezcal de Sola de Vega, Oaxaca por alcohol fenetílico, ácido hexadecanoico, etil éster y carbitol.

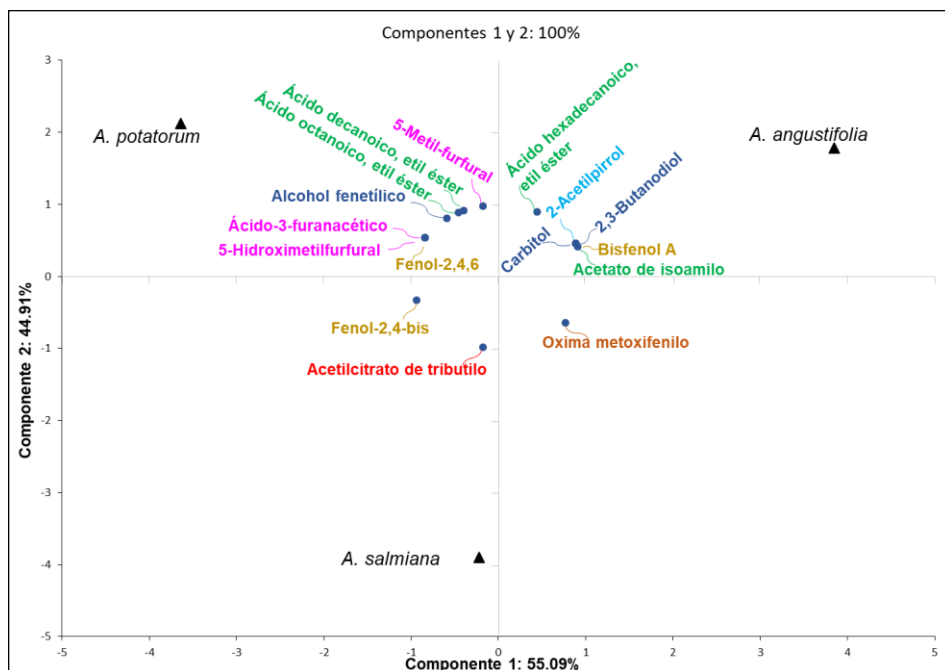


Figura 22. Análisis de componentes principales de la matriz de datos obtenida por GC-MS en mezcal de *A. potatorum*, *A. angustifolia* y *A. salmiana*. Componente principal uno explica el 55.09 % y el componente principal dos el 44.91 %. Fenol-2,4,6 representa 2,4,6-tris (1-feniletil) fenol; Fenol-2,4-bis indica 2,4-bis (1-feniletil) fenol y Ácido-3-furanacético se refiere a Ácido 4-hexil-2,5-dioxofuran-3-acético.

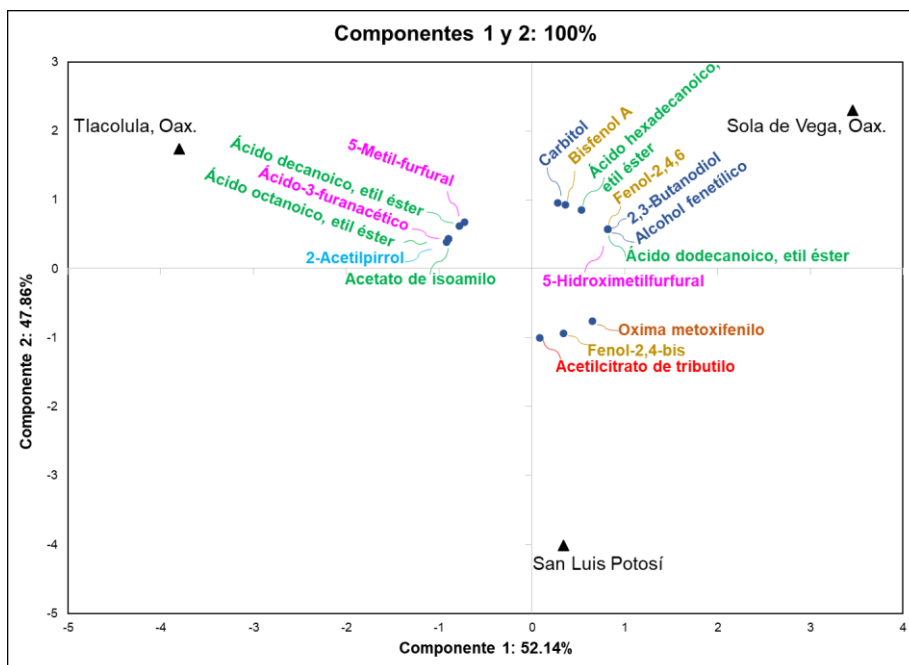


Figura 23. Análisis de componentes principales de la matriz de datos obtenida por GC-MS en mezcal de San Luis Potosí y Villa Sola de Vega y Tlacolula, Oax. Componente principal uno explica el 52.14 % y componente principal dos el 47.86 %. Fenol-2,4,6 representa 2,4,6-tris (1-feniletil) fenol; Fenol-2,4-bis indica 2,4-bis (1-feniletil) fenol y Ácido-3-furanacético se refiere a Ácido 4-hexil-2,5-dioxofuran-3-acético.

4.5.4 Cuantificación alcoholes superiores y furfural en mezcales por cromatografía de gases acoplada a detector de ionización de llama

El contenido de alcoholes superiores y furfural en los mezcales evaluados (Cuadro 7) estuvieron dentro del intervalo de valores que establece la NOM-070-SCFI-2016. Vera Guzmán et al. (2009) también reportaron el cumplimiento de estos compuestos en mezcal elaborado con *A. angustifolia* y *A. potatorum*.

El metanol no es un producto propio de la fermentación alcohólica sino de la degradación de sustancias pécticas por acción de enzimas como pectinmetilesterasa (Cabaroğlu & Yilmaztekin, 2011). Por ello, su presencia debería ser relacionada directamente con la materia prima (Rodríguez Madrera et al., 2006). En este sentido, Pinal et al. (2009) encontraron mayor contenido de metanol en mostos procedentes de piñas de *A. tequilana* Weber con 4 años de edad que en aquellas de 8 años, lo cual infiere que en agaves de mayor edad existen menos grupos metoxil de las pectinas para la producción de metanol.

Cuadro 7. Contenido de alcoholes superiores y furfural (mg/100 mL) cuantificados por-GC-FID en mezcales de *A. angustifolia*; *A. salmiana* y *A. potatorum* originarios de Sola de Vega y Tlacolula, Oax y San Luis Potosí.

Especie	3-Methyl-1-butanol	Propanol	2-Butanol	Furfural	Metanol	1-Butanol
A ^z	52.2	11.6	0.75	0.97	103.3	0.33
B	6.1	28.3	5.5	nd	32.2	0.45
C	48.8	13.7	9.2	0.8	115.1	0.40

^z Especie A: *A. angustifolia*; Especie B: *A. salmiana* ssp *crassispina* y Especie C: *A. potatorum* Zucc

Origen	3-Methylbutanol	Propanol	2-Butanol	Furfural	Metanol	1-Butanol
D ^y	57.2	11.0	0.38	0.88	134.2	0.23
E	42.9	13.7	1.2	1.0	67.1	0.46
F	6.1	28.3	5.5	Nd	32.2	0.45

^y Origen D: Sola de Vega, Oax; Origen E: Tlacolula, Oax, Origen F: San Luis Potosí

Los alcoholes superiores son formados por reacciones de deaminación y descarboxilación de aminoácidos y azúcares durante la fermentación, en la cual influye la presencia de aminoácidos específicos, por ejemplo, el 3-metil-1-butanol (alcohol de isoamilo) puede formarse a partir de leucina (Russell, 2003) y el

propanol a partir de treonina (Stewart, 2017). En general, los alcoholes superiores contribuyen al sabor de las bebidas alcohólicas al intensificar la percepción e impartir una sensación de calentamiento en la boca (He et al., 2014). Además, actúan como precursores en la formación de ésteres activos, referidos de esta manera, por su contribución sensorial a las bebidas alcohólicas (Ferreira & Guido, 2018).

La presencia de los ésteres, como algunos mencionados en el Cuadro 6 se debe a las reacciones entre complejos enzimáticos y diversos tipos de alcoholes (Pires et al., 2014). Por mencionar, la reacción entre Acetyl-CoA y alcohol isoamilo forma acetato de isoamilo (Figura 24A) y la reacción correspondiente entre Octanoil-CoA y etanol forma ácido octanoico, etil éster (Figura 24B).

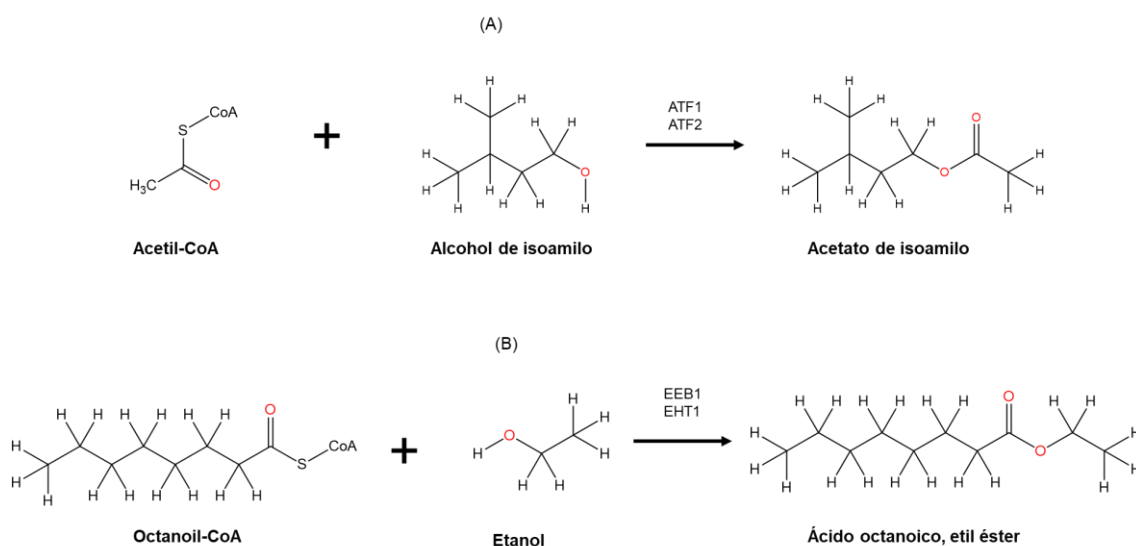


Figura 24. Formación de ésteres a partir de complejos enzimáticos y alcoholes. (A) Formación de acetato de isoamilo. (B) Formación de ácido octanoico, etil éster.

CoA significa Coenzima A y los códigos ATF1, ATF2, EEB1, EHT1 representan los genes que participan durante la formación de los ésteres referidos.

La presencia de furanos en bebidas a base de agave se debe a la hidrólisis de la inulina durante la etapa de cocción de las piñas (Flores, et al., 2009; Quintero Arenas et al., 2020). Aunque Ebeler et al. (2000) encontraron que estos compuestos se formaron durante la destilación en alambique a causa de las

temperaturas empleadas, por otro lado, Medina-Valtierra et al. (2011) atribuyeron los valores de furfural a las especies de agave y a los procesos artesanales empleados para la manufactura del mezcal.

Las Figuras 25 y 26 muestran el análisis de componentes principales por especie y origen de los alcoholes superiores, furfural, pH y etanol (Contenido alcohólico) de los mezcales. Para el factor especie (Figura 25), el propanol es un alcohol superior que describe al mezcal de *A. salmiana*, por otro lado, el metanol, etanol (Contenido alcohólico), furfural y 3-metil-1-butanol describen al mezcal de *A. potatorum*. Mientras tanto, los dos butanoles y el pH se ubicaron totalmente opuestos a *A. angustifolia* por lo que se infiere que los bajos valores de las tres variables podrían estar definiendo a este mezcal. Respecto al factor origen geográfico, el mezcal de San Luis Potosí quedó definido por 1-butanol, propanol y pH; los mezcales de Sola de Vega, Oax. por metanol y etanol (Contenido alcohólico) en tanto que los de Tlacolula, Oax. por furfural y 3-metil-1-butanol.

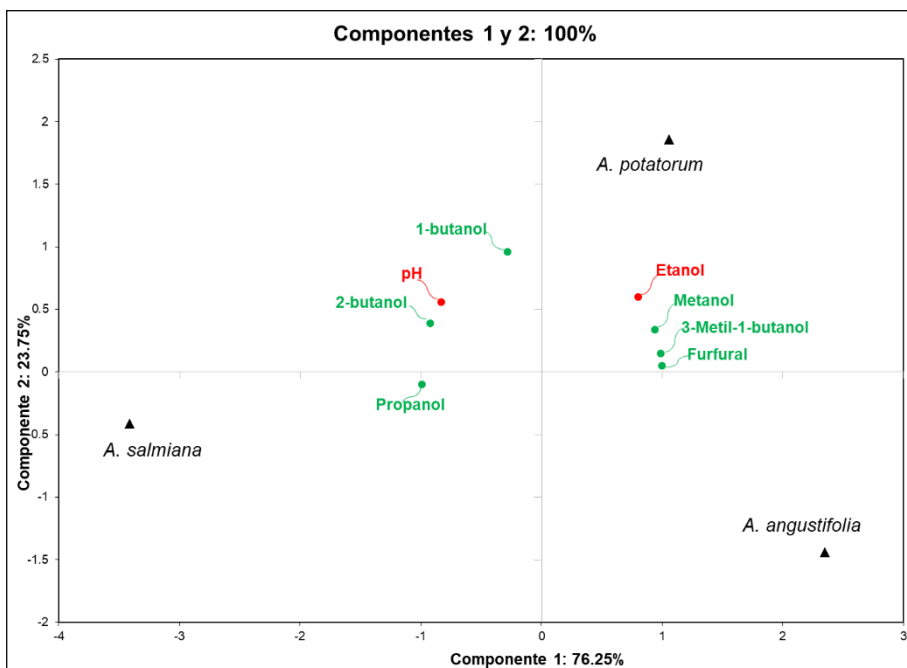


Figura 25. Análisis de componentes principales de la matriz de datos obtenida por GC-FID en mezcal de *A. potatorum*, *A. angustifolia* y *A. salmiana*. Componente principal uno explica el 76.25 % y componente principal dos el 23.75 %. La variable etanol hace referencia al contenido alcohólico (% Alc. Vol).

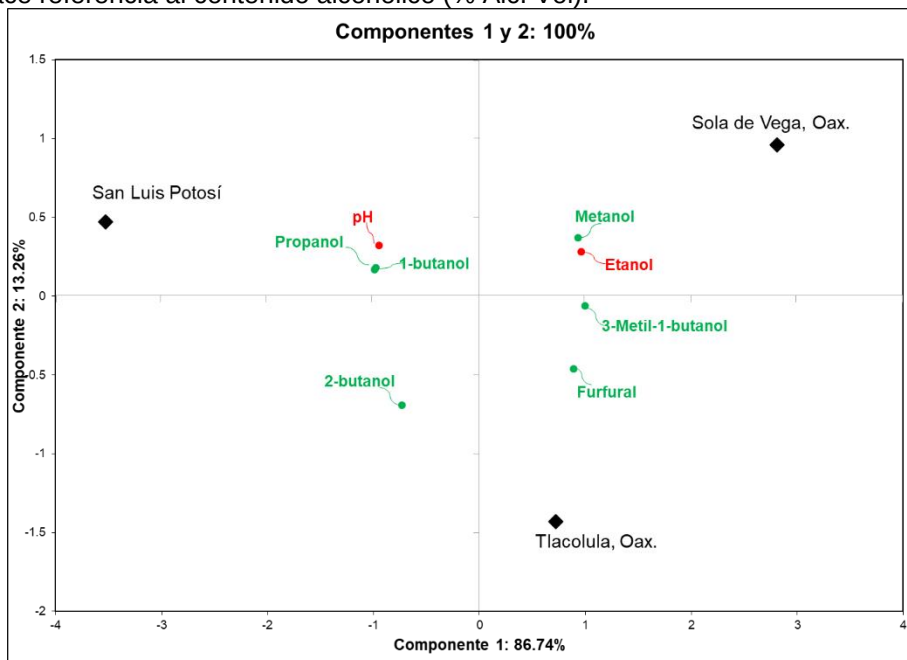


Figura 26. Análisis de componentes principales de la matriz de datos obtenida por GC-FID en mezcal de San Luis Potosí y Villa Sola de Vega y Tlacolula, Oax. Componente principal uno explica el 86.74 % y componente principal dos el 13.26 %. La variable etanol hace referencia al contenido alcohólico (% Alc. Vol).

4.6 Conclusiones

Se determinó el contenido de alcoholes superiores en los mezcales y se encontró que todos los valores están dentro de lo establecido por la NOM-070-SCFI-2016. Además, los mezcales elaborados con *A. potatorum* y *A. angustifolia* (48.4 y 44.6 % Alc. Vol) presentaron mayor contenido alcohólico ($p < 0.05$) que el mezcal de *A. salmiana* (39.4 % Alc. Vol). La espectroscopía por FT-MIR permitió asociar la vibración intramolecular con los grupos funcionales de los compuestos presentes en el mezcal y que posteriormente fueron identificados por cromatografía de gases (SPME-GC-MS). El modelo discriminante OPLS-DA en mezcal con matriz de datos por FT-MIR fue significativo para el factor origen ($Q^2=0.58$, $R^2Y=0.99$ y $p\text{-value}=0.02$) y para proceso ($Q^2=0.57$, $R^2Y=0.93$ y $p\text{-value}=0.01$). El modelo discriminante PLS-DA con matriz de datos por SPME-GC-MS fue significativo para el factor especie ($Q^2=0.48$, $R^2Y=0.90$ y $p\text{-value}=0.03$). Los compuestos identificados por SPME-GC-MS correspondieron a alcoholes, aldehídos y ésteres. El compuesto oxima metoxifenilo no se ha reportado anteriormente en mezcal y se infiere que su presencia es por el tratamiento térmico al que se somete la materia prima durante el proceso. Finalmente, la combinación de técnicas analíticas juega un papel importante en metabolómica, puesto que ayuda a correlacionar la información encontrada. Por tanto, se puede decir que el mezcal elaborado con *A. potatorum* quedó definido por los compuestos: 5-hidroximetilfurfural; 5-metilfurfural; furfural; alcohol fenético; ácido decanoico, etil éster; metanol; etanol (contenido alcohólico) y 3-metil-1-butanol, en tanto, el mezcal de *A. angustifolia* se caracterizó por: acetato de isoamilo; ácido hexadecanoico, etil éster; 2,3-butanodiol; bisfenol A; bajos valores de 1-butanol y 2-butanol y bajo pH. Mientras que el mezcal de *A. salmiana* se caracterizó por: acetilcitrato de tributilo y propanol.

4.7 Literatura citada

Ali, K., Maltese, F., Toepfer, R., Choi, Y. H., & Verpoorte, R. (2011). Metabolic characterization of Palatinate German white wines according to sensory attributes, varieties, and vintages using NMR spectroscopy and multivariate data analyses. *Journal of Biomolecular NMR*, 49(3–4), 255–266.

<https://doi.org/10.1007/s10858-011-9487-3>

- Botello-Álvarez, J. E., Estrada-Baltazar, A., Jiménez-Islas, H., Rico-Martínez, R., Navarrete-Bolaños, J. L., Cárdenas-Manríquez, M., & Molina-Guerrero, J. A. (2007). Compuestos volátiles en el mezcal. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 6(1), 41–50. Retrieved from <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=62060106>
- Briandet, R., Kemsley, E. K., & Wilson, R. H. (1996). Discrimination of Arabica and Robusta in Instant Coffee by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Chemometrics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(1), 170–174. <https://doi.org/10.1021/jf950305a>
- Budner, D., Carr, J., Serafini, B., Tucker, S., Dieckman-Meyer, E., Bell, L., & Thompson-Witrick, K. A. (2021). Statistical Significant Differences between Aroma Profiles of Beer Brewed from Sorghum. *Beverages*, 7(3), 56. <https://doi.org/10.3390/beverages7030056>
- Cabaroglu, T., & Yilmaztekin, M. (2011). Methanol and Major Volatile Compounds of Turkish Raki and Effect of Distillate Source. *Journal of the Institute of Brewing*, 117(1), 98–105. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2011.tb00449.x>
- Castro-Marin, A., Baris, F., Romanini, E., Lambri, M., Montevecchi, G., & Chinnici, F. (2021). Physico-Chemical and Sensory Characterization of a Fruit Beer Obtained with the Addition of Cv. Lambrusco Grapes Must. *Beverages*, 7(2), 34. <https://doi.org/10.3390/beverages7020034>
- Chavez-Parga, M. D. C., Pérez Hernández, E., & González Hernández, J. C. (2016). Revisión del agave y el mezcal. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 18(1). <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v18n1.49552>
- Chong, J., Wishart, D. S., & Xia, J. (2019). Using MetaboAnalyst 4.0 for Comprehensive and Integrative Metabolomics Data Analysis. *Current Protocols in Bioinformatics*, 68(1). <https://doi.org/10.1002/cpbi.86>
- Cozzolino, D., Power, A., & Chapman, J. (2019). Interpreting and Reporting Principal Component Analysis in Food Science Analysis and Beyond. *Food Analytical Methods*, 12(11), 2469–2473. <https://doi.org/10.1007/s12161-019->

- Danezis, G. P., Tsagkaris, A. S., Brusic, V., & Georgiou, C. A. (2016). Food authentication: state of the art and prospects. *Current Opinion in Food Science*, 10, 22–31. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2016.07.003>
- Dasenaki, M. E., Drakopoulou, S. K., Aalizadeh, R., & Thomaidis, N. S. (2019). Targeted and Untargeted Metabolomics as an Enhanced Tool for the Detection of Pomegranate Juice Adulteration. *Foods*, 8(6), 212. <https://doi.org/10.3390/foods8060212>
- De León-Rodríguez, A., Escalante-Minakata, P., Jiménez-García, M. I., Ordoñez-Acevedo, L. G., Flores, J. L. F., & de la Rosa, A. P. B. (2008). Characterization of Volatile Compounds from Ethnic Agave Alcoholic Beverages by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Food Technology and Biotechnology*, 46, 448–455.
- Dursun, A., Güler, Z., & Şekerli, Y. E. (2017). Characterization of volatile compounds and organic acids in ultra-high-temperature milk packaged in tetra brik cartons. *International Journal of Food Properties*, 20(7), 1511–1521. <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1213280>
- Ebeler, S. E., Terrien, M. B., & Butzke, C. E. (2000). Analysis of brandy aroma by solid-phase microextraction and liquid-liquid extraction. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(5), 625–630. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(200004\)80:5<625::AID-JSFA584>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(200004)80:5<625::AID-JSFA584>3.0.CO;2-5)
- Escalante-Minakata, P., Barba De La Rosa, A. P., Santos, L., & De León-Rodríguez, A. (2012). Aspectos Químicos y Moleculares del Proceso de Producción del Mezcal. *BioTecnología*, 16(1).
- Fasano, E., Bono-Blay, F., Cirillo, T., Montuori, P., & Lacorte, S. (2012). Migration of phthalates, alkylphenols, bisphenol A and di(2-ethylhexyl)adipate from food packaging. *Food Control*, 27(1), 132–138. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.03.005>
- Ferreira, I., & Guido, L. (2018). Impact of Wort Amino Acids on Beer Flavour: A Review. *Fermentation*, 4(2), 23.

<https://doi.org/10.3390/fermentation4020023>

- Flores, C. R., Figueroa, J. A. L., Wrobel, K., & Wrobel, K. (2009). ICP-MS multi-element profiles and HPLC determination of furanic compounds in commercial tequila. *European Food Research and Technology*, 228(6), 951–958. <https://doi.org/10.1007/s00217-009-1010-7>
- Formosa, J. P., Lia, F., Mifsud, D., & Farrugia, C. (2020). Application of ATR-FT-MIR for Tracing the Geographical Origin of Honey Produced in the Maltese Islands. *Foods*, 9(6), 710. <https://doi.org/10.3390/foods9060710>
- Gamero, A., Manzanares, P., Querol, A., & Belloch, C. (2011). Monoterpene alcohols release and bioconversion by *Saccharomyces* species and hybrids. *International Journal of Food Microbiology*, 145(1), 92–97. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.034>
- Gil, A. M., Duarte, I. F., Delgadillo, I., Colquhoun, I. J., Casuscelli, F., Humpfer, E., & Spraul, M. (2000). Study of the Compositional Changes of Mango during Ripening by Use of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(5), 1524–1536. <https://doi.org/10.1021/jf9911287>
- Godelmann, R., Fang, F., Humpfer, E., Schütz, B., Bansbach, M., Schäfer, H., & Spraul, M. (2013). Targeted and Nontargeted Wine Analysis by ¹H NMR Spectroscopy Combined with Multivariate Statistical Analysis. Differentiation of Important Parameters: Grape Variety, Geographical Origin, Year of Vintage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(23), 5610–5619. <https://doi.org/10.1021/jf400800d>
- Gujar, A., Voss, J., Cole, J., Zheng, X., & Cavagnino, D. (2018). Goal To demonstrate the features of the deconvolution plug-in software application for Thermo Scientific TM TraceFinder TM Software, version 4.1. 1–10.
- He, N. X., & Bayen, S. (2020). An overview of chemical contaminants and other undesirable chemicals in alcoholic beverages and strategies for analysis. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(6), 3916–3950. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12649>
- He, Y., Dong, J., Yin, H., Zhao, Y., Chen, R., Wan, X., Chen, P., Hou, X., Liu, J.,

- & Chen, L. (2014). Wort composition and its impact on the flavour-active higher alcohol and ester formation of beer - a review. *Journal of the Institute of Brewing*, 120(3), 157–163. <https://doi.org/10.1002/jib.145>
- Hu, B., Yue, Y., Zhu, Y., Wen, W., Zhang, F., & Hardie, J. W. (2015). Proton Nuclear Magnetic Resonance-Spectroscopic Discrimination of Wines Reflects Genetic Homology of Several Different Grape (*V. vinifera* L.) Cultivars. *PLOS ONE*, 10(12), e0142840. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142840>
- Issa-Issa, H., Lipan, L., Cano-Lamadrid, M., Nemés, A., Corell, M., Calatayud-García, P., Carbonell-Barrachina, Á.A., & López-Lluch, D. (2021). Effect of Aging Vessel (Clay-Tinaja versus Oak Barrel) on the Volatile Composition, Descriptive Sensory Profile, and Consumer Acceptance of Red Wine. *Beverages*, 7(2), 35. <https://doi.org/10.3390/beverages7020035>
- Kirchmayr, M. R., Segura-García, L. E., Lappe-Oliveras, P., Moreno-Terrazas, R., de la Rosa, M., & Gschaedler Mathis, A. (2017). Impact of environmental conditions and process modifications on microbial diversity, fermentation efficiency and chemical profile during the fermentation of Mezcal in Oaxaca. *LWT - Food Science and Technology*, 79, 160–169. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.12.052>
- Lachenmeier, D. W., Richling, E., G. López, M., Frank, W., & Schreier, P. (2005). Multivariate Analysis of FTIR and Ion Chromatographic Data for the Quality Control of Tequila. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 2151–2157. <https://doi.org/10.1021/jf048637f>
- Le Gall, G., Puaud, M., & Colquhoun, I. J. (2001). Discrimination between Orange Juice and Pulp Wash by ^1H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy: Identification of Marker Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(2), 580–588. <https://doi.org/10.1021/jf001046e>
- Lee, D., Lim, D.K., Um, J.A., Lim, C.J., Hong, J.Y., Yoon, Y.A., Ryu, Y., Kim, H.J., Cho, H.J., Park, J., Seo, Y., Kim, K., Lim, J., Kwon, S.W., & Lee, J. (2014). Evaluation of Four Different Analytical Tools to Determine the Regional Origin of *Gastrodia elata* and *Rehmannia glutinosa* on the Basis of Metabolomics

- Study. *Molecules*, 19(5), 6294–6308. <https://doi.org/10.3390/molecules19056294>
- Li, X. N., Liang, Y.-Z., & Chau, F.-T. (2002). Smoothing methods applied to dealing with heteroscedastic noise in GC/MS. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 63(2), 139–153. [https://doi.org/10.1016/S0169-7439\(02\)00040-0](https://doi.org/10.1016/S0169-7439(02)00040-0)
- Magaña-Alcazar, A., Wrobel, K., Elguera, J. C. T., Escobosa, A. R. C., & Wrobel, K. (2015). Determination of Small Phenolic Compounds in Tequila by Liquid Chromatography with Ion Trap Mass Spectrometry Detection. *Food Analytical Methods*, 8(4), 864–872. <https://doi.org/10.1007/s12161-014-9967-7>
- Mancilla-Margalli, N. A., & López, M. G. (2002). Generation of Maillard Compounds from Inulin during the Thermal Processing of *Agave tequilana* Weber Var. azul. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(4), 806–812. <https://doi.org/10.1021/jf0110295>
- Martínez-Aguilar, J., & Peña-Álvarez, A. (2009). Characterization of Five Typical Agave Plants Used To Produce Mezcal through Their Simple Lipid Composition Analysis by Gas Chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(5), 1933–1939. <https://doi.org/10.1021/jf802141d>
- Medina Valtierra, G., Juárez Ciprés, R., & Peña Álvarez, A. (2011). Identification and Quantification of Aldehydes in Mezcal by Solid Phase Microextraction with On-fiber Derivatization-Gas Chromatography Article. In *J. Mex. Chem. Soc* (Vol. 55).
- Minoja, A. P., & Napoli, C. (2014). NMR screening in the quality control of food and nutraceuticals. *Food Research International*, 63, 126–131. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.04.056>
- NMX-V-013-NORMEX-2019. Bebidas Alcohólicas-Determinación del Contenido Alcohólico. Retrieved December 8, 2020, from https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5594809&fecha=11/06/2020
- NMX-V-014-1986. Bebidas Alcohólicas Destiladas. Determinación de Alcoholes

- Superiores. Retrieved December 8, 2020, from <https://www.colpos.mx/bancodenormas/%0Anmexicanas/NMX-V-014-1986.PDF>
- Nolasco-Cancino, H., Santiago-Urbina, J. A., Wachter, C., & Ruíz-Terán, F. (2018). Predominant Yeasts During Artisanal Mezcal Fermentation and Their Capacity to Ferment Maguey Juice. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02900>
- NOM-070-SCFI-2016. Bebidas Alcohólicas-Mezcal-Especificaciones. Retrieved December 7, 2020, from http://www.dof.gob.mx/normasOficiales/6437/seeco11_C/seeco11_C.html
- Pang, Z., Chong, J., Zhou, G., Morais, D.A., Chang, L., Barrette, M., Gauthier, C., Jacques, P., Li, S., & Xia, J. (2021). MetaboAnalyst 5.0: narrowing the gap between raw spectra and functional insights. *Nucleic Acids Research*, 49(W1), W388–W396. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab382>
- Papotti, G., Bertelli, D., Graziosi, R., Maietti, A., Tedeschi, P., Marchetti, A., & Plessi, M. (2015). Traditional balsamic vinegar and balsamic vinegar of Modena analyzed by nuclear magnetic resonance spectroscopy coupled with multivariate data analysis. *LWT - Food Science and Technology*, 60(2), 1017–1024. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2014.10.042>
- Pinal, L., Cornejo, E., Arellano, M., Herrera, E., Nuñez, L., Arrizon, J., & Gschaedler, A. (2009). Effect of Agave tequilana age, cultivation field location and yeast strain on tequila fermentation process. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 36(5), 655–661. <https://doi.org/10.1007/s10295-009-0534-y>
- Pires, E. J., Teixeira, J. A., Brányik, T., & Vicente, A. A. (2014). Yeast: the soul of beer's aroma—a review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(5), 1937–1949. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5470-0>
- Quintero-Arenas, M. A., Meza-Márquez, O. G., Velázquez-Hernández, J. L., Gallardo-Velázquez, T., & Osorio-Revilla, G. (2020). Quantification of adulterants in mezcal by means of FT-MIR and FT-NIR spectroscopy coupled

- to multivariate analysis. *CyTA - Journal of Food*, 18(1), 229–239. <https://doi.org/10.1080/19476337.2020.1740327>
- Rodríguez Madrera, R., Suárez Valles, B., García Hevia, A., García Fernández, O., Fernández Tascón, N., & Mangas Alonso, J. J. (2006). Production and Composition of Cider Spirits Distilled in “Alquitara.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(26), 9992–9997. <https://doi.org/10.1021/jf062316h>
- Russell, I. (2003). Understanding yeast fundamentals. In T. P. L. and D. R. K. K. A. Jacques (Ed.), *The Alcohol textbook* (Nottingham, pp. 85-119.). Nottingham, UK.
- Silva, M. L., Macedo, A. C., & Malcata, F. X. (2000). Review: Steam distilled spirits from fermented grape pomace Revision: Bebidas destiladas obtenidas de la fermentación del orujo de uva. *Food Science and Technology International*, 6(4), 285–300. <https://doi.org/10.1177/108201320000600403>
- Solano-Lopez, C. E., Ji, T., & Alvarez, V. B. (2005). Volatile compounds and chemical changes in ultrapasteurized milk packaged in polyethylene terephthalate containers. *Journal of Food Science*, 70(6), c407–c412. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb11438.x>
- Stein, S. (2012). Mass Spectral Reference Libraries: An Ever-Expanding Resource for Chemical Identification. *Analytical Chemistry*, 84(17), 7274–7282. <https://doi.org/10.1021/ac301205z>
- Stewart, G. (2017). The Production of Secondary Metabolites with Flavour Potential during Brewing and Distilling Wort Fermentations. *Fermentation*, 3(4), 63. <https://doi.org/10.3390/fermentation3040063>
- Szymańska, E., Saccenti, E., Smilde, A. K., & Westerhuis, J. A. (2012). Double-check: validation of diagnostic statistics for PLS-DA models in metabolomics studies. *Metabolomics*, 8(S1), 3–16. <https://doi.org/10.1007/s11306-011-0330-3>
- Tang, H., Ma, J.-K., Chen, L., Jiang, L.-W., Xie, J., Li, P., & He, J. (2018). GC-MS Characterization of Volatile Flavor Compounds in Stinky Tofu Brine by Optimization of Headspace Solid-Phase Microextraction Conditions. *Molecules*, 23(12), 3155. <https://doi.org/10.3390/molecules23123155>

- Tapp, H. S., Defernez, M., & Kemsley, E. K. (2003). FTIR Spectroscopy and Multivariate Analysis Can Distinguish the Geographic Origin of Extra Virgin Olive Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(21), 6110–6115. <https://doi.org/10.1021/jf030232s>
- Thibodeau, M., & Pickering, G. (2021). Perception of Aqueous Ethanol Binary Mixtures Containing Alcohol-Relevant Taste and Chemesthetic Stimuli. *Beverages*, 7(2), 23. <https://doi.org/10.3390/beverages7020023>
- Thibodeau, M., & Pickering, G. J. (2019). The role of taste in alcohol preference, consumption and risk behavior. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(4), 676–692. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1387759>
- Vera-Guzmán, A., Guzmán-Gerónimo, R., López, M., & Chávez-Servia, J. (2018). Volatile Compound Profiles in Mezcal Spirits as Influenced by Agave Species and Production Processes. *Beverages*, 4(1), 9. <https://doi.org/10.3390/beverages4010009>
- Vera-Guzmán, A., Santiago-García, P., & López, M. (2009). Compuestos volátiles aromáticos generados durante la elaboración de Mezcal de Agave angustifolia Y Agave potatorum. In *Artículo Científico Rev. Fitotec. Mex* (Vol. 32).
- Verdugo-Valdez, A., Segura-Garcia, L., Kirchmayr, M., Ramírez-Rodríguez, P., González-Esquinca, A., Coria, R., & Gschaedler-Mathis, A. (2011). Yeast communities associated with artisanal mezcal fermentations from Agave salmiana. *Antonie van Leeuwenhoek*, 100(4), 497–506. <https://doi.org/10.1007/s10482-011-9605-y>
- Villanueva-Rodriguez, S., & Escalona-Buendia, H. (2012). Tequila and mezcal: sensory attributes and sensory evaluation. *Alcoholic Beverages*, 359–378. <https://doi.org/10.1533/9780857095176.3.359>
- Wang, D., Zheng, Y., Liu, Z., Hu, G., & Deng, Y. (2015). Impact of Microfiltration on Particle Size Distribution, Volatile Compounds and Protein Quality of Pasteurized Milk during Shelf Life. *Journal of Food and Nutrition Research*, 3(1), 26–33. <https://doi.org/10.12691/jfnr-3-1-5>
- Wang, W., Zhang, L., & Li, Y. (2012). Production of Volatile Compounds in

- Reconstituted Milk Reduced-Fat Cheese and the Physicochemical Properties as Affected by Exopolysaccharide-Producing Strain. *Molecules*, 17(12), 14393–14408. <https://doi.org/10.3390/molecules171214393>
- Wilson, A., Johnson, J. B., Batley, R., Lal, P., Wakeling, L., & Naiker, M. (2021). Authentication Using Volatile Composition: A Proof-of-Concept Study on the Volatile Profiles of Fourteen Queensland Ciders. *Beverages*, 7(2), 28. <https://doi.org/10.3390/beverages7020028>
- Worley, B., & Powers, R. (2016). PCA as a Practical Indicator of OPLS-DA Model Reliability. *Current Metabolomics*, 4(2), 97–103. <https://doi.org/10.2174/2213235X04666160613122429>
- Yue, J., Zheng, Y., Liu, Z., Deng, Y., Jing, Y., Luo, Y., Yu, W., & Zhao, Y. (2015). Characterization of volatile compounds in microfiltered pasteurized milk using solid-phase microextraction and GC×GC-TOFMS. *International Journal of Food Properties*, 18(10), 2193–2212. <https://doi.org/10.1080/10942912.2014.966389>

△

5. METABOLÓMICA BASADA EN GC-MS DE COMPUESTOS VOLÁTILES EN MEZCALES PARA ESTABLECIMIENTO DE PERFILES ASOCIADOS A PROCESOS DE MANUFACTURA, ORÍGENES GEOGRÁFICOS Y ESPECIES DE AGAVE

Resumen

Se implementó un enfoque basado en metabolómica dirigida y no dirigida para establecer las huellas metabolómicas e identificar los compuestos discriminantes en mezcal, mediante la combinación de microextracción en fase sólida por inmersión directa (DI-SPME) y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), usando análisis estadístico multivariado (MSA). Este trabajo describe la implementación de un método de separación para obtener cromatogramas explotables que pueden ser usados como matriz de datos metabolómicos de GC para caracterizar los perfiles de mezcales por procesos de manufactura, origen geográfico y especies de agave. La rutina de trabajo de GC-MS-MSA permitió la identificación inequívoca de doce compuestos marcadores que fueron confirmados con su análisis de perfil de masas mediante una imagen espejo con los datos de espectrometría de masas por ionización de electrones (EI-MS), que incluyó una comparación pareada entre el patrón de masa/carga (m/z) experimental y los datos obtenidos de la biblioteca de masas del Instituto Nacional de Estándares y de Tecnología (NIST). Además, se calcularon los coeficientes de correlación y su desviación estándar para demostrar la correlación entre el espectro de masas experimental y el de referencia. El coeficiente de correlación de Pearson presentó valores en un rango de 0.96 a 0.99, indicando una alta coincidencia entre ambos espectros, mientras que los valores de desviación estándar variaron de 0.29 a 4.69 y proporcionaron la consistencia de los datos.

Palabras clave: Mezcal, DI-SPME, GC-MS, metabolitos, MSA.

GC-MS METABOLOMICS OF VOLATILE ANALYTES IN MEXICAN MEZCAL FOR FINGERPRINTING ANCESTRAL & ARTISANAL MANUFACTURE PROCESSES, GEOGRAPHICAL ORIGINS AND AGAVE SPECIES

Abstract

An approach based on non-targeted and targeted metabolomics analysis for fingerprinting and identifying discriminant metabolites in mezcal was performed by combining direct immersion solid-phase micro-extraction (DI-SPME) and gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) using multivariate statistical analysis (MSA). Present work describes the implementation of a separation method for obtaining exploitable chromatograms that can be used as GC metabolomics data matrix for fingerprinting mezcals' manufacturing process, geographical origin and agave species. The GC-MS-MSA workflow allowed an unequivocal identification of twelve marker compounds that were confirmed with their Electronic-Impact Mass Spectrometry (EI-MS) mirror image mass-profile analysis, comprising a pairwise comparison between experimental m/z patterns and data obtained from the National Institute of Standards and Technology (NIST) MS library. Furthermore, to demonstrate the correlation between reference and experimental mass spectra, Pearson correlation coefficients as well as their standard deviation were calculated. In all cases, Pearson's correlation coefficient presented values in a range of 0.96 to 0.99, indicating a high match between both spectra, whilst standard deviation values from 0.29 to 4.69 provided the data consistency.

Key words: Mezcal, DI-SPME, GC-MS, metabolites, MSA.

5.1 Introducción

El mezcal es una bebida que se obtiene de la destilación de mostos fermentados procedentes de los agaves cocidos, cuenta con denominación de origen, la cual incluye algunos municipios de Oaxaca, Puebla, San Luis Potosí, Tamaulipas, Zacatecas, Durango, Guerrero, Guanajuato y Michoacán (Hernández-López, 2018).

La producción de mezcal incluye más de 50 especies de agave. De ellas, 22 son las más utilizadas y sobresale *Agave angustifolia* (agave espadín) como la más relevante (Castañeda-Nava et al., 2019). Por ejemplo, en Villa Sola de Vega, Oaxaca, los productores emplean *A. angustifolia* en un 40 %, *Agave potatorum* en un 15 %, *Agave americana* 'Oaxacensis' en un 13 % y *Agave americana* 'americana' en un 10 %, además de otras especies menores (Rios-Colín et al., 2022).

El agave empleado en la producción de mezcal aporta perfiles de terpenos como el terpineno y terpinol, los cuales son responsables de las notas herbales y florales en las bebidas (Del Barrio-Galán et al., 2021; Villanueva-Rodriguez & Escalona-Buendia, 2012).

La cocción tradicional del agave es un proceso lento que se lleva a cabo en hornos de tierra alimentados con madera y cubiertos con piedras, lo que podría producir furanos y compuestos orgánicos volátiles (VOC) relacionados con aromas ahumados, que a su vez son retenidos por los agaves cocidos; tales como fenoles producidos por la degradación térmica de la lignina (Vera-Guzmán et al., 2009, 2010, 2018).

La fermentación del mosto típicamente produce ácidos orgánicos, alcoholes superiores y ésteres de etilo, los primeros son responsables de aromas butíricos y los dos últimos de notas aromáticas florales y frutales (Botello-Álvarez et al., 2007; Villanueva-Rodriguez & Escalona-Buendia, 2012).

El aseguramiento de la calidad, autenticidad y trazabilidad en la cadena alimentaria (www.foodintegrity.eu) es una tarea central para la protección del consumidor y para las agencias de aduanas. Por lo que constantemente se promueve el uso de métodos analíticos para detectar prácticas fraudulentas como adulteración de materias primas y alimentos. Específicamente, las bebidas alcohólicas son propensas de ser adulteradas puesto que pueden ser fácilmente mezcladas con líquidos más baratos (Esteki et al., 2018).

Por ello, la seguridad del consumidor de bebidas alcohólicas debería ser una actividad preponderante para la Secretaría de Salud puesto que alrededor de 40 a 50 % de las bebidas consumidas en México son ilegales y clandestinas (Gaytán, 2018). En consecuencia, el uso de métodos analíticos capaces de rastrear huellas metabolómicas relacionadas con la autenticidad, la especie y el origen geográfico, se justifica dentro del marco de salud pública local.

Recientemente, el empleo de métodos de referencia analíticos estándares está migrando a la implementación de técnicas ómicas, combinando técnicas de separación y experimentos espectroscópicos. Sin embargo, la mayoría de ellas son realizadas bajo esquemas de detección dirigida. Actualmente, debido a la implementación de algoritmos de inteligencia artificial robusta (Pomyen et al., 2020), las técnicas para detectar falsificación se están centrando en registrar la huella digital única del alimento mediante enfoques metabolómicos no dirigidos.

Estos métodos holísticos relacionados con el control de la integridad de alimentos pueden producir señales amplias o estrechas, esto dependiendo de la técnica para producir, respectivamente, huellas digitales con resolución alta o baja. Generalmente, las huellas analíticas amplias son obtenidas con instrumentación portátil, tales como equipos de espectroscopía de infrarrojo (IR), de ultravioleta-visible (UV-VIS) y de Raman, mientras que las señales estrechas para elucidar diversas matrices complejas son obtenidas por medio de cromatografía acoplada a espectrometría de masas y recientemente con espectroscopía por resonancia magnética nuclear (Herbert-Pucheta et al., 2021).

Las huellas digitales analíticas han sido usadas para trazar la autenticación de bebidas alcohólicas. Por ejemplo, para diferenciar ron elaborado de caña de azúcar de aquellos elaborados con melaza (residuo de la producción de caña de azúcar) (Franitza et al., 2018) y para evaluar la calidad y autenticidad de whisky escocés bajo un enfoque no dirigido con cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas en tándem de alta resolución seguido por procesamiento quimiométrico multidimensional (Stupak et al., 2018). Ejemplos interesantes de la implementación de foodómica con GC-MS incluye café (Huang et al., 2007), té verde (Jumtee et al., 2011) y vino (Springer et al., 2014).

Una manera de verificar la calidad y autenticidad del mezcal es mediante el estudio de su metaboloma. En este sentido, se ha implementado el análisis de metabolitos por análisis directo mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear con experimentos de multipresaturación de las señales de agua y etanol (López-Aguilar et al., 2021), extracción líquido-líquido y microextracción en fase sólida (SPME) acoplados a cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS) (Martínez et al., 2019).

El metaboloma volátil del mezcal depende fuertemente de: i) la especie de agave, ii) las condiciones climáticas ligadas al origen geográfico, iii) el proceso de manufactura artesanal o ancestral (López-Aguilar et al., 2021), principalmente, la cocción, fermentación y destilación (Gómez-Zamora et al., 2016; Villarreal-Morales et al., 2018).

Hasta donde tenemos conocimiento, los estudios metabolómicos dirigidos y no dirigidos mediante GC-MS no han sido propuestos para el establecimiento de huellas digitales ni de identificación de metabolitos discriminantes en bebidas de agave en América Latina, como el mezcal. Por todo lo anterior, el presente trabajo describe la implementación de un método de separación por cromatografía de gases para la obtención de cromatogramas explotables que puedan ser usados como una matriz de datos de entrada para el análisis estadístico multivariado supervisado que permita describir las huellas metabolómicas en mezcales por especie de agave, origen geográfico y procesos de manufactura. En este sentido,

doce metabolitos fueron identificados y confirmados con sus patrones únicos de fragmentación de EI-MS (Electron Ionization-Mass Spectrometry), reportados en la base de datos del Instituto Nacional de Estándares y de Tecnología (NIST), mediante una imagen espejo novedosa obtenida del perfil de masas. Las características antes mencionadas son responsables de las discriminaciones de los mezcales por procesos de manufactura ancestrales y artesanales, orígenes geográficos entre tres regiones de dos estados de México y seis especies de agave.

5.2 Materiales y métodos

5.2.1 Reactivos

Los reactivos fueron de grado analítico y se compraron a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

5.2.2 Muestras de mezcal

Las muestras de mezcal (Cuadro 8) se consiguieron de productores localizados en Oaxaca (Valles Centrales y Sierra Sur) y San Luis Potosí (22°9'4" N, 100°58'34" W), México. Las dos regiones de Valles Centrales (17°4'59.88" N, 96°45'0" W) y Sierra Sur (19°42'0" N, 96°52'0" W) son conocidas por su producción de mezcal. Las especies *Agave potatorum*, *Agave angustifolia*, *Agave karwinskii*, *Agave salmiana*, *Agave marmorata* y *Agave americana* 'Oaxacensis' fueron usados en la manufactura de los mezcales aquí presentados, que a su vez comprendió dos procesos de elaboración: ancestral y artesanal.

Las unidades experimentales fueron botellas de mezcal de 250 mL. Cada ensayo de GC-MS fue ejecutado por triplicado. Considerando 16 muestras de mezcal (Cuadro 8), enlazadas a un origen geográfico en particular (nueve muestras de la región Sierra Sur, cinco muestras de la región Valles Centrales y dos mezcales del Centro de San Luis Potosí), al proceso de manufactura (cinco mezcales ancestrales y once artesanales) y a la especie de agave (cinco muestras de *A. angustifolia*, cuatro de *A. potatorum*, dos de *A. salmiana*, una de *A. marmorata*, tres de *A. karwinskii*, una de *A. americana* 'Oaxacensis'), así como las

repeticiones de GC-MS, se obtuvo una matriz de datos que incluyó 48 cromatogramas (Figura 27).

5.3 Métodos analíticos

5.3.1 Contenido alcohólico

El contenido alcohólico (NMX-V-013-NORMEX-2019) se determinó con alcoholímetros certificados OIML ISO 4801 -NF B 35-515 (Alla France, Chemillé, Francia), uno con escala de medición de 30-40 y otro con escala de 40-50 % Alc Vol., calibrados a 20 °C, división de 0.1 y precisión de ± 0.1 .

5.3.2 Compuestos volátiles por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

Parámetros de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

Los análisis de GC-MS se llevaron a cabo en un cromatógrafo de gases Trace 1310™ acoplado a un detector de masas de simple cuadropolo ISQ^{LT} (ambos de Thermo Scientific, USA). La separación de los compuestos se realizó con una columna capilar de sílice fundida J&W HP-5ms (5 %-fenil-metilpolisiloxano) de 30 m x 0.25 mm de diámetro interno y espesor de 0.25 μm (Agilent, Santa Clara, Ca., USA). El gas empleado como fase móvil fue helio a razón de 1 mL min⁻¹. Dos métodos de separación se diseñaron durante la investigación, los cuales posteriormente se mencionarán como método uno y método dos.

Extracción

Los compuestos volátiles fueron extraídos mediante microextracción en fase sólida por inmersión directa (DI-SPME) con una fibra de DVB/CWR/PDMS (divinylbenzene/carbón wide range/polydimethylsiloxane) cuyo espesor fue de 10 mm/80 μm (Agilent-Santa Clara, Ca, USA).

El proceso de extracción se resume como sigue: un mililitro de mezcal se colocó en un vial de vidrio ámbar de 2 mL con tapa de goma. Para el método uno, la muestra se agitó a 1200 rpm (Vortex, Scientifics Industries Inc., USA) durante 5 min para permitir el equilibrio antes de introducir la fibra. Este último paso no fue incluido en el método dos. La fibra se acondicionó conforme a las

especificaciones del proveedor y se colocó en el soporte de inyección manual (Supelco, U.S.A.). El soporte se insertó a través de la goma del vial para poner en contacto directo la fibra con la muestra por 1 min. Después de la extracción, la fibra se retiró del mezcal, se removi6 del vial y se insert6 en el puerto de inyecci6n del GC en modo splitless (sin divisi6n del flujo), con un flujo de purga de 50 mL min⁻¹ durante 2 min para el m6todo uno y 50 mL min⁻¹ durante 1 min para el m6todo dos.

Instrumentaci6n

El cromat6grafo de gases fue equipado con un inyector split/splitless, el cual se mantuvo a una temperatura de 270 °C. En el m6todo uno, el horno se program6 como sigue: iniciando a 50 °C y se mantuvo 1 min, subsecuentemente, se establecieron incrementos de 10 °C min⁻¹ hasta 100 °C; entonces, nuevamente se programaron incrementos de 3 °C min⁻¹ hasta 250 °C, y finalmente, la temperatura aument6 con gradientes de 15 °C min⁻¹ hasta 300 °C y se mantuvo 5 min. Para el m6todo dos, el programa del horno se dise1n6 como sigue: inicialmente a 50 °C durante 1 min, entonces la temperatura se elev6 de 50 a 300 °C a raz6n de 7 °C min⁻¹ hasta el final del programa de control de temperatura.

La espectrometría de masas mediante ionizaci6n de electrones (EI-MS) se estableci6 en modo TIC/Scan (Total Ion Current) desde 50-500 m/z (para el m6todo uno) y desde 50 a 650 m/z (para el m6todo dos), ambos con tasas de barrido de 0.2 s⁻¹. La respuesta del detector de masas en modo impacto electr6nico se gener6 a 70 eV. Las temperaturas de la lín6a de transferencia y de la fuente de iones se mantuvieron a 270 y 200 °C respectivamente. Los cromatogramas fueron procesados con el software Xcalibur™ 4.0 (Thermo Scientific, USA).

Análisis de los datos

El contenido de alcohol se evalu6 con rutinas de análisis de varianza (ANOVA) de una vía bajo un dise1no completamente al azar ($\alpha=0.05$). Se ejecut6 un ANOVA para evaluar la significancia de esta variable (alcohol) para los 16 mezcales de

acuerdo al proceso de manufactura (ancestral y artesanal), otro para origen geográfico (Sierra Sur y Valles Centrales, Oaxaca y San Luis Potosí), finalmente un tercer ANOVA para el factor especie de agave (*A. potatorum*, *A. karwinskii*, *A. angustifolia* y *A. salmiana*). Para identificar diferencias significativas se realizaron comparaciones de medias ($\alpha=0.05$) con la prueba de la diferencia mínima significativa (LSD). El procesamiento de los datos se realizó con el software SAS versión 9.4 (SAS Institute, Inc., Cary, NC).

El análisis estadístico multivariado supervisado de la matriz de datos de GC-MS comprendió el uso de análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) y análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales ortogonales (OPLS-DA) con el software Metaboanalyst 5.0 (Pang et al., 2021). Respectivamente, el análisis OPLS-DA (Figura 28A) y el análisis PLS-DA (Figuras 28B y 28C) se usaron como modelos discriminantes para establecer los perfiles de la producción de mezcal ancestral y artesanal (Figura 28A), así como del origen geográfico (Figura 28B) y de las especies de agave (Figura 28C).

El pre-procesamiento de los datos que comprendió normalización por suma (para ajustar diferencias entre las muestras), transformación (log) y escalamiento automático (media centrada y dividida por la desviación estándar de cada variable), esto se aplicó para remover alguna posible variación durante la fase experimental, de tal manera que las características fueran comparables (Chong et al., 2019; Cozzolino et al., 2019; Dasenaki et al., 2019; Wilson et al., 2021). La validación de los modelos PLS-DA y OPLS-DA se ejecutó con 100 permutaciones por análisis. La confiabilidad se evaluó en términos de la bondad de ajuste (R^2) y la capacidad de predicción (Q^2). Las regiones sombreadas denotadas por elipses en los gráficos de cada modelo se establecieron a intervalos de confianza del 95 % (Herbert-Pucheta et al., 2021; Szymańska et al., 2012; Worley & Powers, 2016).

Cuadro 8. Mezcales empleados en el análisis de GC-MS. Se presenta la especie de agave empleada, origen geográfico, proceso de manufactura, estado y contenido alcohólico (% Alc. Vol).

Código	Especie de agave	Origen geográfico	Proceso	Estado	%ABV ^y
1	<i>A. angustifolia</i>	Sierra Sur	Ancestral	Oaxaca	46.9
2	<i>A. angustifolia</i>	Sierra Sur	Ancestral	Oaxaca	47.1
3	<i>A. potatorum</i>	Sierra Sur	Ancestral	Oaxaca	48.2
4	<i>A. potatorum</i>	Sierra Sur	Ancestral	Oaxaca	48.2
5	<i>A. angustifolia</i>	Sierra Sur	Ancestral	Oaxaca	46.7
6	<i>A. salmiana</i>	Centro SLP ^z	Artesanal	SLP	39.8
7	<i>A. salmiana</i>	Centro SLP	Artesanal	SLP	38.9
8	<i>A. marmorata</i>	Sierra Sur	Artesanal	Oaxaca	46.0
9	<i>A. angustifolia</i>	Valles Centrales	Artesanal	Oaxaca	44.4
10	<i>A. angustifolia</i>	Valles Centrales	Artesanal	Oaxaca	41.9
11	<i>A. karwinskii</i>	Sierra Sur	Artesanal	Oaxaca	45.7
12	<i>A. americana</i> 'Oaxacensis'	Valles Centrales	Artesanal	Oaxaca	48.0 ^x
13	<i>A. karwinskii</i>	Sierra Sur	Artesanal	Oaxaca	46.0
14	<i>A. potatorum</i>	Valles Centrales	Artesanal	Oaxaca	48.0 ^x
15	<i>A. karwinskii</i>	Sierra Sur	Artesanal	Oaxaca	47.6
16	<i>A. potatorum</i>	Valles Centrales	Artesanal	Oaxaca	45.5

^z San Luis Potosí

^y ABV: Contenido alcohólico corregido a 20 °C.

^x Valor reportado en la etiqueta.

5.4 Resultados y discusión

5.4.1 Contenido alcohólico

Se determinó el contenido de alcohol en los mezcales con respecto al factor origen geográfico, proceso de manufactura y especie de agave (Cuadro 9). El ANOVA entre los mezcales artesanales y ancestrales muestra que los contenidos alcohólicos no fueron significativamente diferentes ($p > 0.05$), además, se observaron mayores dispersiones ($s = \pm 3.2$) en los mezcales artesanales, debido principalmente a que estas muestras fueron originarias de las tres regiones estudiadas (Valles Centrales y Sierra Sur, Oaxaca, y San Luis Potosí) lo cual pudo haber contribuido a la mayor variabilidad encontrada con respecto a las muestras ancestrales que se produjeron en Sierra Sur de Oaxaca.

Las empresas productoras de mezcal en Oaxaca se caracterizan en su mayoría por trabajar bajo procesos artesanales, como se constata en la investigación de García-Espejel et al., (2019), quienes encontraron que del total de productores entrevistados el 75.6 % elabora mezcal artesanal y el resto trabaja proceso ancestral. El ANOVA entre los contenidos alcohólicos de los mezcales de tres regiones mostró diferencia significativa para las muestras de San Luis Potosí, las cuales se caracterizaron por presentar el menor valor (39.4 % Alc. Vol.) con respecto a las muestras oaxaqueñas.

Este comportamiento fue similar para el ANOVA entre los contenidos de alcohol para el factor especie puesto que los valores de alcohol en los destilados de *A. potatorum*, *A. karwinskii* y *A. angustifolia* no mostraron diferencia significativa (Cuadro 9) entre si; únicamente la muestra de *A. salmiana* mostró diferencia estadísticamente significativa cuando se comparó con las demás. Cabe destacar que los mezcales de las tres especies de *A. potatorum*, *A. karwinskii* y *A. angustifolia* elaboradas en Valles Centrales fueron las responsables de las mayores dispersiones ($s = \pm 2.6$) observadas.

Esta variabilidad reflejada mediante el contenido alcohólico podría ser el resultado de: i) el tipo de agave empleado (especie, contenido de azúcares fermentables), ii) métodos e insumos empleados durante la cocción de la materia prima, iii) cantidad de microorganismos que intervienen durante la fermentación, forma en que ésta se realiza y los tiempos implementados, finalmente iv) la destilación y rectificación a criterio del maestro mezcalero (Chavez-Parga et al., 2016).

A pesar de las dispersiones observadas en el Cuadro 9, todas las muestras se encontraron dentro de lo especificado por la NOM-070-SCFI-2016 que establece un rango en el contenido alcohólico de 35 a 55 % Alc. Vol. La importancia de controlar el porcentaje alcohólico en mezcales se basa en que esta variable juega un papel central en las percepciones sensoriales al provocar múltiples sabores y sensaciones quíestésicas (Thibodeau & Pickering, 2021, 2019).

Cuadro 9. Contenido alcohólico de mezcales ancestrales y artesanales, originarios de Oaxaca y San Luis Potosí, México y elaborados con *A. potatorum*, *A. karwinskii*, *A. angustifolia* y *A. salmiana*.

Proceso	Contenido alcohol (% Alc Vol)
Ancestral	47.4a ^z ± 0.7
Artesanal	44.7a ± 3.2
Región	Contenido alcohol (% Alc Vol)
Sierra Sur, Oax.	46.9a ± 0.9
Valles Centrales, Oax.	45.6a ± 2.6
San Luis Potosí	39.4b ± 0.6
Especie	Contenido alcohol (% Alc Vol)
<i>Agave potatorum</i>	47.5a ± 1.3
<i>Agave karwinskii</i>	46.4a ± 1.0
<i>Agave angustifolia</i>	45.4a ± 2.3
<i>Agave salmiana</i>	39.4b ± 0.6

^z Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de la mínima diferencia significativa (LSD) ($p < 0.05$).

5.4.2 Método de separación de cromatografía de gases

La cromatografía de gases (Figura 27), obtenida con el método de separación uno (ver materiales y métodos), se implementó mediante microextracción en fase sólida (DI-SPME) por inmersión directa para identificar los compuestos volátiles que pueden ser usados en el establecimiento del perfil metabolómico no dirigido para discriminar procesos de manufactura, orígenes geográficos y especies de agave. El método de extracción DI-SPME es ideal para el análisis de muestras acuosas limpias, como el mezcal (Menezes-Filho et al., 2010). La cromatografía de gases implementada con el método dos (Figura 28) y una rampa de temperatura lineal de 7 °C min⁻¹, que a su vez produjo un tiempo de separación experimental de 39 minutos y 45 segundos, fue pobremente explotable para el análisis metabolómico dirigido y no dirigido (Figuras 29 y 30). La mayoría de los cromatogramas obtenidos con el método dos presentaron importantes distorsiones de la línea base después de los 30 min del experimento de GC, lo

que dificultó la selección e identificación de metabolitos con tiempos de retención más largos, que a su vez presentaron la más alta afinidad con la fase estacionaria compuesta de 5 %-fenil-metilpolisiloxano.

En contraste, la implementación del método de separación uno que aproximadamente duplicó el tiempo experimental (64 minutos y 25 segundos para el método uno con respecto a los 39 minutos y 45 segundos para el método dos) produjo matrices de datos más explotables (Figura 27) para el análisis estadístico multivariado, excepto para el análisis PCA (Figura 31) que en nuestro caso resultó desfavorable. El incremento de la resolución cromatográfica, selectividad y tiempo de retención entre las señales, necesarios para obtener la matriz de datos de GC para metabolómica, fue posible con un programa de tres rampas de temperatura:

1. Desde 50 a 100 °C con un gradiente de 10 °C min⁻¹, desde el minuto 2 al 6.
2. Desde 100 a 250 °C a razón de 3 °C min⁻¹, desde el minuto 7 al minuto 56.
3. Desde 250 a 300 °C con un gradiente de 15 °C min⁻¹, desde el minuto 57 al minuto 59 con 20 segundos, y

Finalmente se mantuvo a 300 °C durante 5 min, hasta llegar a los 64 minutos con 20 segundos, que fue el tiempo total del experimento.

Es importante notar la mejora sobresaliente de todos los parámetros cromatográficos mencionados anteriormente, incluyendo las líneas base que permitieron una selección de regiones cromatográficas de señales discriminantes. Estas señales aparecieron durante los primeros 15 min de los experimentos de GC (Figura 34 y Cuadro 10), las cuales representaron el 66 % de la metabolómica dirigida necesaria para discriminar entre procesos de manufactura ancestrales y artesanales, orígenes geográficos y especies de agave.

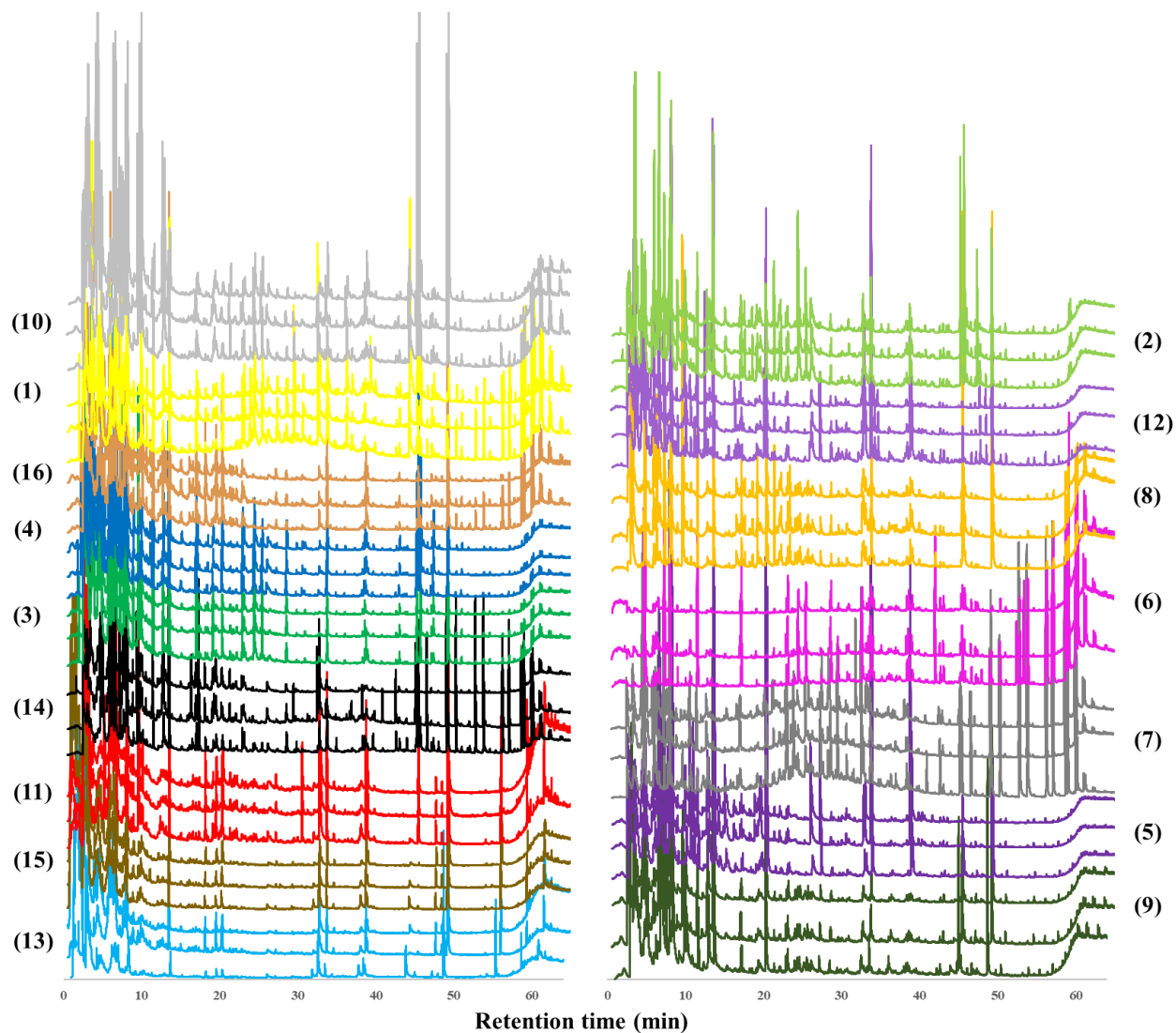


Figura 27. Matriz de datos de cromatografía de gases de mezcales sometida a análisis estadístico multivariado para metabolómica dirigida y no dirigida, obtenida del método de separación uno.

Los números significan: 1-2, 5: *Agave angustifolia*, Sierra Sur, Oaxaca (Ancestral); 3-4: *Agave potatorum*, Sierra Sur, Oaxaca (Ancestral); 6-7: *Agave salmiana*, Centro de San Luis Potosí (Artesanal); 8: *Agave marmorata* Sierra Sur, Oaxaca (Artesanal); 9-10: *Agave angustifolia*, Valles Centrales, Oaxaca (Artesanal); 11, 13, 15: *Agave karwinskii* Sierra Sur, Oaxaca (Artesanal); 12: *Agave americana* 'Oaxacensis', Valles Centrales, Oaxaca (Artesanal); 14, 16: *Agave potatorum*, Valles Centrales, Oaxaca (Artesanal).

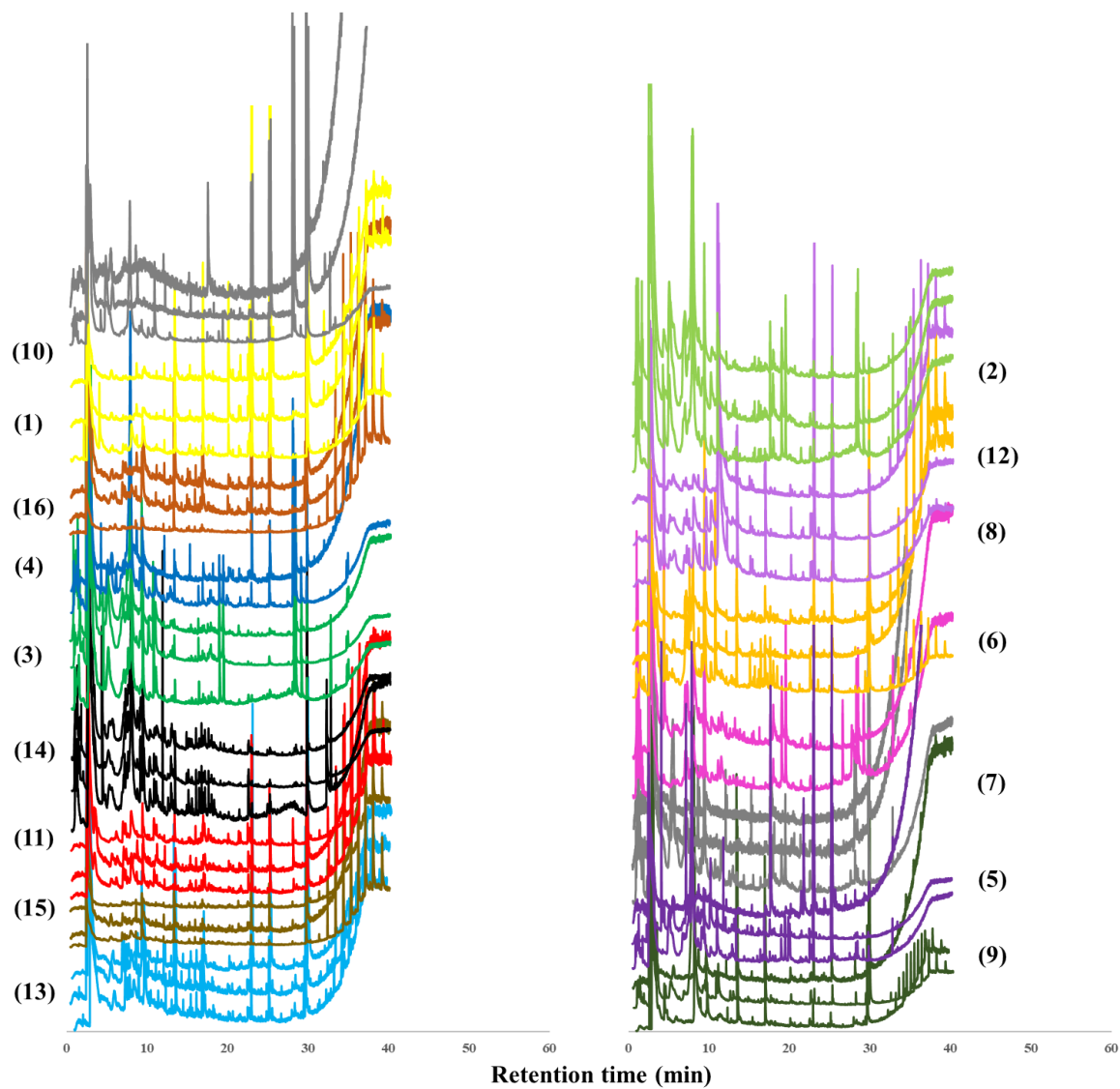


Figura 28. Matriz de datos de cromatografía de gases de mezcales sometida a análisis estadístico multivariado para metabolómica dirigida y no dirigida, obtenida del método de separación dos.

Los números significan: 1-2, 5: *Agave angustifolia*, Sierra Sur, Oaxaca (Ancestral); 3-4: *Agave potatorum*, Sierra Sur, Oaxaca (Ancestral); 6-7: *Agave salmiana*, Centro de San Luis Potosí (Artesanal); 8: *Agave marmorata* Sierra Sur, Oaxaca (Artesanal); 9-10: *Agave angustifolia*, Valles Centrales, Oaxaca (Artesanal); 11, 13, 15: *Agave karwinskii* Sierra Sur, Oaxaca (Artesanal); 12: *Agave americana* 'Oaxacensis', Valles Centrales, Oaxaca (Artesanal); 14, 16: *Agave potatorum*, Valles Centrales, Oaxaca (Artesanal).

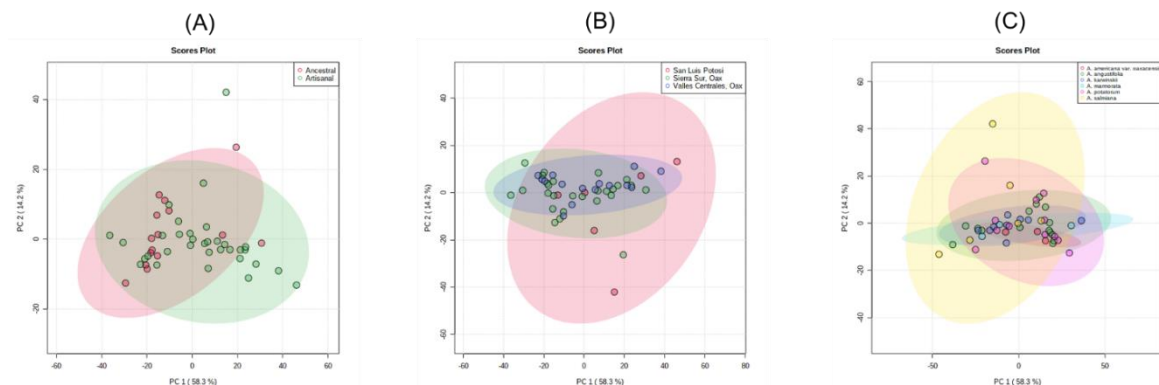


Figura 29. Análisis de componentes principales obtenido de la matriz de datos de cromatografía de gases con el método de separación dos.

(A) Para evaluar los procesos de manufactura ancestral (círculos rojos) y artesanal (círculos verdes).

(B) Orígenes geográficos de San Luis Potosí (círculos rojos), Sierra Sur, Oaxaca (círculos verdes) y Valles Centrales, Oaxaca (círculos azules).

(C) Especie de agave, que comprendieron *Agave angustifolia* (círculos verdes); *Agave potatorum* (círculos magenta); *Agave salmiana* (círculos amarillos); *Agave marmorata* (círculos azul turquesa); *Agave karwinskii* (azul oscuro) y *Agave americana* 'Oaxacensis' (círculos rojos).

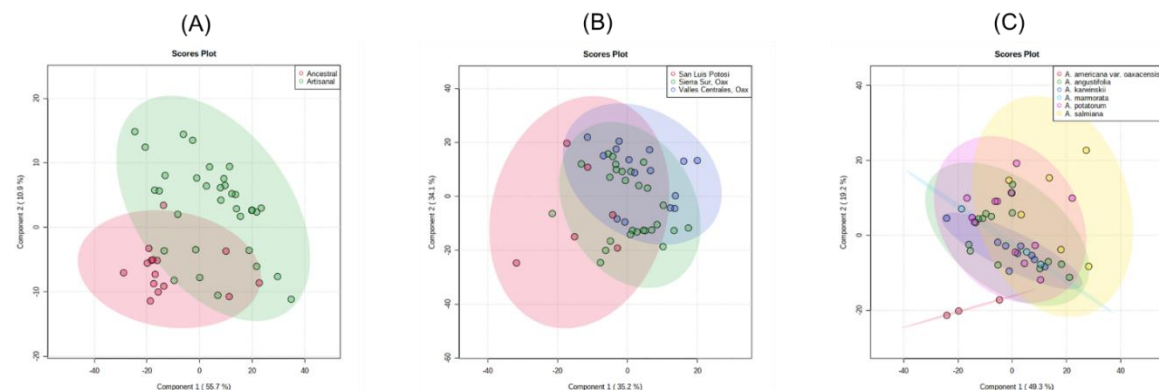


Figura 30. Análisis estadístico multivariado supervisado OPLS-DA (A) y PLS-DA (B y C), obtenido de la matriz de datos de cromatografía de gases con el método de separación dos.

(A) Para evaluar los procesos de manufactura ancestral (círculos rojos) y artesanal (círculos verdes). (B) Modelos PLS-DA para orígenes geográficos de San Luis Potosí (círculos rojos), Sierra Sur, Oaxaca (círculos verdes) y Valles Centrales, Oaxaca (círculos azules).

(C) Modelo PLS-DA para especies de agave, las cuales fueron *Agave angustifolia* (círculos verdes); *Agave potatorum* (círculos magenta); *Agave salmiana* (círculos amarillos); *Agave marmorata* (círculos azul turquesa); *Agave karwinskii* (azul oscuro) y *Agave americana* 'Oaxacensis' (círculos rojos).

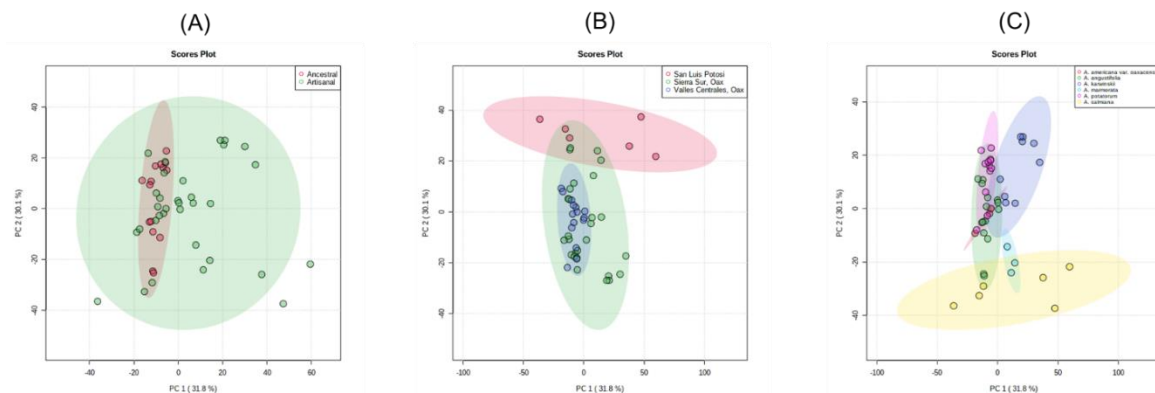


Figura 31. Análisis de componentes principales obtenido de la matriz de datos de cromatografía de gases con el método de separación uno.

(A) Para evaluar los procesos de manufactura ancestral (círculos rojos) y artesanal (círculos verdes).

(B) Orígenes geográficos de San Luis Potosí (círculos rojos), Sierra Sur, Oaxaca (círculos verdes) y Valles Centrales, Oaxaca (círculos azules).

(C) Para especie de agave (C) que comprendieron *Agave angustifolia* (círculos verdes); *Agave potatorum* (círculos magenta); *Agave salmiana* (círculos amarillos); *Agave marmorata* (círculos azul turquesa); *Agave karwinskii* (azul oscuro) y *Agave americana* 'Oaxacensis' (círculos rojos).

5.4.3 Metabolómica no dirigida basada en cromatografía de gases

La Figura 32 representa un conjunto de gráficos de puntuaciones (score plot) del análisis estadístico multivariado supervisado, tanto OPLS-DA como PLS-DA, que se derivó de la matriz de datos obtenida de cromatografía de gases con el método de separación uno (Figura 27). En primer lugar, el análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales ortogonales (OPLS-DA, Figura 32.A), con un componente predictivo (p1) y cuatro ortogonales (o1, o2, o3 y o4) (Figura 33) se usó para discriminar entre procesos de manufactura ancestrales y artesanales del conjunto de mezcales analizados (Cuadro 8), teniendo a su vez valores aceptables de bondad de ajuste y de predicción, repectivamente $R^2Y = 0.95$ y $Q^2 = 0.837$.

El proceso artesanal para elaborar mezcal en San Luis Potosí es comparable con los diversos procesos reportados en Oaxaca (Kirchmayr et al., 2017), por ejemplo, en San Luis Potosí la cocción se realiza en hornos rústicos y el jugo del agave cocido es obtenido con un molino de piedra, conocido como tahona. Durante la molienda, se añade agua y el producto resultante es fermentado y finalmente destilado (Verdugo-Valdez et al., 2011).

Por otro lado, la producción ancestral se concentra en la región Sierra Sur de Oaxaca, por mencionar, el municipio de Villa Sola de Vega cuenta con 64 palenques, nombre que adoptan las fábricas donde se produce mezcal, de los cuales el 56 % emplean olla de barro durante la destilación, el 12 % alambique de cobre y el 31 % recipientes de lámina (Rios-Colín et al., 2022). Por definición, la NOM-070-SCFI-2016 establece que el proceso ancestral incluye la destilación en olla de barro mientras que el artesanal emplea alambique de cobre, cabe mencionar que los recipientes de lámina no están permitidos durante el proceso.

En general, el mezcal ancestral adopta técnicas y herramientas tradicionales localmente diseñadas, como: hornos subterráneos (excavaciones hechas en el suelo) para la cocción del agave, mazos de madera, tahona (rueda de piedra de 1.5 m de diámetro, la cuál es movida con animales de tracción, que puede ser un caballo) para moler el agave cocido, contenedores de madera empleados en la fermentación y destiladores acondicionados con ollas de barro (Lira et al., 2022)

El modelo supervisado del análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) para diferenciar entre orígenes geográficos de los mezcales es representado en la Figura 32A. La precisión para discriminar entre mezcales de Oaxaca y San Luis Potosí ($22^{\circ}9'4''$ N, $100^{\circ}58'34''$), así como para distinguir entre los de Valles Centrales, Oax. ($17^{\circ}4'59.88''$ N, $96^{\circ}45'0''$ W) y Sierra Sur, Oax. ($19^{\circ}42'0''$ N, $96^{\circ}52'0''$ W) fue de $R^2 = 0.94$ y $Q^2 = 0.81$. Por ello, se puede decir que es sencillo distinguir entre mezcales de Oaxaca y de San Luis Potosí, porque existe una distancia considerable entre las dos regiones, de alrededor de 1000 km.

Contrario a lo observado entre las dos regiones de Oaxaca, que la diversidad de mezcales encontrados refleja, en este estudio, una variabilidad modesta entre poblaciones de la misma región (muestras 9, 10, 12, 14 y 16 de Valles Centrales y muestras 1, 2, 3, 4, 5, 8, 11, 13 y 15 de Sierra Sur, Oaxaca. Todas se muestran en la Figura 32B). Este comportamiento puede ser asociado con: i) prácticas de manufactura del mezcal similares en Oaxaca, ii) la proximidad entre municipios (alrededor de 50 km), iii) condiciones climatológicas y ambientales similares, iv)

similaridad genética entre especies de agave, y v) en menor medida, a la falta de calidad de las bebidas (Chavez-Parga et al., 2016; Tapp et al., 2003).

Sin embargo, los resultados del análisis PLS-DA de la matriz de datos de GC para obtener distinciones de origen geográfico de los mezcales aquí presentados (Figura 32B) pueden ser las bases para obtener una *región de origen*, típicamente usada en el mercado del vino para asociar la calidad y las tendencias de consumo con una distinción geográfica (Souza-Gonzaga et al., 2022).

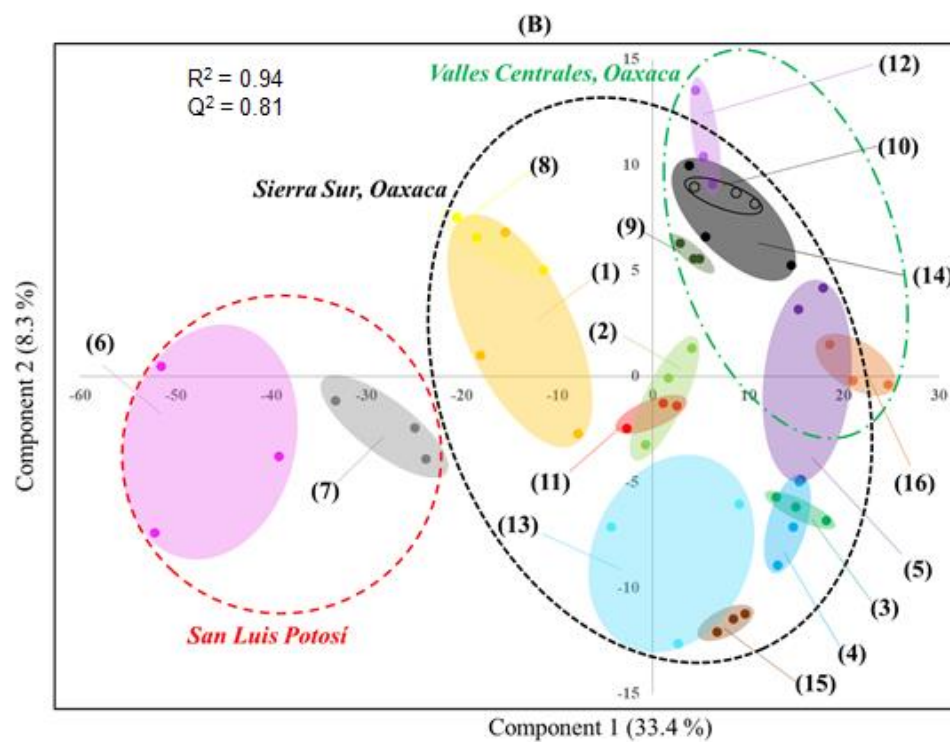
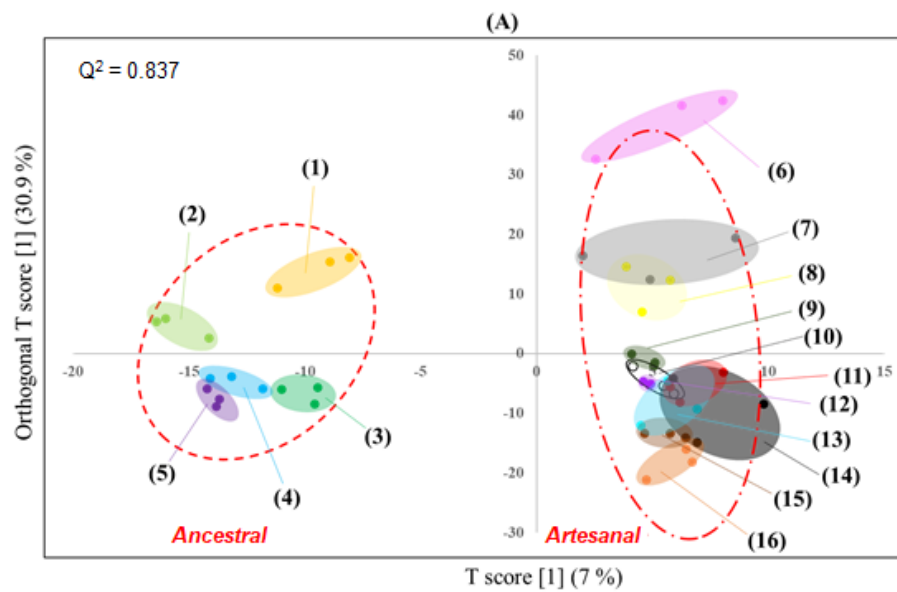
La Figura 32C resalta el análisis PLS-DA, con parámetros de $R^2 = 0.94$; $Q^2 = 0.81$, de la matriz de datos de GC para diferenciar entre mezcales producidos con especies de *A. angustifolia*, *A. potatorum*, *A. salmiana*, *A. marmorata*, *A. karwinskii* y *A. americana* 'Oaxacensis'.

Los mezcales elaborados con *A. angustifolia* son ampliamente producidos, aunque es una especie que también crece de manera silvestre, este agave es cultivado desde Sonora y Tamaulipas en el Noreste de México hasta Panamá. Su rango amplio de cultivo en México lo vuelve substancialmente variable de población a población, resultado de las condiciones ambientales locales y de sus características genéticas.

Referente al agave *A. marmorata*, éste presenta un tamaño de moderado a grande, el cual logra obtener durante aproximadamente 25 años de maduración y se puede encontrar en los estados de Oaxaca y Puebla (Jaramillo-Villanueva, 2018; Mahr, 2015; Trejo et al., 2018). El mezcal de *A. salmiana* es elaborado principalmente en San Luis Potosí y Zacatecas (De León-Rodríguez et al., 2008). En cuanto a los mezcales elaborados con *A. karwinskii*, la cual es una especie endémica de tamaño alto que puede alcanzar hasta los 3 m, sin embargo, sus tallos son degados y con poca humedad por lo que su rendimiento es bajo. Se encuentra en zonas áridas de Oaxaca y Puebla. Es un agave conocido por su complejidad morfológica, además de la diversidad de etnotaxones, lo que ocasiona que adopte diversos nombres coloquiales como barril, madrecoixe, tobasiche (Gaytán, 2018; Mahr, 2015; Vázquez-Pérez et al., 2020).

Como se observa en la Figura 32C, las distinciones inequívocas, con un modelo robusto del 77 % ($Q^2=0.77$), pueden establecerse para los mezcales de las especies de *A. potatorum* (de Valles Centrales y Sierra Sur, Oaxaca) y *A. salmiana* (de San Luis Potosí). Los destilados de *A. marmorata* y *A. americana* 'Oaxacensis' presentan una cercanía con *A. angustifolia* y puede ser ligeramente identificado uno del otro. Menos evidente resulta identificar discriminaciones entre mezcales de las especies de *A. angustifolia* y *A. karwinskii*, al observarse traslapes entre las dos elipses (de color verde para *A. angustifolia* y de color azul para *A. karwinskii*), lo cual puede inferir que estos dos mezcales comparten ciertas características composicionales.

Resultó interesante observar que las muestras identificadas como uno y dos (Cuadro 8) correspondientes a *A. angustifolia* de Sierra Sur, Oaxaca presentaron una clara proximidad con las de *A. karwinskii*, también de Sierra Sur, Oaxaca (etiquetas 11, 13 y 15 del Cuadro 8) pero no con la muestra cinco de *A. angustifolia* (Cuadro 8). Lo que fuertemente sugiere que este mezcal podría ser considerado como el más auténtico de todas las muestras de *A. angustifolia* de Sierra Sur, Oaxaca y, en el mismo sentido, la muestra 15 puede considerarse un auténtico mezcal de *A. karwinskii* de Sierra Sur, Oaxaca. El resto de las muestras previamente mencionadas (etiquetas uno para *A. angustifolia*, y más severamente para la muestra dos de *A. angustifolia* y 13 para *A. karwinskii*) podrían ser consideradas como mezcales sospechosos de ser elaborados realmente con la especie enunciada en su etiqueta.



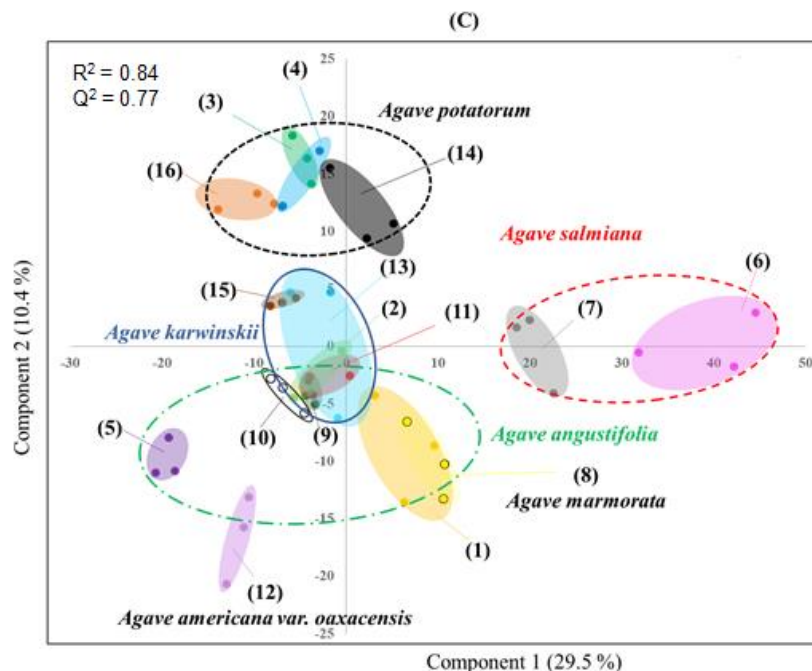


Figura 32. Análisis discriminante supervisado de mezcales por mínimos cuadrados parciales ortogonales [OPLS-DA, (A)] y de mínimos cuadrados parciales [PLS-DA, (B y C)].

Los números significan: 1-2, 5: *Agave angustifolia*, Sierra Sur, Oaxaca (Ancestral); 3-4: *Agave potatorum*, Sierra Sur, Oaxaca (Ancestral); 6-7: *Agave salmiana*, Centro de San Luis Potosí (Artesanal); 8: *Agave marmorata* Sierra Sur, Oaxaca (Artesanal); 9-10: *Agave angustifolia*, Valles Centrales, Oaxaca (Artesanal); 11, 13, 15: *Agave karwinskii* Sierra Sur, Oaxaca (Artesanal); 12: *Agave americana* 'Oaxacensis', Valles Centrales, Oaxaca (Artesanal); 14, 16: *Agave potatorum*, Valles Centrales, Oaxaca (Artesanal).

(A) Análisis OPLS-DA para discriminar entre mezcales ancestrales (región denotada por la elipse discontinua de color rojo) y artesanales (región denotada por la elipse punto-guión de color rojo). (B) Análisis PLS-DA para origen geográfico que permita discriminar mezcales de Valles Centrales (región denotada por la elipse punto-guión de color verde) y Sierra Sur (región denotada por la elipse discontinua de color negro) de las de San Luis Potosí (región denotada por la elipse discontinua de color rojo). (C) Análisis PLS-DA para especies de agave que permita discriminar muestras oaxaqueñas: *Agave angustifolia* (región denotada por la elipse punto-guión de color verde), *Agave potatorum* (región denotada por la elipse discontinua de color negro), *Agave marmorata* (región denotada por la elipse sombreada de color amarillo), *Agave karwinskii* (región denotada por la elipse continua de color azul) y *Agave americana* 'Oaxacensis' (región denotada por la elipse sombreada de color violeta) de las muestras de *Agave salmiana* de San Luis Potosí (región denotada por la elipse discontinua de color roja). Las elipses fueron denotadas por regiones Hotelling T2 a un nivel de confianza del 95 % para todos los casos.

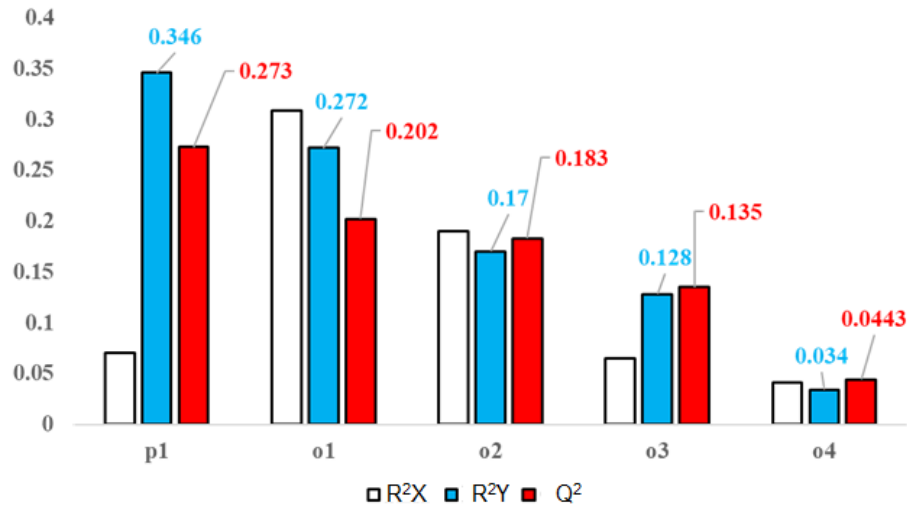


Figura 33. Coeficientes del análisis de permutación del modelo OPLS-DA entre un componente predictivo (p1) y cuatro ortogonales (o1, o2, o3 y o4).

El modelo OPLS-DA generó valores de $R^2Y = 0.95$ (histograma azul) y $Q^2 = 0.837$, estos parámetros representaron la bondad de ajuste del modelo multivariado (R^2) y su predicción (Q^2).

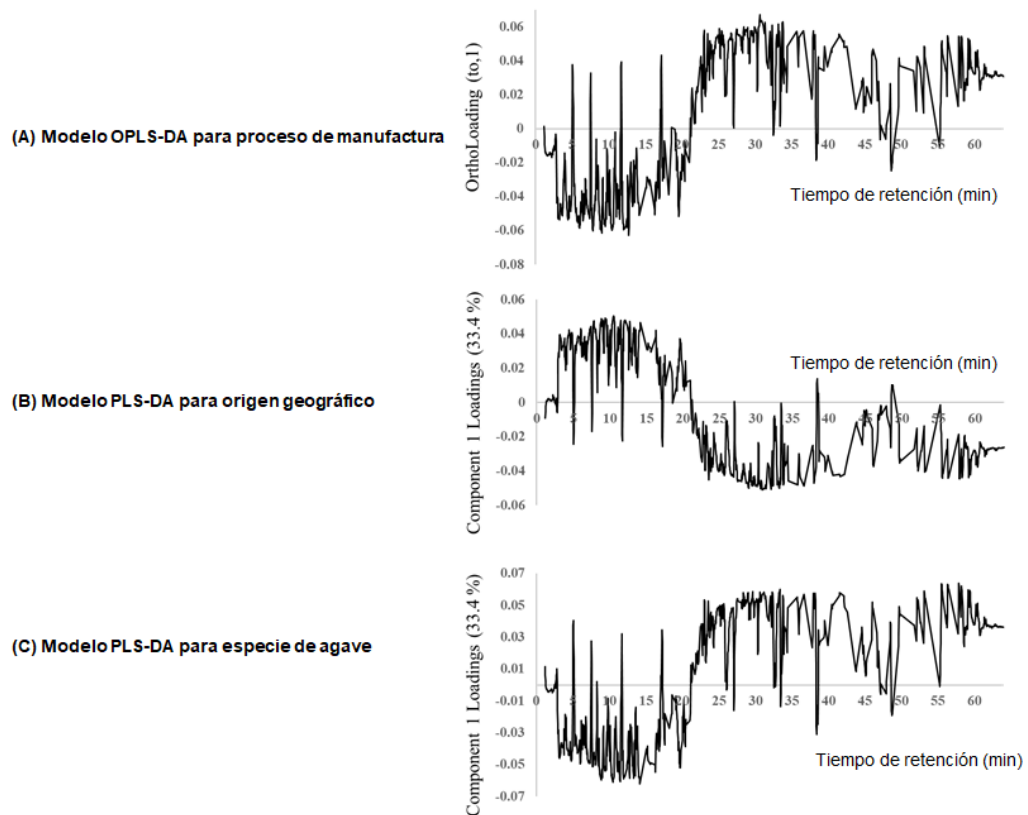


Figura 34. Gráfico de cargas de los modelos OPLS-DA (A) para discriminar entre mezcales ancestrales y artesanales y PLS-DA (B y C) para evaluar origen geográfico y especies de agave, como una función de los tiempos de retención de la cromatografía de gases.

5.4.4 Metabolómica dirigida basada en cromatografía de gases

Los metabolitos volátiles identificados en los mezcales mediante DI-SPME-GC-MS eluyeron a los 4.64, 7.0, 8.15, 8.33, 8.44, 9.81, 10.72, 13.84, 20.33, 32.33, 33.51 y 44.98 minutos (Cuadro 10). En el Cuadro 10 se resumen los valores de cargas del análisis PLS-DA y OPLS-DA para los tres modelos implementados en la matriz de datos de GC para discriminar entre procesos de manufactura, orígenes geográficos y especies de agave.

Interesantemente, los valores de cargas de los metabolitos de mezcales, obtenidos del análisis dirigido, que eluyeron antes de los 20 minutos con el método de separación uno, que a su vez representaron el 66 % de los metabolitos identificados necesarios para discriminar entre procesos de manufactura, orígenes geográficos y especies de agave, presentaron el siguiente comportamiento: i) el alcohol, el furano, los derivados del benceno, así como el 70 % de los ésteres que eluyeron con el método de separación uno presentaron valores de cargas negativos en los modelos usados para discriminar procesos de manufactura (modelo OPLS-DA, Figura 34A y Cuadro 10) y especies de agave (modelo PLS-DA, Figura 34C y Cuadro 10), contrario a los valores de cargas para orígenes geográficos (modelo PLS-DA, Figura 34B y Cuadro 10) que fueron positivos. ii) La tendencia fue similar para alfa-terpineol con excepción que el valor de carga para el factor especie de agave fue 0.0 en lugar de negativo. iii) Todos los metabolitos que eluyeron después de 20 min con el método de separación uno fueron ésteres y presentaron un comportamiento opuesto en sus valores de cargas (Figura 34 y Cuadro 10), valores de cargas positivos para proceso de manufactura y especies de agave; y negativos para origen geográfico.

El Cuadro 10 presenta las notas sensoriales (www.thegoodscentscompany.com) asociadas a cada metabolito identificado (alcohol, ésteres, derivados de benceno, furano y alfa-terpineol). Estos metabolitos podrían ser generados durante las etapas de elaboración del mezcal, específicamente en la cocción del agave (Mancilla-Margalli & López, 2002) y fermentación del mosto (Parish-Virtue

et al., 2021; Verstrepen et al., 2003), o podrían tener su origen en la planta de agave (Peña-Alvarez et al., 2006).

A continuación, en el apartado 5.6.5 se presenta la estrategia implementada para la identificación de los metabolitos mediante una comparación de los perfiles de masa/carga (m/z) de los espectros de masas obtenidos durante la cromatografía de gases con el método de extracción uno (ver materiales y métodos) con respecto a los reportados en la base de datos del NIST.

5.4.5 Perfiles masa/carga obtenidos por GC-EI-MS

La Figura 34 describe los gráficos de cargas obtenidos del análisis estadístico multivariado supervisado, tanto OPLS-DA y PLS-DA. Al graficar las cargas del componente ortogonal ($t_0,1$) del análisis OPLS-DA (Figura 34A) o las cargas del componente uno del análisis PLS-DA (Figuras 34B y 34C) como una función de los tiempos de retención de la GC experimental implementada, es posible elucidar el peso discriminante que los tiempos de retención producen en cada modelo del análisis estadístico multivariado.

La reconstrucción de los cromatogramas de GC en términos de los gráficos de cargas (Figura 34), logró deducir que los metabolitos de los mezcales que eluyeron con el método de separación uno, a los 4.64, 7.0, 8.15, 8.33, 8.44, 9.81, 10.72, 13.84, 20.33, 32.33, 33 51 y 44.98 minutos (Cuadro 10) son discriminantes, ya sea para proceso de manufactura u origen geográfico o especie de agave. Tal como refiere la literatura (Vaniya & Fiehn, 2015), la identificación de metabolitos (mayormente desconocidos o no reportados en bases de datos) es el reto más importante de la metabolómica moderna.

En este trabajo presentamos una estrategia alternativa para confirmar la presencia de metabolitos en los mezcales estudiados con respecto a los compuestos reportados por el Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST), por medio de la comparación entre los perfiles de espectrometría de masas obtenidos por ionización de electrones (EI-MS) y los patrones de m/z de los espectros experimentales para los metabolitos de los mezcales, obtenidos a

tiempos de retención específicos (4.64, 7.0, 8.15, 8.33, 8.44, 9.81, 10.72, 13.84, 20.33, 32.33, 33.51 y 44.98 minutos) con el método de separación uno. Ambos espectros de EI-MS, experimental (gráfico color azul en la Figura 35) y el obtenido del repositorio NIST (gráfico color rojo en la Figura 35) se graficaron como rangos continuos de reflexión especular.

Además, para evaluar la consistencia y la dispersión de los datos de EI-MS, se calculó el coeficiente de correlación de Pearson (r) entre ambos espectros y la desviación estándar (s) de la diferencia entre cada intensidad a un determinado valor de m/z . Los coeficientes de correlación presentaron valores de 0.96 a 0.99, mientras que las desviaciones estándar variaron de 0.29 a 4.69. Con esta propuesta, doce metabolitos fueron identificados en las muestras de mezcal (Cuadro 10): alcohol fenético (tiempo de retención: 7.00 minutos, $s=1.22$, $r=0.99$), octanoato de etilo (tiempo de retención: 8.44 minutos, $s=1.74$, $r=0.98$), acetato fenético (tiempo de retención: 9.81 minutos, $s=0.90$, $r=0.99$), decanoato de etilo (tiempo de retención: 13.84 minutos, $s=1.20$, $r=0.99$), dodecanoato de etilo (tiempo de retención: 20.33 minutos, $s=0.99$, $r=0.99$), ftalato de dibutilo (tiempo de retención: 32.33 minutos, $s=0.29$, $r=0.99$), hexadecanoato de etilo (tiempo de retención: 33.51 minutos, $s=0.53$, $r=0.98$), Bis (2-etilhexilo) adipato (tiempo de retención: 44.98 minutos, $s=1.07$, $r=0.99$), naftaleno (tiempo de retención: 8.15 minutos, $s=0.70$, $r=0.99$), naftaleno-1-metil (tiempo de retención: 10.72 minutos, $s=1.17$, $r=0.99$), 5-metil-2-furfural (tiempo de retención: 4.64 minutos, $s=1.82$, $r=0.99$) y alfa-terpineol (tiempo de retención: 8.33 minutos, $s=4.69$, $r=0.96$).

El alcohol fenético y acetato fenético también se encontraron en mezcales mediante experimentos de resonancia magnética nuclear (López-Aguilar et al., 2021). El alcohol fenético produce notas agradables dulces y florales (Adame-Soto et al., 2019; Huang et al., 2022) y el acetato fenético es relacionado con los descriptores floral y caramelo (Ruiz et al., 2016). Los alcoholes superiores y los ésteres de etilo y de acetato se forman por el metabolismo de las levaduras durante la fermentación (Cortés et al., 2011), por esto, la cepa de levadura es

uno de los factores más importantes que afectan la producción de ésteres (Lin et al., 2022; Verstrepen et al., 2003); por otro lado, la calidad sensorial del destilado disminuye conforme aumenta el número de carbonos del éster (Silva et al., 2019). Los ésteres, que fueron los principales metabolitos identificados, son conocidos por su relación con descriptores afrutados y florales (Botello-Álvarez et al., 2007). El dodecanoato de etilo es un éster que puede ser empleado como marcador para discriminar entre especies de agave (Vera-Guzmán et al., 2009).

Los ftalatos son plastificantes que pueden migrar de los materiales que contienen a la bebida como el mezcal. Aunque no causan cambios pronunciados en el sabor y aroma, su presencia indica contaminación (Bertrand & Belouqui, 2009). En general, los ésteres de ftalato son líquidos claros y algunos presentan leve aroma dulce. El ftalato de dibutilo ha sido reportado en tequila (Balderas-Hernández et al., 2020) que también es una bebida alcohólica de agave.

El naftaleno fue reportado en bebidas alcohólicas de agave como bacanora, raicilla, tequila (Léon-Rodríguez et al., 2008) y mezcal (Vera-Guzmán et al., 2009) y el naftaleno-1-metil se reportó en sotol (De la Garza et al., 2010), que es un destilado con proceso similar al tequila y mezcal. En cuanto al 5-metil-2-furfural (MF), se trata de un compuesto producido durante la cocción de las piñas de agave y formado por reacción de Maillard (Mancilla-Margalli & López, 2002). Aunque la presencia de furanos como el MF en destilados es asociado, principalmente, con riesgos a la salud humana (Jafari & Khayamian, 2009), su importancia se debe a su contribución al perfil sensorial, al impartir notas aromáticas a nuez y picantes (Ruiz et al., 2016).

Los terpenos tienen su origen de la planta de agave, los cuales son transformados durante la fermentación, destilación y añejamiento (Peña-Alvarez et al., 2006). El compuesto alfa-terpineol ha sido identificado previamente en mezcal (Vera-Guzmán et al., 2018).

Cuadro 10. Valores de cargas para el componente uno del análisis PLS-DA (origen geográfico y especie de agave) y valores de cargas para un componente ortogonal del análisis OPLS-DA (proceso de manufactura) para cada compuesto identificado, el tiempo de retención en el cual eluyó (rt), con su nota sensorial y la fuente de formación del metabolito (planta de agave, cocción del agave y fermentación del mosto).

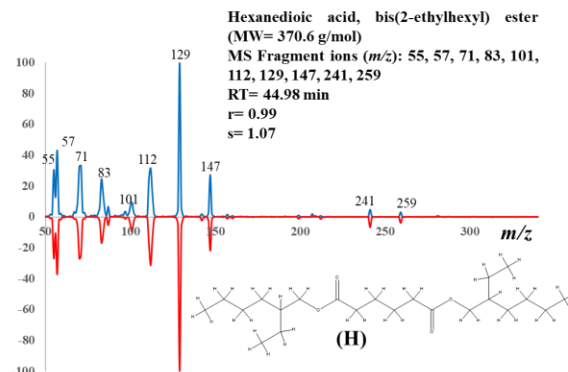
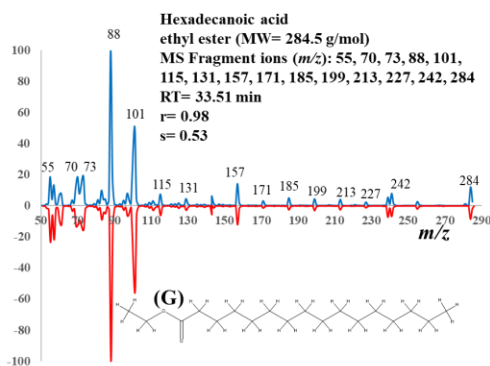
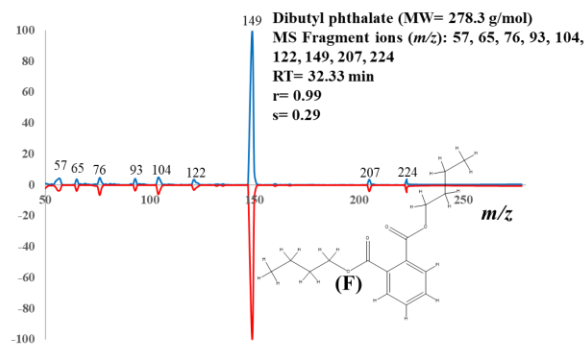
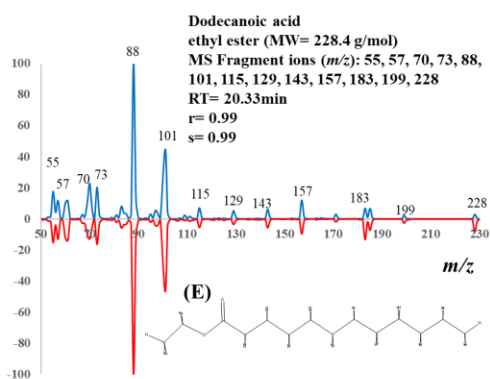
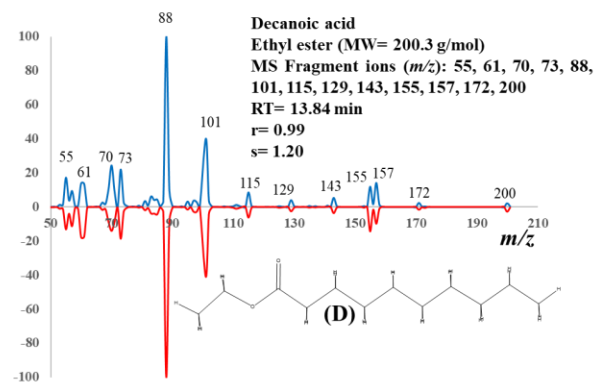
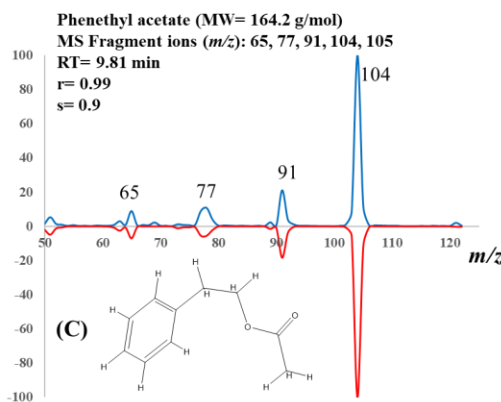
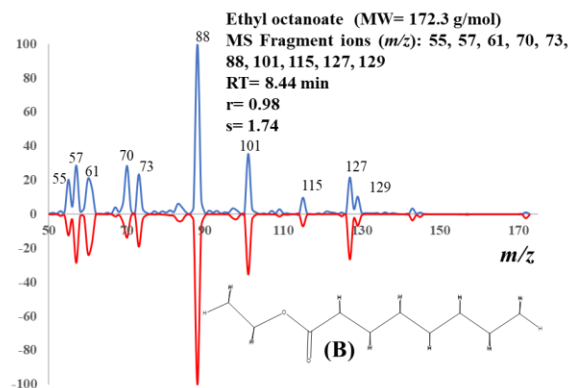
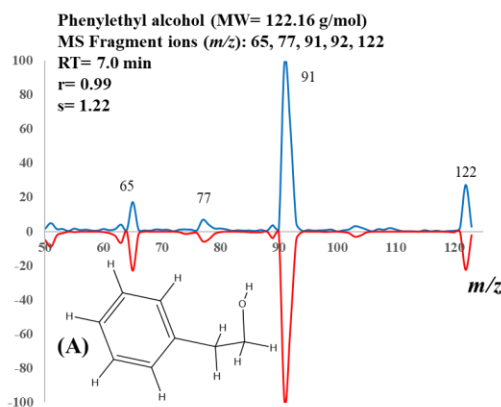
Compuesto (No. NIST)	rt (min)	Origen geográfico	Especie	Proceso de manufactura	Nota sensorial	Fuerza odorífera	Fuente
Alcohol							
Alcohol fenetílico (118543) ^{a,z}	7.00	0.04	-0.05	-0.04	Rosas/miel/dulce ^m	Medio	Proceso/fermentación w, x
Ésteres							
Octanoato de etilo (229103) ^b	8.44	0.03	-0.04	-0.03	Plátano/cera ⁿ	Medio	Proceso/fermentación w, x
Acetato fenetílico (228405) ^c	9.81	0.01	-0.01	-0.01	Floral/miel ^o	Medio	
Decanoato de etilo (229107) ^d	13.84	0.01	-0.03	-0.01	Manzana/cera ^p	Medio	
Dodecanoato de etilo (229100) ^e	20.33	0.02	-0.03	-0.02	Afrutado/cera/jabonoso ^q	Medio	
Ftalato de dibutilo (114974) ^f	32.33	-0.04	0.05	0.05	No reportado	No reportado	Contaminación ^y
Hexadecanoato de etilo (233204) ^g	33.51	-0.01	0.00	0.01	Afrutado/cera/mantecoso ^t	Bajo	Proceso/fermentación w, x
Bis (2-etilhexilo) adipato (291314) ^h	44.98	-0.01	0.02	0.02	No reportado	No reportado	Contaminación ^{aa}
Derivados del benceno							
Naftaleno (228342) ⁱ	8.15	0.04	-0.05	-0.04	Resina/pungente ^s	No reportado	No reportado
Naftaleno-1-metil (291511) ⁱ	10.72	0.02	-0.03	-0.02	Medicina/químico ^t	No reportado	No reportado
Furano							
5-metil-2-furfural (233793) ^k	4.64	0.03	-0.04	-0.04	Caramelo/picante ^u	Medio	Proceso/cocción ^{ab}
Terpeno							
α-terpineol (114833) ^l	8.33	0.01	0.00	-0.01	Floral/cítrico ^v	No reportado	Planta de agave ^{ac}

Continuación Cuadro 10

^z Referencia:

- ^a <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C60128&Units=SI&Mask=200#Mass-Spec>
- ^b <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C106321&Units=SI&Mask=200#Mass-Spec>
- ^c <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C103457&Units=SI&Mask=200#Mass-Spec>
- ^d <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C110383&Units=SI&Mask=200#Mass-Spec>
- ^e <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C106332&Units=SI&Mask=200#Mass-Spec>
- ^f <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C84742&Units=SI&Mask=200#Mass-Spec>
- ^g <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C628977&Units=SI&Mask=200#Mass-Spec>
- ^h <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C103231&Units=SI&Mask=200#Mass-Spec>
- ⁱ <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C91203&Units=SI&Mask=200#Mass-Spec>
- ^j <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C90120&Units=SI&Mask=200#Mass-Spec>
- ^k <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C620020&Units=SI&Mask=200#Mass-Spec>
- ^l <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C98555&Units=SI&Mask=200#Mass-Spec>
- ^m <http://www.thegoodscentcompany.com/data/rw1010051.htm>
- ⁿ <http://www.thegoodscentcompany.com/data/rw1056351.html>
- ^o <http://www.thegoodscentcompany.com/data/rw1010031.html>
- ^p <http://www.thegoodscentcompany.com/data/rw1015411.html>
- ^q <http://www.thegoodscentcompany.com/data/rw1012432.html>
- ^r <http://www.thegoodscentcompany.com/data/rw1008251.html>
- ^s <http://www.thegoodscentcompany.com/data/rw1268211.html>
- ^t <http://www.thegoodscentcompany.com/data/rw1008021.html>
- ^u <http://www.thegoodscentcompany.com/data/rw1032681.html>
- ^v <http://www.thegoodscentcompany.com/data/rw1011252.html>
- ^w Verstrepen et al. (2003)
- ^x Parish-Virtue et al. (2021)
- ^y Pang et al. (2017)
- ^{aa} Fasano et al. (2012)
- ^{ab} Mancilla-Margalli & López (2002)
- ^{ac} Peña-Alvarez et al. (2006)

En el Cuadro 10 se observa que el 5-metil-2-furfural, el alcohol fenético y los ésteres (octanoato de etilo, acetato fenético, decanoato de etilo y dodecanoato de etilo) se reportan con un valor medio de fuerza odorífera, únicamente el hexadecanoato de etilo presenta baja capacidad odorífera. A pesar de este comportamiento, su presencia es relevante por la sinergia que producen entre ellos para generar el aroma y sabor del mezcal (De León-Rodríguez et al., 2008). Las bebidas alcohólicas son matrices complejas que varían en composición (Thibodeau & Pickering, 2021), lo que influye en la percepción sensorial. Por lo tanto, se infiere que el metaboloma volátil encontrado en este estudio es responsable del sabor y aroma del mezcal, y está directamente relacionado con la especie de agave, los procesos de cocción, fermentación y destilación, todo ésto ligado a las características distintivas de cada región mezcalera (Chavez-Parga et al., 2016; Gómez-Zamora et al., 2016; Peña-Alvarez et al., 2006; Villarreal-Morales et al., 2018).



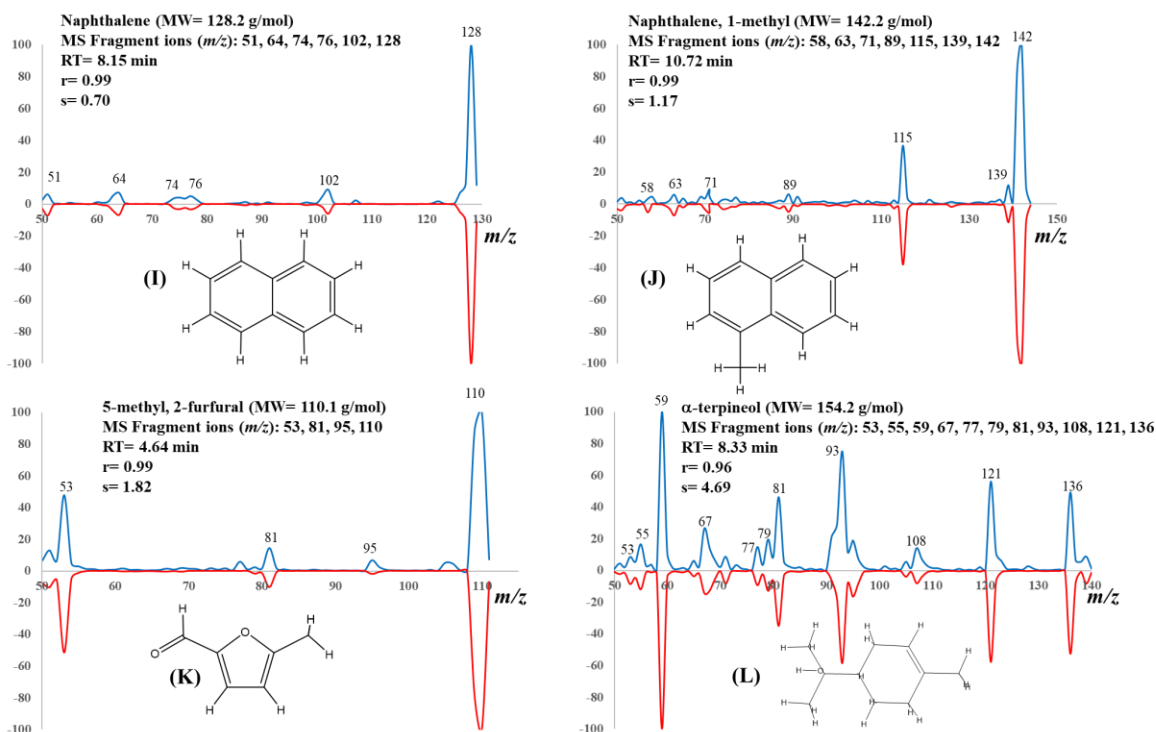


Figura 35. Rango continuo de reflexión especular entre el patrón de fragmentación de m/z experimental (gráfico azul) con respecto al patrón de fragmentación de m/z obtenido de la base de datos del NIST (gráficos rojos) para 12 metabolitos identificados mediante experimentos de EI-GC-MS.

r : es el coeficiente de correlación Pearson (r) entre ambos espectros.

s : es la desviación estándar de la diferencia entre cada intensidad relativa a un valor de m/z particular.

5.5 Conclusiones

El método de separación de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas se implementó para la obtención de cromatogramas explotables que después se emplearon en el análisis metabolómico dirigido y no dirigido, asimismo las matrices de datos se emplearon para el establecimiento de perfiles y la identificación de metabolitos discriminantes que permitieron diferenciar entre procesos de manufactura ancestrales y artesanales de mezcales, elaborados con las seis especies de agave más comerciales: *A. potatorum*, *A. angustifolia*, *A. karwinskii*, *A. salmiana*, *A. marmorata* y *A. americana* 'Oaxacensis', procedentes de San Luis Potosí y Oaxaca. Doce metabolitos se identificaron de los gráficos de cargas de los modelos de análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) y por mínimos cuadrados parciales ortogonales (OPLS-DA), estos compuestos fueron confirmados con su análisis de perfil de masas

mediante una imagen espejo con los datos de espectrometría de masas obtenidos por ionización de electrones (EI-MS). Los coeficientes de correlación de Pearson presentaron valores en un rango de 0.96 a 0.99, mientras que sus correspondientes desviaciones estándar estuvieron entre 0.29 a 4.69. Ambos parámetros son indicadores de una correlación aceptable entre los espectros experimentales y los obtenidos del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST). Debido a su facilidad y viabilidad de implementación en los laboratorios de investigación y de control, el presente método podría servir como punto de partida para implementar el control en la denominación de origen en bebidas representativas a lo largo de las diferentes regiones en tanto no exista un enfoque metabolómico para certificar denominaciones específicas.

5.6 Literatura citada

- Adame-Soto, P. J., Aréchiga-Carvajal, E. T., López, M. G., González-Herrera, S. M., Moreno-Jiménez, M. R., Urtiz-Estrada, N., & Rutiaga-Quñones, O. M. (2019). Potential production of 2-phenylethanol and 2-phenylethylacetate by non-Saccharomyces yeasts from Agave durangensis. *Annals of Microbiology*, 69(9), 989–1000. <https://doi.org/10.1007/s13213-019-01489-0>
- Balderas-Hernández, V. E., Ornelas-Salas, J. T., Barba de la Rosa, A. P., & De León-Rodríguez, A. (2020). Diminution of migration of phthalic acid esters in tequila beverage by the year of production. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 55(2), 148–154. <https://doi.org/10.1080/03601234.2019.1674103>
- Bertrand, A., & Beloqui, A. A. (2009). Aromatic Spoilage of Wines by Raw Materials and Enological Products. In *Wine Chemistry and Biochemistry* (pp. 595–613). https://doi.org/10.1007/978-0-387-74118-5_26
- Botello-Álvarez, J. E., Estrada-Baltazar, A., Jiménez-Islas, H., Rico-Martínez, R., Navarrete-Bolaños, J. L., Cárdenas-Manríquez, M., & Molina-Guerrero, J. A. (2007). Compuestos volátiles en el mezcal. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 6(1), 41–50. Retrieved from <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=62060106>
- Castañeda-Nava, J. J., Rodríguez-Domínguez, J. M., Camacho-Ruiz, R. M.,

- Gallardo-Valdez, J., Villegas-García, E., & Gutiérrez-Mora, A. (2019). Morphological comparison among populations of *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck (Asparagaceae), a species used for mezcal production in Mexico. *Flora*, 255, 18–23. <https://doi.org/10.1016/J.FLORA.2019.03.019>
- Chavez-Parga, M. D. C., Pérez Hernández, E., & González Hernández, J. C. (2016). Revisión del agave y el mezcal. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 18(1). <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v18n1.49552>
- Chong, J., Wishart, D. S., & Xia, J. (2019). Using MetaboAnalyst 4.0 for Comprehensive and Integrative Metabolomics Data Analysis. *Current Protocols in Bioinformatics*, 68(1). <https://doi.org/10.1002/cpbi.86>
- Cortés, S., Rodríguez, R., Salgado, J. M., & Domínguez, J. M. (2011). Comparative study between Italian and Spanish grape marc spirits in terms of major volatile compounds. *Food Control*, 22(5), 673–680. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.09.006>
- Cozzolino, D., Power, A., & Chapman, J. (2019). Interpreting and Reporting Principal Component Analysis in Food Science Analysis and Beyond. *Food Analytical Methods*, 12(11), 2469–2473. <https://doi.org/10.1007/s12161-019-01605-5>
- Dasenaki, M. E., Drakopoulou, S. K., Aalizadeh, R., & Thomaidis, N. S. (2019). Targeted and Untargeted Metabolomics as an Enhanced Tool for the Detection of Pomegranate Juice Adulteration. *Foods*, 8(6), 212. <https://doi.org/10.3390/foods8060212>
- De la Garza, H., Buenrostro, J., Reyes-Vega, M., Rodríguez, R., Martínez, D., & Aguilar, C. (2010). Chemical Profile of Sotol Analyzed by Solid Phase Microextraction-Gas Chromatography. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 5(3), 261–268. <https://doi.org/10.3844/ajabssp.2010.261.268>
- De León-Rodríguez, A., Escalante-Minakata, P., Jiménez-García, M. I., Ordoñez-Acevedo, L. G., Flores, J. L. F., & de la Rosa, A. P. B. (2008). Characterization of Volatile Compounds from Ethnic Agave Alcoholic Beverages by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Food Technology*

and Biotechnology, 46, 448–455.

- Del Barrio-Galán, R., Valle-Herrero, H. del, Bueno-Herrera, M., López-de-la-Cuesta, P., & Pérez-Magariño, S. (2021). Volatile and Non-Volatile Characterization of White and Rosé Wines from Different Spanish Protected Designations of Origin. *Beverages*, 7(3), 49. <https://doi.org/10.3390/beverages7030049>
- Esteki, M., Simal-Gandara, J., Shahsavari, Z., Zandbaaf, S., Dashtaki, E., & Vander Heyden, Y. (2018). A review on the application of chromatographic methods, coupled to chemometrics, for food authentication. *Food Control*, 93, 165–182. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.06.015>
- Fasano, E., Bono-Blay, F., Cirillo, T., Montuori, P., & Lacorte, S. (2012). Migration of phthalates, alkylphenols, bisphenol A and di(2-ethylhexyl)adipate from food packaging. *Food Control*, 27(1), 132–138. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.03.005>
- Franitza, L., Nicolotti, L., Granvogl, M., & Schieberle, P. (2018). Differentiation of Rums Produced from Sugar Cane Juice (Rhum Agricole) from Rums Manufactured from Sugar Cane Molasses by a Metabolomics Approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(11), 3038–3045. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b00180>
- García-Espejel, A., Rodríguez-Barrera, A., García-Ramírez, G., & Cuevas-Reyes, V. (2019). *Innovación en la cadena agroindustrial de mezcal en tres municipios en Oaxaca, México*. Retrieved from <https://www.redalyc.org/articulo.oa?>
- Gaytán, M. S. (2018). The perils of protection and the promise of authenticity: Tequila, mezcal, and the case of NOM 186. *Journal of Rural Studies*, 58, 103–111. <https://doi.org/10.1016/J.JRURSTUD.2017.12.017>
- Gómez-Zamora, O., De Jesús-Fuentes, K. I., Peñafiel-López, F., & Tovar-Hernández, P. (2016). Perfil químico y organoléptico de los compuestos volátiles del mezcal. *Investigación y Desarrollo En Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 1(1), 916–923. Retrieved from <http://www.fcb.uanl.mx/IDCyTA/files/volume1/1/10/158.pdf>

- Herbert-Pucheta, J. E., Lozada-Ramírez, J. D., Ortega-Regules, A. E., Hernández, L. R., & Anaya de Parrodi, C. (2021). Nuclear Magnetic Resonance Metabolomics with Double Pulsed-Field-Gradient Echo and Automatized Solvent Suppression Spectroscopy for Multivariate Data Matrix Applied in Novel Wine and Juice Discriminant Analysis. *Molecules*, 26(14), 4146. <https://doi.org/10.3390/molecules26144146>
- Hernández-López, J. J. (2018). El mezcal como patrimonio social: de indicaciones geográficas genéricas a denominaciones de origen regionales. *Em Questão*, 24(2), 404. <https://doi.org/10.19132/1808-5245242.404-433>
- Huang, J., Wang, Y., Ren, Y., Wang, X., Li, H., Liu, Z., Yue, T., & Gao, Z. (2022). Effect of inoculation method on the quality and nutritional characteristics of low-alcohol kiwi wine. *LWT*, 156, 113049. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.113049>
- Huang, L., Wu, M., Zhong, K., Sun, X., Liang, Y., Dai, Y., Huang, K., & Guo, F. Q. (2007). Fingerprint developing of coffee flavor by gas chromatography–mass spectrometry and combined chemometrics methods. *Analytica Chimica Acta*, 588(2), 216–223. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.02.013>
- Jafari, M. T., & Khayamian, T. (2009). Simultaneous Determination of 2-Furfural and 5-Methyl-2-furfural Using Corona Discharge Ion Mobility Spectrometry. *Analytical Sciences*, 25(6), 801–805. <https://doi.org/10.2116/analsci.25.801>
- Jaramillo-Villanueva, J. L. (2018). Tipología de las unidades de producción de mezcal artesanal del distrito de Tlacolula, Oaxaca, México. *Agro Productividad*, 11(12). <https://doi.org/10.32854/agrop.v11i12.1309>
- Jumtee, K., Komura, H., Bamba, T., & Fukusaki, E. (2011). Predication of Japanese green tea (Sen-cha) ranking by volatile profiling using gas chromatography mass spectrometry and multivariate analysis. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 112(3), 252–255. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2011.05.008>
- Kirchmayr, M. R., Segura-García, L. E., Lappe-Oliveras, P., Moreno-Terrazas, R., de la Rosa, M., & Gschaedler Mathis, A. (2017). Impact of environmental conditions and process modifications on microbial diversity, fermentation

- efficiency and chemical profile during the fermentation of Mezcal in Oaxaca. *LWT - Food Science and Technology*, 79, 160–169. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.12.052>
- Lin, M. M.-H., Boss, P. K., Walker, M. E., Sumby, K. M., & Jiranek, V. (2022). Influence of *Kazachstania* spp. on the chemical and sensory profile of red wines. *International Journal of Food Microbiology*, 362, 109496. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109496>
- Lira, M. G., Davidson-Hunt, I. J., & Robson, J. P. (2022). Artisanal Products and Land-Use Land-Cover Change in Indigenous Communities: The Case of Mezcal Production in Oaxaca, Mexico. *Land*, 11(3), 387. <https://doi.org/10.3390/land11030387>
- López-Aguilar, R., Zuleta-Prada, H., Hernández-Montes, A., & Herbert-Pucheta, J. E. (2021). Comparative NMR Metabolomics Profiling between Mexican Ancestral & Artisanal Mezcals and Industrialized Wines to Discriminate Geographical Origins, Agave Species or Grape Varieties and Manufacturing Processes as a Function of Their Quality Attributes. *Foods*, 10(1), 157. <https://doi.org/10.3390/foods10010157>
- Mahr, D. (2015). Production of Artisanal Mezcal, Tequila's Sassy Little Sister. *Cactus and Succulent Journal*, 87(1), 4–14. <https://doi.org/10.2985/015.087.0102>
- Mancilla-Margalli, N. A., & López, M. G. (2002). Generation of Maillard Compounds from Inulin during the Thermal Processing of *Agave tequilana* Weber Var. azul. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(4), 806–812. <https://doi.org/10.1021/jf0110295>
- Martínez, S., Nuñez-Guerrero, M.E., Gurrola-Reyes, J.N., Rutiaga-Quiñones, O.M., Paredes-Ortíz, A., Soto, O.N., Flores-Gallegos, A.C., & Rodríguez-Herrera, R. (2019). Mescal an Alcoholic Beverage From Agave spp. With Great Commercial Potential. In *Alcoholic Beverages* (pp. 113–140). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815269-0.00004-0>
- Menezes Filho, A., dos Santos, F. N., & de Paula Pereira, P. A. (2010). Development, validation and application of a methodology based on solid-

- phase micro extraction followed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (SPME/GC–MS) for the determination of pesticide residues in mangoes. *Talanta*, 81(1–2), 346–354. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.12.008>
- NOM-070-SCFI-2016. Bebidas Alcohólicas-Mezcal-Especificaciones. Retrieved December 7, 2020, from http://www.dof.gob.mx/normasOficiales/6437/seeco11_C/seeco11_C.html
- Pang, X., Li, Z.-J., Chen, J.-Y., Gao, L.-J., & Han, B.-Z. (2017). A Comprehensive Review of Spirit Drink Safety Standards and Regulations from an International Perspective. *Journal of Food Protection*, 80(3), 431–442. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-16-319>
- Pang, Z., Chong, J., Zhou, G., Morais, D.A., Chang, L., Barrette, M., Gauthier, C., Jacques, P., Li, S., & Xia, J. (2021). MetaboAnalyst 5.0: narrowing the gap between raw spectra and functional insights. *Nucleic Acids Research*, 49(W1), W388–W396. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab382>
- Parish-Virtue, K., Herbst-Johnstone, M., Bouda, F., Fedrizzi, B., Deed, R. C., & Kilmartin, P. A. (2021). Aroma and Sensory Profiles of Sauvignon Blanc Wines from Commercially Produced Free Run and Pressed Juices. *Beverages*, 7(2), 29. <https://doi.org/10.3390/beverages7020029>
- Peña-Alvarez, A., Capella, S., Juárez, R., & Labastida, C. (2006). Determination of terpenes in tequila by solid phase microextraction-gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1134(1–2), 291–297. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.09.005>
- Pomyen, Y., Wanichthanarak, K., Pounsombat, P., Fahrman, J., Grapov, D., & Khoomrung, S. (2020). Deep metabolome: Applications of deep learning in metabolomics. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 18, 2818–2825. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.09.033>
- Rios-Colín, A. C., Ruiz-Vega, J., Silva-Rivera, M. E., Caballero-Caballero, M., & Montes-Bernabé, J. L. (2022). Evaluación longitudinal de la sustentabilidad del subsistema de producción maguey-mezcal artesanal, en el municipio de Villa Sola de Vega, Oaxaca, México. *Tropical and Subtropical*

- Agroecosystems*, 25(1). <https://doi.org/10.56369/tsaes.4105>
- Ruiz, M. J., Moyano, L., & Zea, L. (2016). Sweet Wines Produced by an Innovative Winemaking Procedure: Colour, Active Odorants and Sensory Profile. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 35(2). <https://doi.org/10.21548/35-2-1007>
- Silva, A. P., Voss, H.-P., van Zyl, H., Hogg, T., de Graaf, C., Pintado, M., & Jager, G. (2019). Effect of adding hop aroma in beer analysed by temporal dominance of sensations and emotions coupled with temporal liking. *Food Quality and Preference*, 75, 54–63. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2019.02.001>
- Souza-Gonzaga, L., Bastian, S. E. P., Capone, D. L., Danner, L., & Jeffery, D. W. (2022). Consumer perspectives of wine typicity and impact of region information on the sensory perception of Cabernet Sauvignon wines. *Food Research International*, 152, 110719. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110719>
- Springer, A. E., Riedl, J., Esslinger, S., Roth, T., Glomb, M. A., & Fauhl-Hassek, C. (2014). Validated Modeling for German White Wine Varietal Authentication Based on Headspace Solid-Phase Microextraction Online Coupled with Gas Chromatography Mass Spectrometry Fingerprinting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(28), 6844–6851. <https://doi.org/10.1021/jf502042c>
- Stupak, M., Goodall, I., Tomaniova, M., Pulkrabova, J., & Hajslova, J. (2018). A novel approach to assess the quality and authenticity of Scotch Whisky based on gas chromatography coupled to high resolution mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 1042, 60–70. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.09.017>
- Szymańska, E., Saccenti, E., Smilde, A. K., & Westerhuis, J. A. (2012). Double-check: validation of diagnostic statistics for PLS-DA models in metabolomics studies. *Metabolomics*, 8(S1), 3–16. <https://doi.org/10.1007/s11306-011-0330-3>
- Tapp, H. S., Defernez, M., & Kemsley, E. K. (2003). FTIR Spectroscopy and Multivariate Analysis Can Distinguish the Geographic Origin of Extra Virgin

- Olive Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(21), 6110–6115.
<https://doi.org/10.1021/jf030232s>
- Thibodeau, M., & Pickering, G. (2021). Perception of Aqueous Ethanol Binary Mixtures Containing Alcohol-Relevant Taste and Chemesthetic Stimuli. *Beverages*, 7(2), 23. <https://doi.org/10.3390/beverages7020023>
- Thibodeau, M., & Pickering, G. J. (2019). The role of taste in alcohol preference, consumption and risk behavior. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(4), 676–692. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1387759>
- Trejo, L., Limones, V., Peña, G., Scheinvar, E., Vargas-Ponce, O., Zizumbo-Villarreal, D., & Colunga-GarcíaMarín, P. (2018). Genetic variation and relationships among agaves related to the production of Tequila and Mezcal in Jalisco. *Industrial Crops and Products*, 125, 140–149. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2018.08.072>
- Vaniya, A., & Fiehn, O. (2015). Using fragmentation trees and mass spectral trees for identifying unknown compounds in metabolomics. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 69, 52–61. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.04.002>
- Vázquez-Pérez, N., Blancas, J., Torres-García, I., García-Mendoza, A., Casas, A., Moreno-Calles, A. I., Maldonado-Almanza, B., & Rendón-Aguilar, B. (2020). Conocimiento y manejo tradicional de Agave karwinskii en el sur de México. *Botanical Sciences*, 98(2), 328–347. <https://doi.org/10.17129/botsci.2421>
- Vera-Guzmán, A., Guzmán-Gerónimo, R., & López, M. (2010). Major and Minor Compounds in a Mexican Spirit, Young Mezcal Coming from Two Agave Species. In *Czech J. Food Sci* (Vol. 28).
- Vera-Guzmán, A., Guzmán-Gerónimo, R., López, M., & Chávez-Servia, J. (2018). Volatile Compound Profiles in Mezcal Spirits as Influenced by Agave Species and Production Processes. *Beverages*, 4(1), 9. <https://doi.org/10.3390/beverages4010009>
- Vera-Guzmán, A., Santiago-García, P., & López, M. (2009). Compuestos volátiles aromáticos generados durante la elaboración de Mezcal de Agave angustifolia Y Agave potatorum. In *Artículo Científico Rev. Fitotec. Mex* (Vol.

32).

- Verdugo-Valdez, A., Segura-Garcia, L., Kirchmayr, M., Ramírez-Rodríguez, P., González-Esquinca, A., Coria, R., & Gschaedler-Mathis, A. (2011). Yeast communities associated with artisanal mezcal fermentations from Agave salmiana. *Antonie van Leeuwenhoek*, 100(4), 497–506. <https://doi.org/10.1007/s10482-011-9605-y>
- Verstrepen, K. J., Derdelinckx, G., Dufour, J.-P., Winderickx, J., Thevelein, J. M., Pretorius, I. S., & Delvaux, F. R. (2003). Flavor-active esters: Adding fruitiness to beer. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 96(2), 110–118. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(03\)90112-5](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(03)90112-5)
- Villanueva-Rodriguez, S., & Escalona-Buendia, H. (2012). Tequila and mezcal: sensory attributes and sensory evaluation. *Alcoholic Beverages*, 359–378. <https://doi.org/10.1533/9780857095176.3.359>
- Villarreal-Morales, S. L., Montañez-Saenz, J. C., Aguilar-González, C. N., & Rodriguez-Herrera, R. (2018). Metagenomics of Traditional Beverages. In *Advances in Biotechnology for Food Industry* (pp. 301–326). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811443-8.00011-6>
- Wilson, A., Johnson, J. B., Batley, R., Lal, P., Wakeling, L., & Naiker, M. (2021). Authentication Using Volatile Composition: A Proof-of-Concept Study on the Volatile Profiles of Fourteen Queensland Ciders. *Beverages*, 7(2), 28. <https://doi.org/10.3390/beverages7020028>
- Worley, B., & Powers, R. (2016). PCA as a Practical Indicator of OPLS-DA Model Reliability. *Current Metabolomics*, 4(2), 97–103. <https://doi.org/10.2174/2213235X04666160613122429>

6. DESCRIPCIÓN SENSORIAL DE MEZCAL OAXAQUEÑO PROVENIENTE DE TRES ESPECIES DE AGAVE

Resumen

Los mezcales artesanales y ancestrales de Oaxaca se describieron sensorialmente mediante pruebas Napping y análisis descriptivo cuantitativo (QDA). Las pruebas Napping se realizaron con panelistas no entrenados y los resultados ayudaron de manera exploratoria a caracterizar diez muestras de mezcal elaboradas con *Agave potatorum*, *Agave angustifolia* y *Agave karwinskii*. En el análisis descriptivo cuantitativo, los panelistas recibieron entrenamiento para generar once atributos que describieron el aroma y sabor de los mezcales. Se realizó un análisis de regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS-R tipo dos) para conocer la relación entre los descriptores sensoriales y las variables químicas; los resultados indicaron que los ésteres aportan principalmente notas florales a los mezcales elaborados con *A. potatorum*; los alcoholes superiores (1-butanol y 2-butanol) se relacionaron con el atributo ardiente presente en el mezcal de *A. angustifolia* y el éster ftalato de dibutilo identificado en el mezcal elaborado con *A. karwinskii* correlacionó con el descriptor ahumado.

Palabras clave: mezcal, sensorial, Napping, QDA, éster, floral, *Agave potatorum*, *Agave angustifolia*, *Agave karwinskii*.

SENSORY DESCRIPTION OF OAXACAN MEZCAL MANUFACTURED WITH THREE AGAVE'S SPECIES

Abstract

Napping tests and quantitative descriptive analysis (QDA) were performed to characterize the sensory attributes of artisanal and ancestral mezcals from Oaxaca. The Napping tests were implemented with a group of untrained panelists and the results helped us to characterize, in an exploratory way, ten samples of mezcals manufactured with *Agave potatorum*, *Agave angustifolia* and *Agave karwinskii*. In the quantitative descriptive analysis, the panelists were trained to generate eleven attributes that described the aroma and taste of the mezcals. A partial least squares regression analysis (type two PLS-R) was performed to determine the relationship between sensory descriptors and chemical variables. The results indicated that the esters contribute floral notes to mezcals made with *A. potatorum*; the higher alcohols (1-butanol and 2-butanol) were related with the burning sensation present in the mezcal of *A. angustifolia* and the dibutyl phthalate ester identified in the mezcal made with *A. karwinskii* correlated with the smoked descriptor

Key words: mezcal, sensory, Napping, QDA, ester, floral, *Agave potatorum*, *Agave angustifolia*, *Agave karwinskii*.

6.1 Introducción

El sabor y aroma del mezcal es producto de numerosos compuestos volátiles, los cuales están en función de la especie de agave, los procesos de cocción, la fermentación de las cabezas de agave y la destilación. El mezcal es una bebida con denominación de origen por lo que resulta importante conocer el perfil sensorial para usarlo como complemento dentro del marco de la normatividad mexicana (Gómez-Zamora et al., 2016; Vera-Guzmán et al., 2009; Villarreal-Morales et al., 2018).

La ciencia sensorial apoyada de métodos estadísticos proporciona información objetiva sobre los consumidores de un producto, la aceptación o el rechazo de los estímulos y la descripción de las emociones evocadas (Marques et al., 2022). Una de las técnicas implementadas en evaluación sensorial es la prueba Napping que se emplea ampliamente por ser un método rápido y adecuado para estudios exploratorios que implican caracterización de un producto; además puede aplicarse con un número pequeño de evaluadores tanto entrenados como no entrenados (Giacalone et al., 2013; Reinbach et al., 2014) aunque generalmente los jueces no entrenados suelen emplearse para conocer si existe alguna diferencia entre las muestras evaluadas (Curtis, 2013).

Para el procesamiento de los datos Napping puede emplearse la prueba statis la cual permite una exploración gráfica de las asociaciones entre las muestras (Kroonenberg, 2008) o el análisis factorial múltiple (MFA) (Pagès, 2014). Ambas pruebas estadísticas se basan en relaciones lineales entre variables (Josse & Holmes, 2016), por lo que una forma de evaluar la calidad del modelo es mediante el coeficiente de correlación RV. Los coeficientes RV reflejan la homogeneidad entre las configuraciones y toman valores entre cero y uno por lo que valores por arriba de 0.9 indican alta similaridad configuracional (Giacalone et al., 2020), en una prueba Napping los panelistas son considerados configuraciones.

Los datos de la prueba Napping son digitalizados usando un sistema de coordenadas, cuyo origen se indica en una de las esquinas de la hoja de papel

(esquina inferior derecha), e ingresados a una matriz de datos con los productos como filas, y las coordenadas X y Y como columnas (Giacalone et al., 2016). Finalmente, como la técnica Napping es una tarea de ordenamiento entonces se les solicita a los evaluadores, una vez que han alcanzado la configuración final, agregar una lista de atributos que ellos consideren adecuados para describir las muestras (Giacalone et al., 2020).

Por otro lado, el análisis descriptivo cuantitativo (QDA) consiste de dos fases principales: la fase de entrenamiento y la fase de prueba (Peltier et al., 2018). La primera fase también es denominada fase cualitativa puesto que el objetivo principal es generar los descriptores que se evaluarán en la fase de prueba, esta última también denominada fase cuantitativa porque es en esta etapa donde se medirá la intensidad de cada atributo generado (Castro-Marín et al., 2021). Por ello, el fundamento del QDA, a través de un panel entrenado, es medir los atributos de un producto que permitan obtener una descripción cuantitativa y que la información generada sea analizada estadísticamente (Puri et al., 2016).

El QDA ha sido implementado en licor de arroz (Heo et al., 2020), licor de melón (Hernández-Gómez et al., 2005), whisky (Daute et al., 2021), cerveza (Castro-Marín et al., 2021) y vino (Parish-Virtue et al., 2021). El procesamiento de los datos incluye análisis de varianza con comparaciones de medias, análisis multivariado como PCA (Principal components analysis) y análisis factorial múltiple, así como modelos de regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS-R) (Issa-Issa et al., 2021; Parish-Virtue et al., 2021; Putri et al., 2021).

La regresión por mínimos cuadrados parciales es un método para relacionar dos matrices de datos, X y Y, mediante un modelo multivariado lineal que va más allá del modelo tradicional de regresión lineal, esto debido a su capacidad para analizar variables colineales y con ruido (Wold et al., 2001).

Con base en lo anterior, el objetivo de este trabajo fue obtener el perfil sensorial de los mezcales artesanales y ancestrales elaborados con los agaves *A. angustifolia*, *A. potatorum* y *A. karwinskii*, a través de pruebas Napping y análisis

descriptivo cuantitativo que permita determinar las correlaciones entre perfiles metabolómicos y perfiles sensoriales a través de un modelo de regresión por mínimos cuadrados parciales tipo dos (PLS-R).

6.2 Materiales y métodos

6.2.1 Muestras de mezcal

Los mezcales que se emplearon en las pruebas sensoriales se presentan en el Cuadro 11. Cuatro muestras fueron compradas en el año 2020 y seis muestras se consiguieron en el año 2022. Los mezcales fueron elaborados con las especies *A. potatorum*, *A. angustifolia* y *A. karwinskii* mediante proceso de manufactura ancestral y artesanal. Todas las muestras etiquetadas con proceso ancestral fueron de la región Sierra Sur, Oaxaca. Únicamente una muestra elaborada con *A. karwinskii* fue elaborada con agaves de tres regiones de Oaxaca (Valles Centrales, Centro y Sierra Sur). Cabe mencionar que el análisis descriptivo cuantitativo se llevó a cabo con seis muestras (resaltadas en letras negritas en el Cuadro 11) y la prueba Napping con las 10 muestras descritas en el Cuadro 11.

Cuadro 11. Muestras de mezcal empleadas durante el análisis sensorial presentadas por especie de agave, región de producción y proceso de manufactura empleado.

Código	Especie	Región	Proceso	Año de muestreo
193	<i>Agave potatorum</i>	Sierra Sur	Ancestral	2020
239	<i>Agave potatorum</i>	Sierra Sur	Ancestral	2022
245	<i>Agave potatorum</i>	Valles Centrales	Artesanal	2022
351	<i>Agave potatorum</i>	Valles Centrales	Artesanal	2020
465	<i>Agave angustifolia</i>	Sierra Sur	Ancestral	2020
688	<i>Agave angustifolia</i>	Sierra Sur	Ancestral	2022
373	<i>Agave angustifolia</i>	Valles Centrales	Artesanal	2022
722	<i>Agave angustifolia</i>	Valles Centrales	Artesanal	2020
863	<i>Agave karwinskii</i>	Centrales, Centro y Sierra Sur	Artesanal	2022
949	<i>Agave karwinskii</i>	Sierra Sur	Artesanal	2022

6.2.2 Métodos

Análisis instrumental

El contenido alcohólico (NMX-V-013-NORMEX-2019) se determinó con alcoholímetros certificados OIML ISO 4801 -NF B 35-515 (Alla France, Chemillé, Francia), uno con escala de medición de 30-40 y otro con escala de 40-50 % Alc Vol., calibrados a 20 °C, división de 0.1 y precisión de ± 0.1 . El pH se midió con un potenciómetro HI 98103 (Hanna Instruments, Italia). El contenido de sólidos solubles totales se evaluó con un refractómetro Atago (Modelo 42510 Versión 3.1 06/04, Atago USA Inc.).

Prueba Napping

La prueba Napping se llevó a cabo con 10 muestras de mezcal (Cuadro 11) y 11 personas entre 21 y 24 años de edad. A cada panelista se le proporcionó una manteleta de papel cartulina de 60 x 40 cm con una de las esquinas marcadas como el origen (0,0) y se les indicó probar las muestras de mezcal en el orden presentado (muestras previamente aleatorizadas). Los panelistas colocaron sobre la superficie del papel las muestras de mezcal de acuerdo con las diferencias o similitudes percibidas y etiquetaron cada posición de la muestra con el código asignado. Cada asignación se realizó con base al criterio del panelista y no hubo respuestas correctas ni incorrectas. Finalmente se obtuvieron las coordenadas X y Y para cada una de las muestras y se vaciaron los datos en el formato correspondiente; también se les solicitó escribir cinco atributos de aroma y sabor que caracterizaran a las muestras de mezcal (Giacalone et al., 2013; Louw et al., 2013). En todo momento de la prueba, los panelistas tuvieron galletas habaneras clásicas (Gamesa®) y agua para enjuagarse.

Análisis descriptivo cuantitativo

Selección de panelistas

En la selección de panelistas se usó un análisis secuencial. Para el cual, previamente se realizó una prueba de umbral que consistió en que los panelistas

probaron una serie de siete soluciones (0.01, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1 y 0.12 M) de sacarosa y se les preguntó la concentración en la cual percibían el sabor dulce. Los umbrales de los panelistas estuvieron entre 0.06 y 0.1 M, por ello se establecieron como concentraciones de trabajo 0.07 y 0.1 M.

Posteriormente, se emplearon pruebas triangulares secuenciales para seleccionar de un grupo de 30 personas de acuerdo con su capacidad de discriminación. Las once personas seleccionadas participaron tanto en QDA como en prueba Napping.

El número de juicios para $p = 0$ (n_0 , no habilidad), $p = p_0$ (n_{p0} , habilidad máxima inaceptable), $p = p_1$ (n_{p1} , habilidad mínima aceptable) y $p = 1$ (n_1 , habilidad infalible), así como el cálculo de los límites de rechazo (línea inferior y superior) se calcularon con $\alpha=0.05$, $\beta=0.1$ y proporción de discriminadores del 50 % (Pedrero & Pangborn, 1997). Por lo tanto, el número de juicios fueron $n_0= 4$, $n_{p0}=9$, $n_{p1}=11$ y $n_1=5$. Con estos datos se hizo la selección de los panelistas, panelista rechazado aquél que tuvo cuatro juicios incorrectos de manera continua (Anexo 1A) o que sus juicios quedaran en o fuera del límite de rechazo (Anexo 1B) y panelista aceptado quién tuviera cinco juicios correctos de manera continua o que rebasara la línea de aceptación (Anexo 1C).

Entrenamiento

A los once panelistas seleccionados se les presentó una serie de cuatro muestras de mezcal, tres de ellas ajustadas con agua destilada a 20, 25, 30 % Alc. Vol. y una de 48 % Alc. Vol. (que es el ajuste hecho por el productor) para que ellos seleccionaran la concentración de la muestra de trabajo. El análisis sensorial en brandy y whisky se ha realizado con muestras ajustadas a 20 % Alc. Vol. (Louw et al., 2013) y en destilados de melón a 30 % Alc. Vol. (Hernández-Gómez et al., 2005). Los panelistas seleccionaron la muestra de 30 % Alc. Vol. y generaron once atributos (Cuadro 13).

El entrenamiento, también consistió en pruebas para reconocimiento de aromas, en las que se evaluó la capacidad olfativa de los once panelistas seleccionados.

Para ello, se consideró aceptable un valor de 80 % (Hernández-Montes, 2007), quién presentó menor a esta calificación se le proporcionó asesoría para mejorar su habilidad. Los odorantes empleados fueron pimienta (Catarino's®, México), canela (Escosa®, México), cominos (Catarino's®, México), clavo (Catarino's®, México), chocolate semi amargo (Hershey's®, México), nuez (Verde Valle®, México), cáscara de naranja y de limón.

El entrenamiento para el QDA se llevó a cabo durante 20 h para desarrollar vocabulario, el manejo de referencias y uso de la escala de 15 puntos. Para ello, a cada panelista se le presentaron dos muestras de mezcal ajustadas a 30 % Alc. Vol. (concentración de la dilución previamente elegida) y se le pidió describir individualmente, en hojas blancas, las muestras en términos de aroma y sabor de acuerdo a su orden de aparición. Posteriormente, se les presentó referencias de los atributos descritos y se homogeneizó el vocabulario descriptivo. También se realizó entrenamiento con el uso de escala de 15 cm para cada uno de los atributos evaluados. Se ubicó, por consenso, cada referencia en su escala y se obtuvo un valor específico.

Prueba final

Después de la etapa de entrenamiento se realizó la prueba final, la cual consistió en que los panelistas se colocaron en cabinas individuales con iluminación de día para recibir las muestras balanceadas, codificadas con tres dígitos, aleatorizadas y cubiertas con vidrio de reloj (Daute et al., 2021). También en el entrenamiento se cubrieron con vidrio de reloj cada una de las muestras para evitar la evaporación de los aromas. A cada panelista se le sirvió tres repeticiones de cada tratamiento y se le indicó que realizara una evaluación monádica (una a la vez). El panel siempre tuvo disponible las referencias y para enjuagarse se les proporcionó agua y galletas habaneras clásicas (Gamesa, México).

Análisis estadístico de los datos

Análisis instrumental

Los datos instrumentales de contenido alcohólico, pH y sólidos solubles totales se analizaron por medio de un análisis de varianza (ANOVA) bajo un arreglo completamente al azar. Para identificar diferencias significativas se realizaron comparaciones de medias ($p < 0.05$) con la prueba de la diferencia mínima significativa (LSD). Los datos se procesaron con el paquete estadístico SAS versión 9.1 (SAS Institute, Inc., Cary, NC).

Prueba Napping

Los datos de coordenadas obtenidos mediante prueba Napping se analizaron mediante una prueba statis donde las configuraciones fueron los panelistas y se solicitó escalamiento global. Con los atributos mencionados por los panelistas se obtuvo la frecuencia de cada uno de ellos para cada mezcal y se ingresaron al XLSTAT Sensory 19 (Addinsoft Inc., New York, NY, USA) para obtener una nube de palabras. También se realizó el análisis factorial múltiple ($p < 0.05$) con RStudio Versión 4.1.2 (RStudio PBC, Boston, MA, USA) y sus paqueterías FactoMineR y ggplot2 con el fin de conocer las asociaciones entre las diferentes variables analizadas.

Análisis descriptivo cuantitativo

Los datos del análisis descriptivo cuantitativo se procesaron con un análisis de varianza bajo un diseño en bloques completamente al azar con arreglo en parcela dividida, donde las repeticiones se consideraron como bloques, dentro de cada bloque se aleatorizaron los tratamientos o muestras (parcela mayor); de manera similar los panelistas son evaluados como un segundo tratamiento experimental, junto con las muestras. De este modo, cada panelista se asignó aleatoriamente a cada parcela menor (Hernández-Montes, 2007). Se utilizó la prueba de la diferencia mínima significativa (LSD) para las comparaciones de medias ($p < 0.05$). Además se elaboró un mapa perceptual con los atributos que resultaron significativos del ANOVA. Los datos se procesaron con el paquete estadístico

SAS versión 9.1 (SAS Institute, Inc., Cary, NC) y con XLSTAT Sensory 19 (Addinsoft Inc., New York, NY, USA).

Relación entre variables

Con el fin de establecer la relación entre las variables químicas denominadas también variables predictoras (alcoholes superiores evaluados por GC-FID, compuestos volátiles evaluados por GC-MS, contenido alcohólico, pH y sólidos solubles totales) obtenidas durante toda la investigación y las variables sensoriales (variables de respuesta), se realizó una regresión de mínimos cuadrados parciales tipo dos (PLS-2) utilizando el programa XLSTAT Sensory 19 (Addinsoft Inc., New York, NY, USA).

6.3 Resultados y discusión

6.3.1 Análisis instrumental

El contenido alcohólico (Cuadro 12) se encontró dentro del rango establecido en la NOM-070-SCFI- 2016, la cual establece que los valores pueden fluctuar entre 35 a 55 % Alc. Vol. Los valores más altos fueron para los dos mezcales elaborados con *A. angustifolia* y *A. karwinskii* de Sierra Sur mientras que *A. karwinskii* procedente de las tres regiones (Valles Centrales, Centro y Sierra Sur) se caracterizó por presentar el menor contenido de alcohol. El contenido alcohólico de las bebidas espirituosas tiene su importancia por las sensaciones kinestésicas y de sabor (estímulos orosensoriales) que provoca al ser ingeridas, por ejemplo, provoca sensaciones aversivas de amargo, ardientes e irritación. Por otro lado, se ha reportado que a concentraciones superiores al 12 % Alc. Vol, el etanol tiende a suprimir la dulzura de los azúcares presentes (Thibodeau & Pickering, 2021, 2019).

En relación con el contenido de sólidos solubles, el menor valor lo presentó el mezcal de *A. karwinskii* (codificado con el número 863) y le correspondió el menor valor de pH (4.2), este comportamiento indica el consumo de azúcares y formación de compuestos ácidos por parte de microorganismos fermentativos (Gutiérrez-Sarmiento et al., 2022).

Cuadro 12. Contenido alcohólico, pH y sólidos solubles totales en mezcales oaxaqueños elaborad *A. potatorum*, *A. angustifolia* y *A. karwinskii* elaborados por proceso ancestral y artesanal.

Código	Especie	Región	Proceso	Alcohol ^y	pH	SST ^w
239	<i>A. potatorum</i>	Sierra Sur	Ancestral	47.2b ± 0.2 ^x	4.6a ± 0.1	16.7b ± 0.05
245	<i>A. potatorum</i>	Valles Centrales	Artesanal	46.5c ± 0.2	4.4b ± 0.05	16.6b ± 0.05
373	<i>A. angustifolia</i>	Valles Centrales	Artesanal	49.3a ± 0.08	4.4b ± 0.1	17.3a ± 0.05
688	<i>A. angustifolia</i>	Sierra Sur	Ancestral	49.4a ± 0.03	4.3c ± 0.05	17.2a ± 0.05
863	<i>A. karwinskii</i>	Combinación ^z	Artesanal	39.8d ± 0.2	4.2c ± 0.05	15.1c ± 0.1
949	<i>A. karwinskii</i>	Sierra Sur	Artesanal	49.1a ± 0.2	4.5a ± 0.1	17.2a ± 0.05

^z Mezcal elaborado con agaves de tres regiones: Valles Centrales, Centro y Sierra Sur.

^y El contenido de alcohol está dado en % Alc. Vol.

^x Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de la mínima diferencia significativa (LSD) ($p \leq 0.05$).

^w Los sólidos solubles totales se midieron en °Brix.

6.3.2 Prueba Napping

La Figura 36 representa las muestras de mezcal ancestral y artesanal elaboradas con las especies *A. angustifolia*, *A. potatorum* y *A. karwinskii* procedentes de Sierra Sur y Valles Centrales, Oaxaca evaluadas durante la prueba sensorial Napping y procesadas mediante una prueba statis en XLStat. El primer paso en una prueba statis es el análisis entre estructuras, en el que se produce una representación gráfica de la proximidad entre las muestras (Josse & Holmes, 2016). Esta cercanía entre muestras está directamente afectada por la percepción y criterio de cada panelista puesto que algunos evaluadores pueden usar la hoja entera de papel, en tanto que, los demás pueden usar una parte pequeña (Llobell et al., 2020).

Se puede observar que, aunque el porcentaje de explicación es alrededor del 50 %, se logró separar las muestras ancestrales (letras en color azul de la Figura 36) del resto de muestras artesanales, las cuatro muestras ancestrales pertenecieron a la región Sierra Sur del Municipio de Villa Sola de Vega, Oax. La producción de mezcal en este municipio se caracteriza por ser en su mayoría ancestral (Rios-Colín et al., 2022). El mezcal de *A. karwinskii* de Sierra Sur elaborado por proceso artesanal (código 949 y con letras color verde de la Figura

36) fue el que más se separó de los mezcales y su procedencia es San Guillermo Miahuatlán, Oax. Las discriminaciones por origen son difíciles de lograr sobre todo cuando hay una cercanía entre las localidades porque existe una consecuente similitud en clima o semejanza genética entre las especies (Tapp et al., 2003).

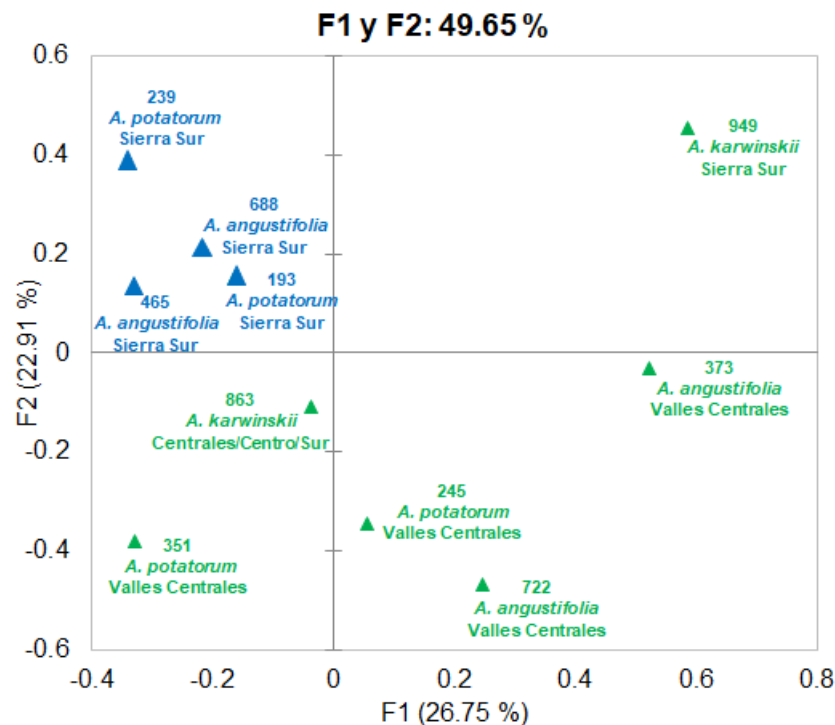


Figura 36. Mezcales oaxaqueños ancestrales (identificados con letras azules) y artesanales (identificados con letras verdes) elaborados con *A. angustifolia*, *A. potatorum* y *A. karwinskii*, evaluados durante la prueba sensorial Napping.

En las Figuras 37 y 38 se presentan dos ejemplos de los análisis estadísticos aplicados a seis muestras (Figura 37) correspondientes al muestreo del año 2022 (muestras empleadas en QDA) y cuatro muestras (Figura 38) del año 2020. Se observaron porcentajes de explicación del 64 y 83 % respectivamente, que resultaron ser mayores al 50 % observado en la Figura 36. Este comportamiento podría deberse por el tipo de muestra, puesto que, al tratarse de una bebida espirituosa, que causa sensaciones trigeminales como ardiente, astringente y picante, los panelistas tienden a sufrir fatiga sensorial lo que podría repercutir de manera negativa en los resultados cuando el número de muestras se incrementa.

El etanol es el responsable de las sensaciones ardientes en bebidas alcohólicas como ejemplo el brandy que a su vez puede causar un efecto de arrastre que se convierte en fatiga (Louw et al., 2013).

Con los atributos solicitados a los panelistas para cada muestra de mezcal durante la prueba Napping, se elaboró una nube de palabras para observar la importancia relativa de los atributos de acuerdo con la frecuencia de menciones hechas por el panel.

En la Figura 37, a pesar que las muestras elaboradas con *A. angustifolia* y *A. potatorum* de Sierra Sur (códigos 688 y 239) fueron colocadas por los evaluadores cerca una de la otra, la muestra *A. angustifolia* destaca por su atributo alcohólico, lo cual coincide con los resultados mostrados en el Cuadro 12 puesto que se puede observar que este mezcal (49.4 % Alc. Vol) tiene mayor contenido de alcohol ($p < 0.05$) que el de *A. potatorum* (47.2 % Alc. Vol). También en la Figura 37 se muestra que, para los mezcales de Valles Centrales, en el caso de *A. angustifolia* (código 373) el atributo frutal fue más importante y en el *A. potatorum* (código 245) fue el atributo dulce. Respecto a los mezcales de *A. karwinskii*, el mezcal de Sierra Sur (código 949) presentó una importancia relativa el atributo amaderado y para el mezcal de la mezcla de regiones (código 863) fue definido con el atributo amargo.

En la Figura 38 se observa que las dos muestras de *A. potatorum* fueron localizadas en el cuadrante superior derecho, también podemos notar que el mezcal de *A. potatorum* de Sierra Sur (código 193) fue definido por los atributos dulce y fermentado, en tanto que, el mezcal *A. potatorum* (código 351) de Valles Centrales por los atributos dulce, ácido y aroma a frutos rojos. El mezcal *A. angustifolia* de Sierra Sur (código 465) fue definido principalmente por el atributo picante y *A. angustifolia* de Valles Centrales (código 722) por el atributo dulce.

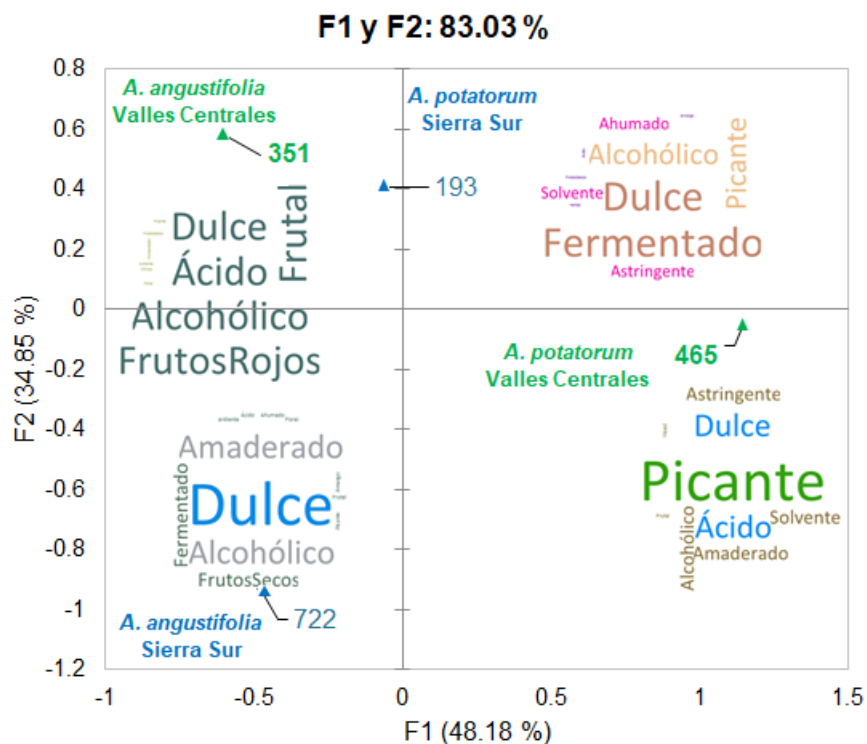


Figura 38. Mezcales oaxaqueños ancestrales (identificados con letras azules) y artesanales (identificados con letras verdes), colectados en el año 2020, elaborados con *A. angustifolia* y *A. potatorum*, evaluados durante la prueba sensorial Napping.

En nuestro caso, los coeficientes RV de las pruebas Napping implementadas en mezcal colectado en el año 2022 (Figura 39) fueron mayores a 0.5 excepto para los panelistas 5 y 7; en tanto que el mezcal colectado en el año 2020 (Figura 40) presentó coeficientes RV por arriba de 0.5 para todos los panelistas. Por lo que el desempeño de los panelistas fue mejor cuando se analizó la prueba Napping con menor número de muestras (cuatro muestras del año 2020) que el segundo caso (con seis muestras del año 2022). Daute et al. (2021) reportaron que evaluar nueve bebidas alcohólicas puede ser correctamente manejable. Entonces, considerando que se empleó un panel no entrenado los resultados son lo suficientemente aceptables. La homogeneidad de la prueba fue de 0.54 y 0.36 respectivamente. La falta de homogeneidad denotada por los valores de 0.54 y 0.36 es atribuible, principalmente, a la falta de entrenamiento sensorial de los panelistas cuando realizaron la prueba (Barcenás et al., 2004). Oliver et al. (2018) compararon la metodología de análisis descriptivo cuantitativo y prueba Napping

revelando que ambas técnicas producen términos similares para describir los productos siempre y cuando se emplee un panel entrenado. Cuando se trabaja con panelistas no entrenados, el grado de familiaridad o experiencia con el método sensorial y las muestras permite a los participantes ser más discriminativos cuando realizan una tarea sensorial (Barton et al., 2020), sin embargo, para este caso las personas que participaron en la prueba no estaban familiarizadas con los mezcales ni la metodología empleada.

Por otro lado, el análisis factorial múltiple (Multiple Factor Analysis: MFA) estudia diversos grupos de variables definidas en el mismo conjunto de datos (Escofier & Pagès, 1994); en este análisis se combinan (concatenan) las tablas de datos individuales después de un escalamiento individual y se realiza el análisis de componentes principales para obtener el consenso (Næs et al., 2017). En este sentido, se llevó a cabo el análisis MFA (Figura 41) con las variables sensoriales derivadas de Napping (letras en color fucsia), las variables instrumentales de pH y contenido alcohólico (letras en color rojo), las variables de cromatografía GC-MS (letras en color azul claro) y las variables de cromatografía GC-FID (letras en color anaranjado oscuro). Las dimensiones uno y dos explicaron el 80 % de la variabilidad de los datos, además se observa cuáles son las variables que describen a cada muestra de mezcal. El mezcal elaborado con *A. angustifolia* de Sierra Sur, Oaxaca quedó definido por los ésteres de etilo (octanoato, decanoato, dodecanoato y hexadecanoato) y por los atributos sensoriales ácido y picante. En tanto que, el mezcal de *A. potatorum* también de Sierra Sur, quedó definido por las variables de alcohol fenético, 3-metil-1-butanol, metanol, etanol, y por los atributos sensoriales de astringente, solvente, amaderado y herbal. El mezcal de *A. potatorum* de Valles Centrales quedó definido por los atributos, floral, cítricos y 2-butanol, en tanto que, el mezcal de *A. angustifolia* también de Valles Centrales por 1-butanol, propanol, frutos secos, dulce, entre otros. Como se puede observar cada una de las cuatro muestras fue diferenciada y colocada en un cuadrante del gráfico MFA bidimensional. La significancia del análisis MFA se evaluó con $p=0.05$, por lo tanto, las variables significativas de la Figura 41

(indicadas con asteriscos) fueron picante*, alcohólico*, amargo* y bis (2-etilhexilo) adipato*.

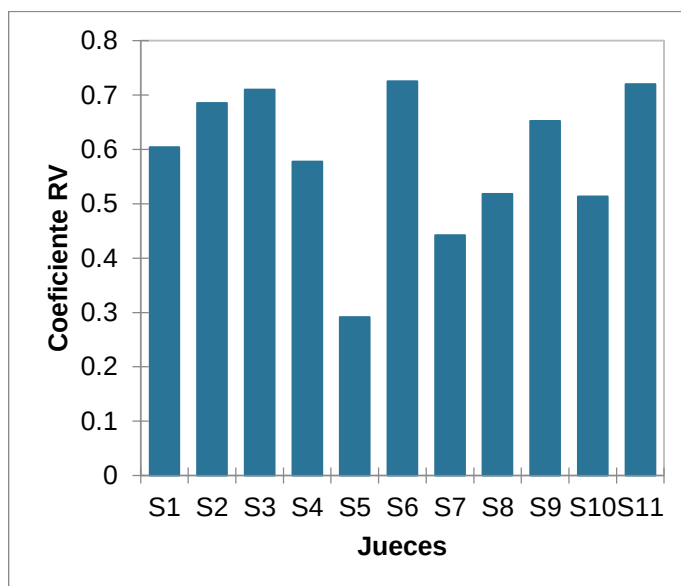


Figura 39. Coeficientes RV entre cada configuración (juez) y el consenso obtenidos durante la prueba Napping de muestras de mezcal oaxaqueños ancestrales y artesanales elaborados con *A. angustifolia*, *A. potatorum* y *A. karwinskii* (muestreo del año 2022).

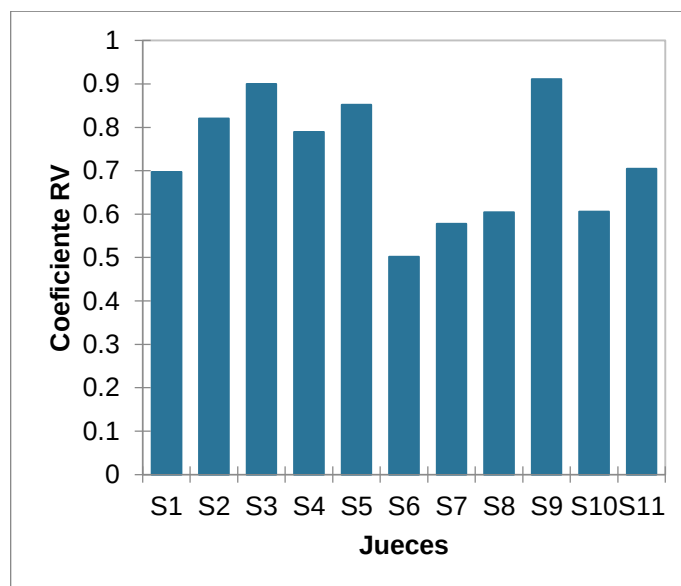


Figura 40. Coeficientes RV entre cada configuración (juez) y el consenso obtenidos durante la prueba Napping de muestras de mezcal oaxaqueños ancestrales y artesanales elaborados con *A. angustifolia* y *A. potatorum* (muestreo del año 2020).

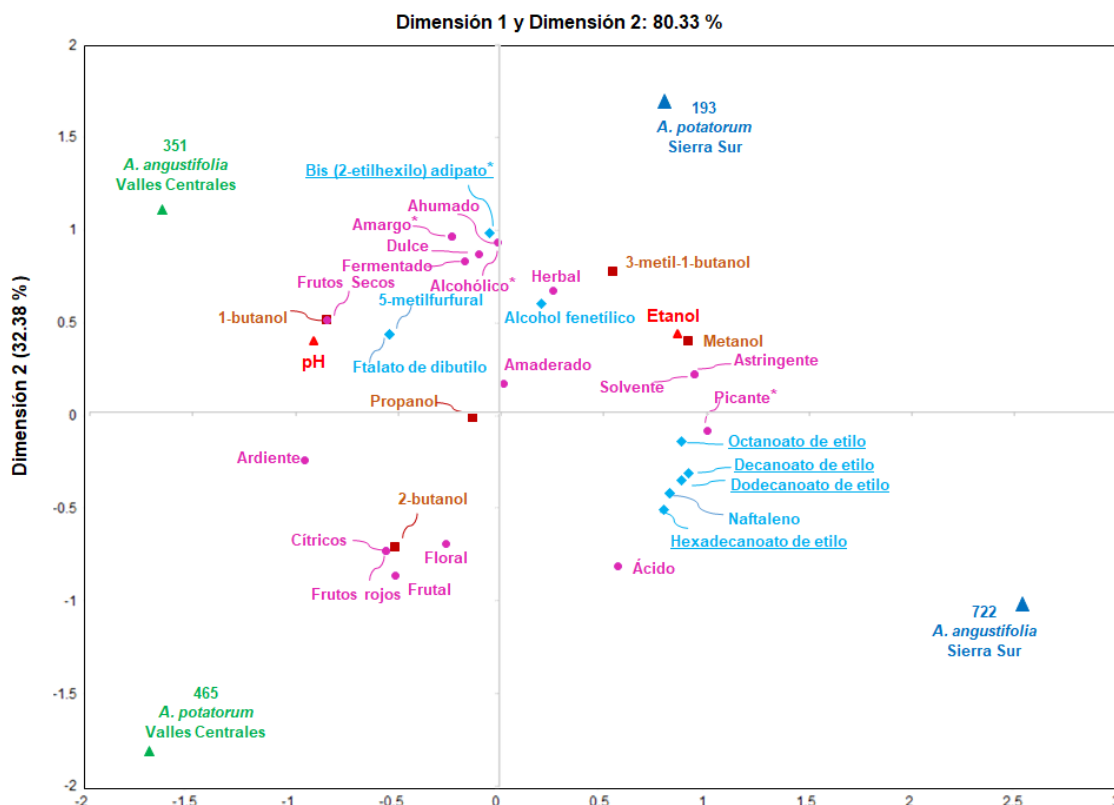


Figura 41. Análisis factorial múltiple para estudiar las variables químicas y sensoriales (obtenidas de prueba Napping) correspondientes a los mezcales *A. potatorum* y *A. angustifolia* de Valles Centrales y Sierra Sur, Oaxaca (muestreo del año 2020).

Los atributos picante*, alcohólico*, amargo* y bis (2-etilhexilo) adipato* llevan un asterisco para indicar que fueron significativas.

6.3.3 Análisis descriptivo cuantitativo

Atributos generados

El panel generó, a través del análisis descriptivo cuantitativo, once atributos (Cuadro 13) para caracterizar el mezcal oaxaqueño elaborado con las especies *A. potatorum*, *A. angustifolia* y *A. karwinskii* (correspondientes al muestreo del año 2022), de los cuales seis fueron evaluados mediante olfato (cítricos, fermentado, floral, ahumado, barro y solvente), tres a través del gusto (frutal, ácido y amargo) y finalmente dos atributos trigeminales (ardiente y astringente). Comprobando la riqueza aromática de los mezcales estudiados puesto que el 54 % (seis atributos de once) correspondieron a atributos evaluados mediante el olfato.

Cuadro 13. Lista de atributos (aroma, sabor y sensaciones trigeminales), definición, referencia y valor generados por el panel para el QDA de mezcales oaxaqueños elaborados con *A. potatorum*, *A. angustifolia* y *A. karwinskii* procedentes de Sierra Sur y Valles Centrales (muestreo del año 2022).

Clase	Atributo	Definición	Referencia y valor
Olfato	Cítricos	Aroma asociado a la cáscara de cítricos, específicamente de naranja.	Cáscara de naranja Valencia (1 g); 11
	Fermentado	Aroma asociado al proceso de fermentación donde las levaduras transforman los azúcares presentes en las piñas.	Masa fermentada (0.5 g) para pan tipo bizcocho empleando 1.5 % m/m de levadura (La Florida®, México); 10
	Floral	Aroma asociado a las flores con notas dulces.	Licor de caña el Charrito® (México) al 15 % (v/v); 6.2
	Ahumado	Aroma asociado al proceso de ahumado durante cocción de las piñas de agave	Queso provolone Marchesotti, Texcoco (1 g); 8.9
	Barro	Aroma característico que causan los materiales hechos con barro	Trozo de barro (2 g); 11.5
	Solvente	Olor asociado a disolvente de pintura	Acetona Cute® a 100 ppm; 10.6
Gusto	Frutal	Sensación asociada a los sabores de frutas	Alimento Gerber® sabor manzana, pera, plátano y durazno (1g); 8.8
	Ácido	Sensación básica de sabor producida por los ácidos.	Solución de ácido ascórbico 0.2% (Laboratorios Laitz, México); 7.5
	Amargo	Sensación básica de sabor producida por la cafeína.	Solución de cafeína (Productos químicos Monterrey, México) al 0.04 %; 6
Trigeminal	Ardiente	Sensación de recalentamiento en la cavidad bucal. No es causada por temperatura.	Mezcal artesanal Local® ajustado a 15 % Alc. Vol; 7.4
	Astringente	Sensación de sequedad en boca o contracción de los tejidos de la misma.	Solución de Sulfato de aluminio, Laboratorios Meyer al 0.2 % m/v; 10

Desempeño del panel

El desempeño de los panelistas representadas por la interacción panel x tratamiento (mezcal) para los atributos evaluados se muestran en el Cuadro 14. El panel tuvo un buen desempeño al no presentar interacciones cruzadas ($p \geq 0.05$) entre panelista x tratamiento, cuando se presentaron interacciones se eliminaron los panelistas causantes de éstas, quedando no menos de seis personas para el análisis de cada atributo. El desempeño de los panelistas está directamente ligado a evitar interacciones significativas, sobre todo de tipo cruzadas. Por ello, el desempeño del panel debe evaluarse con la finalidad de obtener un perfil sensorial confiable y de calidad (Tabary et al., 2021).

Cuadro 14. Valores de probabilidad para la interacción panelista x tratamiento de cada variable sensorial generada durante el análisis descriptivo de mezcales oaxaqueños.

Variable	Número de panelistas ^z	Probabilidad (p)
Cítricos	7	0.1378
Fermentado	6	0.3647
Floral	9	0.0505
Ahumado	10	0.0504
Barro	7	0.3173
Solvente	9	0.6219
Ácido	9	0.3415
Astringente	8	0.0987
Ardiente	7	0.3836
Amargo	6	0.2621
Frutal	7	0.1189

^z El panel estuvo conformado por 11 personas.

Atributos descriptivos de los mezcales

La comparación de medias (Cuadro 15) mostró diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en los atributos fermentado, floral, ahumado, barro, ácido y amargo. El atributo fermentado para el mezcal 239 elaborado con *A. potatorum* de Sierra Sur (valor de 6.5) y el 245 con *A. angustifolia* de Valles Centrales (valor de 7.3) fueron descritos por el panel con los valores más altos ($p \leq 0.05$).

Cuadro 15. Atributos significativos ($p < 0.05$) identificados por el panel sensorial en mezcales oaxaqueños elaborados con *A. potatorum*, *A. angustifolia* y *A. karwinskii* procedentes de Sierra Sur y Valles Centrales (Muestreo del año 2022).

Código	Especie	Región	Proceso	Fermentado	Floral	Ahumado	Barro	Ácido	Amargo
239	<i>Agave potatorum</i>	Sierra Sur	Ancestral	6.5ab^z	4.9b	6.2ab	4.5a	6.3a	8.4a
245	<i>Agave potatorum</i>	Valles Centrales	Artisanal	6.0b	6.2a	6.2ab	4.1ab	5.5b	8.6a
373	<i>Agave angustifolia</i>	Valles Centrales	Artisanal	7.3a	4.9b	6.6a	4.9a	5.5b	8.5a
688	<i>Agave angustifolia</i>	Sierra Sur	Ancestral	6.3b	4.4b	5.4c	4.6a	6.3a	8.5a
863	<i>Agave karwinskii</i>	Centrales, Centro y Sierra Sur	Artisanal	5.6b	4.6b	5.8bc	4.0ab	6.4a	7.6b
949	<i>Agave karwinskii</i>	Sierra Sur	Artisanal	5.9b	4.2b	6.5ab	3.1b	6.2ab	8.9a

^z Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de la mínima diferencia significativa (LSD) ($p \leq 0.05$).

Por otro lado, el mezcal con *A. potatorum* (código 245) de Valles Centrales fue evaluado como el más floral (con un valor de 6.2), lo cual coincide con la prueba Napping (Figura 41) en donde podemos observar que el mezcal elaborado con *A. potatorum* (código 465) también de Valles Centrales fue caracterizado por los panelistas con el atributo floral. Los mezcales elaborados con *A. angustifolia* (código 688) de Sierra Sur y *A. karwinskii* (código 863) procedente de tres regiones (Valles Centrales, Centro y Sierra Sur) fueron los que presentaron más intenso el aroma ahumado. Los dos mezcales elaborados con *A. karwinskii* (códigos 863 y 949) y con *A. potatorum* (código 245) presentaron los menores valores de aroma a barro. Los mezcales con *A. potatorum* (código 239) y *A. angustifolia* (código 688), ambos de Sierra Sur, así como los de *A. karwinskii* (códigos 863 y 949) fueron calificados como los más ácidos. Finalmente, el mezcal con *A. karwinskii* procedente de Valles Centrales, Centro y Sierra Sur (código 863) fue el más amargo.

El análisis descriptivo cuantitativo tiene la ventaja de ser una técnica robusta que goza de prestigio estadístico, además de generar el perfil sensorial de cada una de las bebidas analizadas (Daute et al., 2021), sin embargo, también es considerado bastante rígido y consume tiempo por el entrenamiento que se proporciona a los panelistas (Næs et al., 2017). El entrenamiento es con el objetivo de identificar y describir pequeñas diferencias entre las muestras analizadas (Barcenas et al., 2004).

Mapas perceptuales

El análisis de componentes principales (Figura 42) aplicado únicamente a las variables sensoriales significativas de los seis mezcales evaluados por el panel mostró que los dos principales componentes explican alrededor del 70 % de la variabilidad de las muestras. El componente principal uno explicó el 43.75 % de la variación de los datos y los atributos con mayor peso, denotados por mayor valor en las cargas de correlación, fueron aroma a fermentado y sabor ácido (Cuadro 16). Por otro lado, el componente dos contribuyó con el 26.23 % de la

variabilidad de los datos; sus atributos con mayor valor de cargas de correlación fueron aroma a barro y sabor amargo (Cuadro 16).

Cuadro 16. Cargas de correlación de las variables sensoriales evaluadas en mezcales oaxaqueños elaborados con *A. potatorum*, *A. angustifolia* y *A. karwinskii* procedentes de Sierra Sur y Valles Centrales (Muestreo del año 2022).

Atributo	PC1 ^z	PC2 ^y
Fermentado	-0.763	0.371
Floral	-0.576	0.061
Ahumado	-0.654	-0.546
Barro	-0.437	0.885
Ácido	0.916	0.054
Amargo	-0.504	-0.590

^z PC1: componente uno

^y PC2: componente dos

En la Figura 42 se puede observar que los mezcales de *A. angustifolia* (código 373) y *A. potatorum* (código 245), ambos de Valles Centrales, se relacionaron con los atributos floral y ahumado, mientras que el sabor ácido correlacionó con el mezcal de *A. karwinskii* (código 863). El mezcal 239 elaborado con *A. potatorum* de Sierra Sur se relacionó con aroma a barro, esta asociación es correcta puesto que se trata de un mezcal ancestral. El proceso ancestral del mezcal se caracteriza por emplear ollas de barro durante la destilación; es la forma más rústica y tradicional de elaborar esta bebida, aunque esto no limita el reconocimiento local y regional que tiene el producto (Rios-Colín et al., 2022), por lo tanto, podría inferirse que este material empleado imparte el aroma a barro en el producto final.

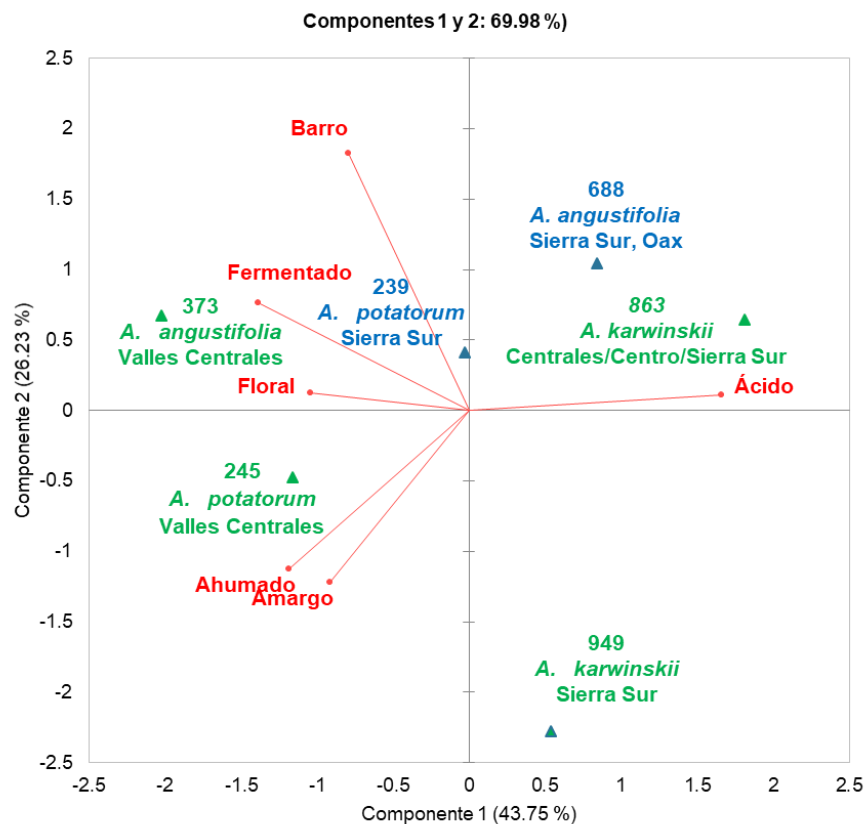


Figura 42. Bi-plot de cargas de correlación y calificaciones del análisis de componentes principales para atributos sensoriales de mezcales *A. potatorum*, *A. angustifolia* y *A. karwinskii* de Valles Centrales y Sierra Sur, Oaxaca (muestreo del año 2022).

6.3.4 Relación entre variables

La relación entre las variables sensoriales y las químicas (obtenidas durante toda la investigación), cuyos datos se muestran en el Anexo 2, se evaluaron a través de un análisis de regresión por cuadrados mínimos parciales (PLS-R tipo dos), para tal fin, las variables sensoriales fueron las variables dependientes (Y) y las variables químicas fueron las independientes (X). La Figura 43 muestra las correlaciones encontradas durante el análisis. Sin embargo, se observa que las variables pH, cítricos, ácido y astringente (Figura 43A) presentaron valores de correlación menor a 0.5 (Cuadro 17) por eso se eliminaron del análisis y se ejecutó nuevamente sin estas cuatro variables, de esta manera, se obtuvieron los resultados que se muestran en la Figura 43B y Cuadro 18.



Figura 43. Análisis por mínimos cuadrados parciales tipo dos antes de la eliminación de las cuatro variables con coeficiente de correlación menor a 0.5 (A) y después de la eliminación de las cuatro variables con coeficiente de correlación menor a 0.5 (B).

Los cuadrantes son denotados por números romanos (I, II, III y IV).

Cuadro 17. Matriz de correlaciones de las variables con los componentes uno y dos obtenida del análisis de regresión por mínimos cuadrados parciales tipo dos entre variables sensoriales y químicas de los mezcales oaxaqueños.

Variable	Componente uno	Componente dos
Decanoato de etilo	0.884	0.346
Dodecanoato de etilo	0.815	0.382
Hexadecanoato de etilo	-0.516	-0.132
Bis (2-etilhexilo) adipato	0.908	-0.069
Octanoato de etilo	0.849	0.324
Alcohol fenetílico	0.857	0.430
Ftalato de dibutilo	-0.056	-0.889
3-Metil-1-butanol	0.786	-0.189
Propanol	-0.766	0.442
2-butanol	-0.502	0.660
Furfural	-0.820	0.380
Metanol	-0.835	-0.156
1-butanol	-0.513	0.489
Etanol	-0.969	-0.086
pH^z	-0.452	-0.068
Sólidos solubles totales	-0.975	-0.116
Cítricos	0.476	0.175
Fermentado	-0.755	0.163
Floral	-0.003	0.590
Ahumado	-0.322	-0.478
Barro	-0.340	0.699
Solvente	-0.671	-0.465
Ácido	0.489	-0.147
Astringente	0.352	-0.290
Ardiente	-0.607	0.571
Amargo	-0.810	-0.236
Frutal	-0.235	0.841

^z Las variables eliminadas durante el análisis se marcaron con letras negritas y fueron pH, cítricos, ácido y astringente.

Cuadro 18. Matriz de correlaciones de las variables con los componentes uno y dos obtenida del análisis de regresión por mínimos cuadrados tipo dos parciales entre variables sensoriales y químicas de los mezcales oaxaqueños.

Variable ^z	Componente uno	Componente dos
Decanoato de etilo	-0.901	0.361
Dodecanoato de etilo	-0.830	0.415
Hexadecanoato de etilo	0.522	-0.131
Bis (2-etilhexilo) adipato	-0.890	-0.090
Octanoato de etilo	-0.870	0.321
Alcohol fenetílico	-0.848	0.454
Ftalato de dibutilo	0.039	-0.895
3-Metil-1-butanol	-0.746	-0.204
Propanol	0.782	0.401
2-butanol	0.511	0.623
Furfural	0.845	0.388
Metanol	0.867	-0.174
1-butanol	0.510	0.543
Etanol	0.959	-0.087
Sólidos solubles totales	0.966	-0.119
Fermentado	0.746	0.180
Floral	-0.010	0.528
Ahumado	0.275	-0.501
Barro	0.356	0.721
Solvente	0.691	-0.430
Ardiente	0.589	0.549
Amargo	0.788	-0.261
Frutal	0.227	0.820

^z Las variables eliminadas durante el análisis fueron pH, cítricos, ácido y astringente.

Este reprocesamiento tras eliminar variables fue reportado por (Tenenhaus et al., 2005) quienes estudiaron las relaciones entre las variables químicas y atributos sensoriales (variables explicativas) con respecto a las calificaciones de variables hedónicas (variables de respuesta) en jugos de naranja. Los autores eliminaron las variables por la poca importancia que tuvieron en el análisis PLS-R.

Después de eliminar las cuatro variables de pH, cítricos, ácido y astringente se logró mejorar el modelo PLS, por ejemplo, se puede observar en el Cuadro 19 que con cuatro componentes se tiene un valor de Q^2 acumulada de -0.158

mientras que con el nuevo modelo, el valor Q^2 acumulada es de 0.217. Sin embargo, para los dos componentes empleados en la Figura 44B le corresponde los valores de Q^2 acumulada= -0.046, R^2Y acumulada=0.571 y R^2X acumulada=0.772, los cuales indican baja calidad del modelo PLS-R.

De la Figura 43B se pueden hacer las siguientes asociaciones: a) los alcoholes superiores propanol, 1-butanol y 2-butanol se relacionaron con el atributo ardiente y fueron localizados en el cuadrante uno (I) donde también se colocó el mezcal *A. angustifolia* (código 688) elaborado mediante proceso ancestral y originario de Sierra Sur de Oaxaca; b) los ésteres de etilo de ocho (octanoato de etilo), 10 (decanoato de etilo) y 12 (dodecanoato de etilo) carbonos y el alcohol fenetílico correlacionaron con el atributo floral que fueron localizados en el cuadrante dos (II) donde se ubicaron los dos mezcales elaborados con *A. potatorum* (códigos 239 y 245); c) el alcohol 3-metil-1-butanol y el éster Bis (2-etilhexilo) adipato se localizaron en el cuadrante tres (III) y estos compuestos fueron cercanos al mezcal elaborado con *A. karwinskii* (código 863), finalmente; d) el éster ftalato de dibutilo correlacionó con el descriptor ahumado y se ubicaron en el cuadrante cuatro (IV) donde también se posicionó el mezcal elaborado con *A. karwinskii* (código 949). En este mismo cuadrante también se localizó el mezcal elaborado con *A. angustifolia* (código 373) y se observó la correlación entre amargo y metanol.

El octanoato de etilo aporta notas sensoriales a piña y pera, el decanoato de etilo y dodecanoato de etilo presentan notas florales, en tanto que, el alcohol fenetílico sabores y aromas parecido a rosas, por esta razón también es denominado alcohol aromático (Christoph & Bauer-Christoph, 2007), de manera general, los ésteres son reconocidos por sus notas frutales y florales (Botello-Álvarez et al., 2007). El 1-butanol y 2-butanol generan notas alcohólicas (Christoph & Bauer-Christoph, 2007) que finalmente se traducen en sensaciones ardientes (Louw et al., 2013).

Cuadro 19. Parámetros Q^2 , R^2Y y R^2X que indican la calidad del modelo de regresión por mínimos cuadrados parciales tipo dos entre variables sensoriales y químicas de los mezcales oaxaqueños.

Estadístico	Componente uno	Componente dos	Componente tres	Componente cuatro
PLS antes de eliminar las cuatro variables ^z				
Q^2 acumulada	-0.112	-0.112	-0.094	-0.158
R^2Y acumulada	0.264	0.495	0.701	0.866
R^2X acumulada	0.574	0.728	0.822	0.904
PLS después de eliminar las cuatro variables				
Q^2 acumulada	-0.128	-0.046	0.136	0.217
R^2Y acumulada	0.282	0.571	0.784	0.957
R^2X acumulada	0.603	0.772	0.873	0.918

^z Las variables eliminadas durante el análisis fueron pH, cítricos, ácido y astringente.

6.4 Conclusiones

Los resultados indicaron que cuando los datos se analizaron mediante prueba statis, el porcentaje de explicación de la variabilidad de los datos aumentó a medida que disminuyó la cantidad de muestras empleadas durante la prueba, es decir, cuando se analizaron las diez muestras el porcentaje de explicación fue de 49.65 %, con seis muestras fue de 64.48 % y finalmente con cuatro muestras fue de 83.03 %, aunado al incremento en los coeficientes RV, que a su vez son indicadores de la similitud obtenida entre cada panelista y el consenso; este comportamiento pudo deberse a que las bebidas espirituosas suelen provocar un efecto arrastre posiblemente a causa de los compuestos presentes en la bebida como el etanol, lo que se traduce en fatiga y se ve reflejado en los resultados analizados. Con el análisis factorial múltiple, también de los datos Napping, se logró asociar las variables que describen a los mezcales, encontrándose principalmente que el mezcal elaborado con *A. potatorum* de Valles Centrales, Oaxaca fue definido con el atributo floral. En relación con la prueba descriptiva cuantitativa, el panel definió y evaluó once atributos de aroma y sabor de los mezcales. De los cuales, los atributos fermentado, floral, ahumado, barro, ácido y amargo fueron significativamente diferentes entre las muestras. Estos descriptores sensoriales permitieron definir al mezcal *A. potatorum* de Valles Centrales, Oax. como el más floral (lo que coincidió con la prueba Napping) y al

mezcal de *A. karwinskii* elaborado con agaves de Valles Centrales, Centro y Sierra Sur de Oaxaca como el menos amargo. Con los datos de la prueba descriptiva cuantitativa y los valores de las variables químicas que se generaron durante la investigación se realizó un análisis de regresión por mínimos cuadrados parciales tipo dos para conocer la relación entre estas variables. Se encontró principalmente que los ésteres aportan notas florales a los mezcales elaborados con *A. potatorum*; los alcoholes superiores 1-butanol y 2-butanol se relacionaron con el atributo ardiente presente en el mezcal de *A. angustifolia* (Sierra Sur de Oaxaca), y el éster ftalato de dibutilo identificado en el mezcal elaborado con *A. karwinskii* de Sierra Sur de Oaxaca se correlacionó con el descriptor ahumado.

6.5 Literatura citada

- Barcenas, P., Elortondo, F. J. P., & Albisu, M. (2004). Projective mapping in sensory analysis of ewes milk cheeses: A study on consumers and trained panel performance. *Food Research International*, 37(7), 723–729. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2004.02.015>
- Barton, A., Hayward, L., Richardson, C. D., & McSweeney, M. B. (2020). Use of different panellists (experienced, trained, consumers and experts) and the projective mapping task to evaluate white wine. *Food Quality and Preference*, 83, 103900. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2020.103900>
- Botello-Álvarez, J. E., Estrada-Baltazar, A., Jiménez-Islas, H., Rico-Martínez, R., Navarrete-Bolaños, J. L., Cárdenas-Manríquez, M., & Molina-Guerrero, J. A. (2007). Compuestos volátiles en el mezcal. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 6(1), 41–50. Retrieved from <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=62060106>
- Castro Marin, A., Baris, F., Romanini, E., Lambri, M., Montevecchi, G., & Chinnici, F. (2021). Physico-Chemical and Sensory Characterization of a Fruit Beer Obtained with the Addition of Cv. Lambrusco Grapes Must. *Beverages*, 7(2), 34. <https://doi.org/10.3390/beverages7020034>
- Christoph, N., & Bauer-Christoph, C. (2007). Flavour of spirit drinks: Raw materials, fermentation, distillation, and ageing. *Flavours and Fragrances:*

- Chemistry, Bioprocessing and Sustainability*, 219–239.
https://doi.org/10.1007/978-3-540-49339-6_10
- Curtis, P. C. (2013). Untrained Sensory Panels. In *The Science of Meat Quality* (pp. 215–231). <https://doi.org/10.1002/9781118530726.ch12>
- Daute, M., Jack, F., Baxter, I., Harrison, B., Grigor, J., & Walker, G. (2021). Comparison of Three Approaches to Assess the Flavour Characteristics of Scotch Whisky Spirit. *Applied Sciences*, 11(4), 1410. <https://doi.org/10.3390/app11041410>
- Escofier, B., & Pagès, J. (1994). Multiple factor analysis (AFMULT package). *Computational Statistics & Data Analysis*, 18(1), 121–140. [https://doi.org/10.1016/0167-9473\(94\)90135-X](https://doi.org/10.1016/0167-9473(94)90135-X)
- Giacalone, D., Ribeiro, L., & Frøst, M. (2016). Perception and Description of Premium Beers by Panels with Different Degrees of Product Expertise. *Beverages*, 2(1), 5. <https://doi.org/10.3390/beverages2010005>
- Giacalone, D., Ribeiro, L. M., & Frøst, M. B. (2013). Consumer-Based Product Profiling: Application of Partial Napping® for Sensory Characterization of Specialty Beers by Novices and Experts. *Journal of Food Products Marketing*, 19(3), 201–218. <https://doi.org/10.1080/10454446.2013.797946>
- Gómez-Zamora, O., De Jesús-Fuentes, K. I., Peñafiel-López, F., & Tovar-Hernández, P. (2016). Perfil químico y organoléptico de los compuestos volátiles del mezcal. *Investigación y Desarrollo En Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 1(1), 916–923. Retrieved from <http://www.fcb.uanl.mx/IDCyTA/files/volume1/1/10/158.pdf>
- Gutiérrez-Sarmiento, W., Peña-Ocaña, B. A., Lam-Gutiérrez, A., Guzmán-Albores, J. M., Jasso-Chávez, R., & Ruíz-Valdiviezo, V. M. (2022). Microbial community structure, physicochemical characteristics and predictive functionalities of the Mexican tepache fermented beverage. *Microbiological Research*, 260, 127045. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127045>
- Heo, J. A., Kwak, H. S., Kim, M., Kim, J. H., Baek, H. H., Shin, H., ... Kim, S. S. (2020). Major sensory attributes and volatile compounds of Korean rice liquor (Yakju) affecting overall acceptance by Young consumers. *Foods*, 9(6), 1–

24. <https://doi.org/10.3390/FOODS9060722>
- Hernández-Gómez, L. F., Úbeda-Iranzo, J., García-Romero, E., & Briones-Pérez, A. (2005). Comparative production of different melon distillates: Chemical and sensory analyses. *Food Chemistry*, 90(1–2), 115–125. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.03.033>
- Hernández-Montes, A. (2007). *Evaluación sensorial de productos agroalimentarios*. Universidad Autónoma Chapingo: Chapingo, México.
- Issa-Issa, H., Lipan, L., Cano-Lamadrid, M., Nemés, A., Corell, M., Calatayud-García, P., Carbonell-Barrachina, Á. A., & López-Lluch, D. (2021). Effect of Aging Vessel (Clay-Tinaja versus Oak Barrel) on the Volatile Composition, Descriptive Sensory Profile, and Consumer Acceptance of Red Wine. *Beverages*, 7(2), 35. <https://doi.org/10.3390/beverages7020035>
- Josse, J., & Holmes, S. (2016). Measuring multivariate association and beyond. *Statistics Surveys*, 10(none). <https://doi.org/10.1214/16-SS116>
- Kroonenberg, P. M. (2008). *Applied Multiway Data Analysis*. <https://doi.org/10.1002/9780470238004>
- Llobell, F., Cariou, V., Vigneau, E., Labenne, A., & Qannari, E. M. (2020). Analysis and clustering of multiblock datasets by means of the STATIS and CLUSTATIS methods. Application to sensometrics. *Food Quality and Preference*, 79, 103520. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2018.05.013>
- Louw, L., Malherbe, S., Naes, T., Lambrechts, M., van Rensburg, P., & Nieuwoudt, H. (2013). Validation of two Napping® techniques as rapid sensory screening tools for high alcohol products. *Food Quality and Preference*, 30(2), 192–201. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2013.05.016>
- Marques, C., Correia, E., Dinis, L.-T., & Vilela, A. (2022). An Overview of Sensory Characterization Techniques: From Classical Descriptive Analysis to the Emergence of Novel Profiling Methods. *Foods*, 11(3), 255. <https://doi.org/10.3390/foods11030255>
- Næs, T., Berget, I., Liland, K. H., Ares, G., & Varela, P. (2017). Estimating and interpreting more than two consensus components in projective mapping: INDSCAL vs. multiple factor analysis (MFA). *Food Quality and Preference*,

- 58, 45–60. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2016.11.012>
- NMX-V-013-NORMEX-2019. Bebidas Alcohólicas-Determinación del Contenido Alcohólico. Retrieved December 8, 2020, from https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5594809&fecha=11/06/2020
- NOM-070-SCFI-2016. Bebidas Alcohólicas-Mezcal-Especificaciones. Retrieved December 7, 2020, from http://www.dof.gob.mx/normasOficiales/6437/seeco11_C/seeco11_C.html
- Oliver, P., Cicerale, S., Pang, E., & Keast, R. (2018). Comparison of Quantitative Descriptive Analysis to the Napping methodology with and without product training. *Journal of Sensory Studies*, 33(3), e12331. <https://doi.org/10.1111/joss.12331>
- Pagès, J. (2014). *Multiple Factor Analysis by Example Using R*. <https://doi.org/10.1201/b17700>
- Parish-Virtue, K., Herbst-Johnstone, M., Bouda, F., Fedrizzi, B., Deed, R. C., & Kilmartin, P. A. (2021). Aroma and Sensory Profiles of Sauvignon Blanc Wines from Commercially Produced Free Run and Pressed Juices. *Beverages*, 7(2), 29. <https://doi.org/10.3390/beverages7020029>
- Pedrero, D. L., & Pangborn, R. M. (1997). *Evaluación sensorial de los alimentos : métodos analíticos*. México: Alhambra Mexicana.
- Peltier, C., Mammasse, N., Visalli, M., Cordelle, S., & Schlich, P. (2018). Do we need to replicate in sensory profiling studies? *Food Quality and Preference*, 63, 129–134. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2017.09.001>
- Puri, R., Khamrui, K., Khetra, Y., Malhotra, R., & Devraja, H. C. (2016). Quantitative descriptive analysis and principal component analysis for sensory characterization of Indian milk product cham-cham. *Journal of Food Science and Technology*, 53(2), 1238–1246. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-2089-4>
- Putri, S. L. E., Suantika, G., Situmorang, M. L., Christina, J., Nikijuluw, C., Putri, S. P., & Fukusaki, E. (2021). Shrimp count size: GC/MS-based metabolomics approach and quantitative descriptive analysis (QDA) reveal the importance

- of size in white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Metabolomics*, 17(2), 19. <https://doi.org/10.1007/s11306-020-01766-z>
- Reinbach, H. C., Giacalone, D., Ribeiro, L. M., Bredie, W. L. P., & Frøst, M. B. (2014). Comparison of three sensory profiling methods based on consumer perception: CATA, CATA with intensity and Napping®. *Food Quality and Preference*, 32, 160–166. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2013.02.004>
- Rios-Colín, A. C., Ruiz-Vega, J., Silva-Rivera, M. E., Caballero-Caballero, M., & Montes-Bernabé, J. L. (2022). Evaluación longitudinal de la sustentabilidad del subsistema de producción maguey-mezcal artesanal, en el municipio de Villa Sola de Vega, Oaxaca, México. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 25(1). <https://doi.org/10.56369/tsaes.4105>
- Tabary, C., Miège, M., Brémaud, D., Carvalho, L., & Vincenzi, F. (2021). A tool to help the panel leader to best monitor a sensory panel performance. *Journal of Sensory Studies*, 36(1). <https://doi.org/10.1111/joss.12613>
- Tapp, H. S., Defernez, M., & Kemsley, E. K. (2003). FTIR Spectroscopy and Multivariate Analysis Can Distinguish the Geographic Origin of Extra Virgin Olive Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(21), 6110–6115. <https://doi.org/10.1021/jf030232s>
- Tenenhaus, M., Pagès, J., Ambroisine, L., & Guinot, C. (2005). PLS methodology to study relationships between hedonic judgements and product characteristics. *Food Quality and Preference*, 16(4), 315–325. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2004.05.013>
- Thibodeau, M., & Pickering, G. (2021). Perception of Aqueous Ethanol Binary Mixtures Containing Alcohol-Relevant Taste and Chemesthetic Stimuli. *Beverages*, 7(2), 23. <https://doi.org/10.3390/beverages7020023>
- Thibodeau, M., & Pickering, G. J. (2019). The role of taste in alcohol preference, consumption and risk behavior. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(4), 676–692. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1387759>
- Vera-Guzmán, A., Santiago-García, P., & López, M. (2009). Compuestos volátiles aromáticos generados durante la elaboración de Mezcal de Agave angustifolia Y Agave potatorum. In *Artículo Científico Rev. Fitotec. Mex* (Vol.

32).

- Villarreal-Morales, S. L., Montañez-Saenz, J. C., Aguilar-González, C. N., & Rodriguez-Herrera, R. (2018). Metagenomics of Traditional Beverages. In *Advances in Biotechnology for Food Industry* (pp. 301–326). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811443-8.00011-6>
- Wold, S., Sjöström, M., & Eriksson, L. (2001). PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 58(2), 109–130. [https://doi.org/10.1016/S0169-7439\(01\)00155-1](https://doi.org/10.1016/S0169-7439(01)00155-1)

7. CONCLUSIONES GENERALES

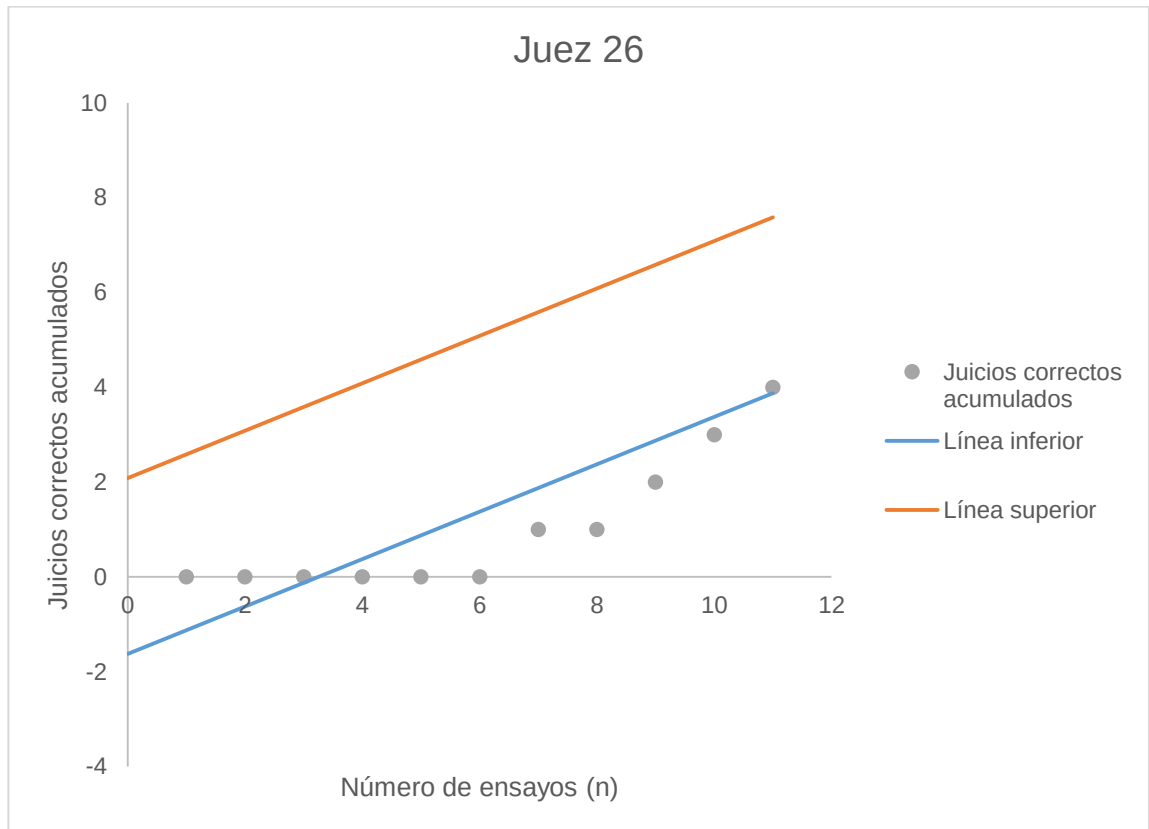
La implementación de metabolómica no dirigida mediante espectroscopía de ^1H -NMR acoplada a análisis estadístico multivariado permitió la evaluación de mezcales ancestrales y artesanales, con el fin de obtener perfiles holísticos con base al proceso de manufactura, especie de agave y región geográfica.

El análisis estadístico multivariado de la matriz de datos de ^1H -NMR produjo capacidad discriminante limitada en el mezcal de diversas especies de agave y regiones geográficas, lo que es atribuido a la calidad de la matriz de ^1H -NMR del mezcal, que a su vez refleja la falta de controles de calidad rigurosos en la producción de la bebida. Sin embargo, al diseñar e implementar una metodología metabolómica basada en GC-MS se logró mejorar la calidad del modelo para discriminar mezcales elaborados bajo procesos ancestrales y artesanales. Asimismo, se identificaron doce metabolitos, los cuales fueron confirmados con su análisis de perfil de masas obtenidos por ionización de electrones (EI-MS).

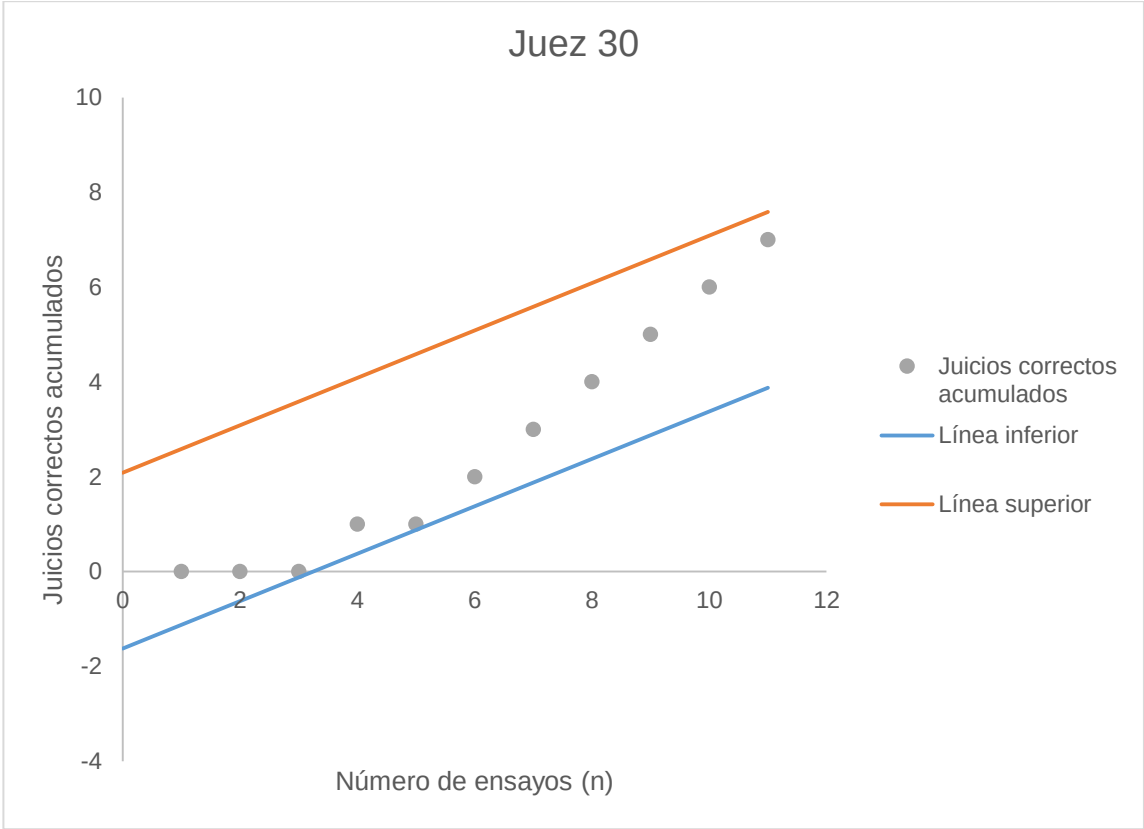
También se encontró que la propuesta de establecer rutinas experimentales mediante espectroscopía de infrarrojo permitió discriminar, de una forma rápida y sencilla, los mezcales ancestrales de los artesanales elaborados con diferentes especies de agave y procedentes de diversas regiones geográficas. Finalmente, el análisis descriptivo cuantitativo y las pruebas Napping permitieron proponer el perfil sensorial de seis mezcales elaborados con los agaves *A. potatorum*, *A. angustifolia* y *A. karwinskii* bajo dos procesos de manufactura. Los atributos fermentado, floral, ahumado, barro, ácido y amargo presentaron diferencias estadísticamente significativas entre las muestras evaluadas, por lo tanto, son los principales responsables de las diferencias encontradas en los mezcales por los panelistas.

8. ANEXOS

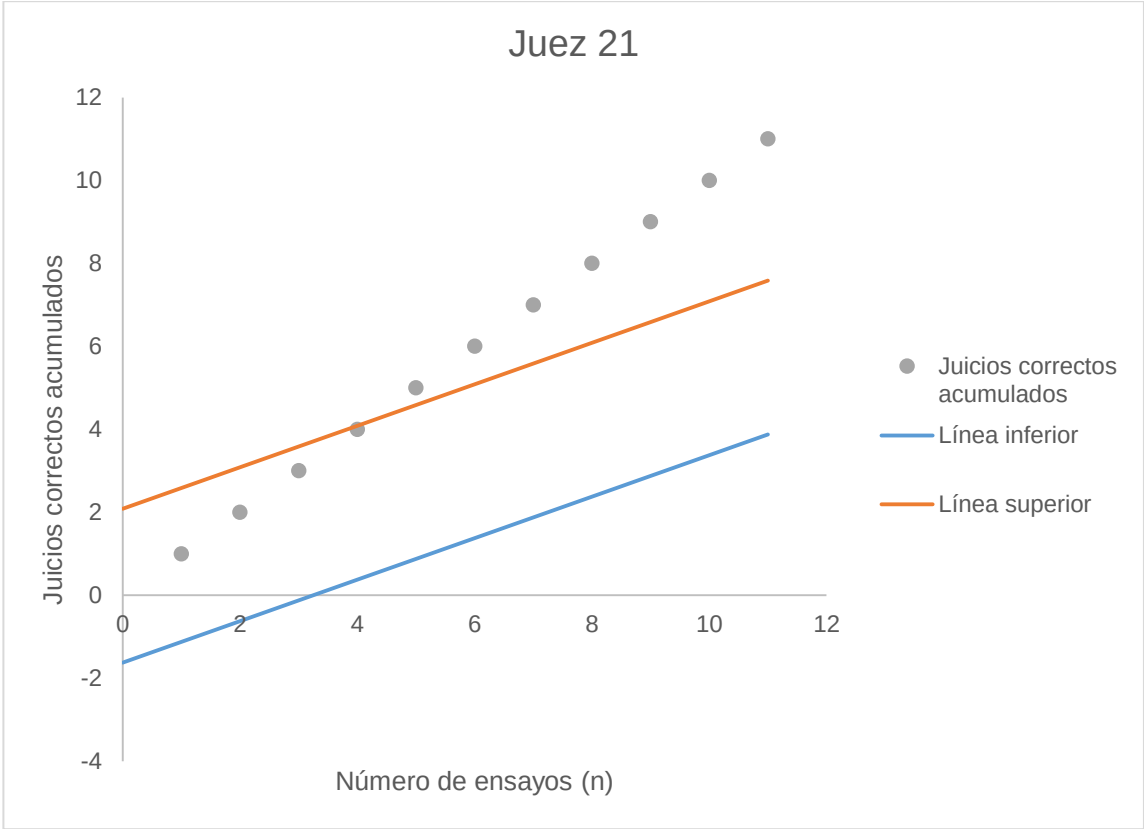
Anexo 1A: panelista rechazado



Anexo 1B: panelista ubicado entre líneas inferior y superior



Anexo 1C: panelista aceptado



Anexo 2: variables empleadas en el análisis PLS-R tipo dos.

Código	Cítricos	Fermentado	Floral	Ahumado	Barro	Solvente	Ácido	Astringente	Ardiente	Amargo	Frutal
239	7.0	6.5	4.9	6.2	4.5	4.1	6.3	5.4	10.6	8.4	6.2
245	7.9	6.0	6.2	6.2	4.1	3.6	5.5	5.2	10.7	8.6	6.4
373	7.2	7.3	4.9	6.6	4.9	4.9	5.5	5.4	10.3	8.5	5.6
688	7.4	6.3	4.4	5.4	4.6	4.9	6.3	5.8	10.6	8.5	6.2
863	7.7	5.6	4.6	5.8	4.0	3.9	6.4	5.8	9.9	7.6	5.5
949	7.3	5.9	4.2	6.5	3.1	4.8	6.2	5.6	10.3	8.9	5.5

Continuación Anexo 2 (el 3-metil-1-butanol está cuantificado en mg/100 mL)

Código	Decanoato de etilo	Dodecanoato de etilo	Hexadecanoato de etilo	Bis (2-etilhexilo) adipato	Octanoato de etilo	Alcohol fenético	Ftalato de dibutilo	3-metil-1-butanol
239	8.23	3.32	0	0.11	7.19	8.2	0	499
245	5.38	1.09	0	1.6	6.52	5.12	0	571
373	0	0	0.54	0.23	0	1.63	0	504
688	2.56	0.85	0	0	2.58	5.19	0	569
863	10.18	3.86	0	3.49	8.37	13.81	0.25	655
949	2.01	0	0	0.63	3.22	0	3.42	570

Continuación Anexo 2 (propanol, 2butanol, Furfural, metanol y 1-butanol están cuantificados en mg/100 mL, el etanol en % Alc. Vol. y Sólidos solubles totales en °Brix.

Código	Propanol	2-butanol	Furfural	Metanol	1-butanol	Etanol	pH	Sólidos solubles totales
239	128	4	8	587	5	47.2	4.6	16.7
245	206	8	8	1025	2	46.5	4.4	16.6
373	189	3	14	1277	4	49.3	4.4	17.3
688	187	7	14	1474	5	49.4	4.3	17.2
863	74	0	3	443	2	39.8	4.2	15.1
949	120	2	5	1209	2	49.1	4.5	17.2

Anexo 3: artículo publicado



Article

Comparative NMR Metabolomics Profiling between Mexican Ancestral & Artisanal Mezcal and Industrialized Wines to Discriminate Geographical Origins, Agave Species or Grape Varieties and Manufacturing Processes as a Function of Their Quality Attributes

Rosa López-Aguilar ¹, Holber Zuleta-Prada ², Arturo Hernández-Montes ^{1,*} and José Enrique Herbert-Pucheta ^{3,4,*} 

¹ Departamento de Ingeniería Agroindustrial, Universidad Autónoma Chapingo, km. 38.5 Carretera México-Texcoco, 56230 Chapingo, Estado de México, Mexico; rosloagg@gmail.com

² Laboratorio de Productos Naturales, Área de Química, Departamento de Preparatoria Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, km. 38.5 Carretera México-Texcoco, 56230 Chapingo, Estado de México, Mexico; hozuleta_13@comunidad.unam.mx

³ Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología-Laboratorio Nacional de Investigación y Servicio Agroalimentario Forestal, Universidad Autónoma Chapingo, 56230 Chapingo, Estado de México, Mexico

⁴ Departamento de Química Orgánica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Prolongación de Carpio y Plan de Ayala s/n, Colonia Santo Tomás, 11340 Ciudad de México, Estado de México, Mexico

* Correspondence: ahernandezmo@chapingo.mx (A.H.-M.); jeherbert@conacyt.mx (J.E.H.-P.); Tel.: +52-5959521787 (A.H.-M.); +52-5521050381 (J.E.H.-P.)



Citation: López-Aguilar, R.; Zuleta-Prada, H.; Hernández-Montes, A.; Herbert-Pucheta, J.E. Comparative NMR Metabolomics Profiling between Mexican Ancestral & Artisanal Mezcal and Industrialized Wines to Discriminate Geographical Origins, Agave Species or Grape Varieties and Manufacturing Processes as a Function of Their Quality Attributes. *Foods* **2021**, *10*, 137. <https://doi.org/10.3390/foods10010137>

Abstract: The oenological industry has benefited from the use of Nuclear Magnetic Resonance (¹H-NMR) spectroscopy in combination with Multivariate Statistical Analysis (MSA) as a foodomics tool for retrieving discriminant features related to geographical origins, grape varieties, and further quality controls. Said omics methods have gained such attention that Intergovernmental Organizations and Control Agencies are currently recommending their massive use amongst countries as quality compliances for tracking standard and degradation parameters, fermentation products, polyphenols, amino acids, geographical origins, appellations d'origine contrôlée and type of monovarietal strains in wines. This study presents, for the first time, a ¹H-NMR/MSA profiling of industrial Mexican wines, finding excellent statistical features to discriminate between oenological regions and grape varieties with supervised Orthogonal Projections to Latent Structures Discriminant Analysis (OPLS-DA). In a comparative way, it is applied with the ¹H-NMR/OPLS-DA workflow for the first time in ancestral and artisanal Mexican mezcals with promising results to discriminate between regions, agave species

Anexo 4: artículo enviado

Page 1 of 41

Journal of Agricultural and Food Chemistry

**GC-MS metabolomics of volatile analytes in Mexican mezcals for
fingerprinting ancestral & artisanal manufacture processes, geographical
origins and agave species**

Emanuel Hernández-Núñez, Germán Giacomán-Vallejos, Avel González-Sánchez, Arturo
Hernández-Montes, Rosa López-Aguilar* and José Enrique Herbert-Pucheta*

Abstract: A non-targeted and targeted metabolomics approach for fingerprinting and identifying discriminant metabolites in Mexican mezcals based on direct immersion solid-phase micro-extraction (DI-SPME) and gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) using multivariate statistical analysis (MSA) to discriminate between ancestral and artisanal manufacturing processes, geographical origins and agave's species. The GC-MS-MSA workflow allowed an unequivocal identification of twelve marker compounds that were confirmed with their Electronic-Impact Mass Spectrometry (EI-MS) mirror image mass-profile analysis, comprising a pairwise comparison between experimental m/z patterns and data obtained from the National Institute of Standards and