



Sistema Nacional de Institutos Tecnológicos



Dirección General de Institutos Tecnológicos



Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez

INGENIERÍA BIOQUÍMICA

**IMPLEMENTACION PARA SU VALIDACION DE
METODOS DE ENSAYO PARA DETERMINAR
CALIDAD DE TEQUILA COMITECO**

RESIDENCIA PROFESIONAL

Presenta:

María Victoria Patishtán Hernández

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas a 23 de Junio de 2011.

Índice

| | |
|---|-----------|
| 1.- Introducción..... | 4 |
| 2.- Justificación..... | 5 |
| 3.- Objetivos..... | 6 |
| 3.1.- Objetivo general..... | 6 |
| 3.2.- Objetivo específico..... | 6 |
| 4.- Caracterización del área de participación..... | 6 |
| 4.1.- Misión..... | 7 |
| 4.2.- Visión..... | 7 |
| 5.- Problemas a resolver priorizándolos..... | 7 |
| 6.- Alcances y limitaciones..... | 7 |
| 6.1.- Alcances..... | 7 |
| 6.2.- Limitaciones..... | 8 |
| 7.- Fundamento teórico..... | 8 |
| 7.1.- Antecedentes..... | 8 |
| 7.2.- Género agave..... | 9 |
| 7.3.- Especies de agave..... | 9 |
| 7.4.- Categorías del tequila..... | 10 |
| 7.4.1.- Clases de tequila..... | 11 |
| 7.5.- Compuestos orgánicos: Aldehídos y Ésteres..... | 12 |
| 7.5.1.- Ésteres..... | 12 |
| 7.5.2.- Aldehídos..... | 13 |
| 7.6.- Cenizas..... | 13 |
| 7.7.- Extracto seco..... | 14 |

| | |
|--|-----------|
| 7.8.- Azúcares reductores..... | 15 |
| 7.9.- Grado alcohólico..... | 15 |
| 8.- Procedimiento y descripción detallada de actividades..... | 17 |
| 8.1.- Determinación del por ciento alcohol..... | 17 |
| 8.2.- Determinación de ésteres y aldehídos | 19 |
| 8.3.- Determinación de azúcares reductores..... | 23 |
| 8.4.- Determinación de extracto seco..... | 26 |
| 8.5.- Determinación de cenizas..... | 28 |
| 9.- Resultados y discusión..... | 29 |
| 9.1.- Resultados..... | 29 |
| 9.2.- Discusión de resultados..... | 31 |
| 10.- Conclusión..... | 37 |
| 11.- Sugerencias y recomendaciones..... | 37 |
| 12.- Anexos..... | 39 |
| 12.- Bibliografía..... | 43 |

1. Introducción

El laboratorio de Bromatología de ECOSUR se encuentra dentro del sistema de gestión de la calidad de los laboratorios institucionales, este sistema ha sido desarrollado para establecer una apropiada y eficiente administración del área y sus recursos, asegurar la confiabilidad de los resultados de los ensayos mediante la utilización de métodos analíticos validados y trazables a patrones nacionales e internacionales, así como brindar una constante capacitación al personal del área con la intención de cumplir ampliamente con los requerimientos de nuestros usuarios y los requisitos de la norma NMX-EC-17025-IMNC-en su última versión.

Como parte del sistema de gestión de calidad, los métodos que se utilizan para cada análisis se sustentan en Normas Oficiales Mexicanas, estos métodos se deben confirmar en su desempeño o validar de acuerdo a las condiciones de infraestructura propia.

La aplicación del requisito a la validación de métodos, particularmente en NMX-EC-17025-IMNC, es frecuentemente materia de controversia dado que puede interpretarse que cuando un método es mencionado o descrito en una norma, entonces denominado método normalizado, no es necesaria la validación del mismo. Por otro lado y también en muchas ocasiones, los evaluadores de laboratorios exigen el cumplimiento del requisito de validación cuando sólo es necesaria la demostración de la capacidad del evaluado para aplicar un método suficientemente validado.

La importancia de realizar los análisis físico-químicos en la bebida radica en que nos ayuda a evaluar la calidad de la misma ya que la industria de las bebidas alcohólicas destiladas han tenido un auge en el consumo a nivel mundial y la generación de ingresos de este tipo de industria, ha provocado que en muchos lugares del mundo se produzcan de forma casera para generar un producto con alto grado alcohólico a bajo precio al no producirse dentro de compañías confiables.

Los componentes volátiles de las bebidas alcohólicas consisten en una amplia gama de compuestos que incluyen ácidos, alcoholes, aldehídos, ésteres y otros

compuestos trazas. Estos compuestos se pueden generar en diferentes etapas de la elaboración de las bebidas alcohólicas.

Es necesario el control analítico de estos productos denominados alcohólicos a razón del riesgo que implica en el abuso de su consumo, ya que tiene implicaciones legales y de salud el hecho de estar fuera de las normas establecidas sin cumplir con estándares de calidad.

El presente trabajo consiste en la implementación para la validación de métodos de ensayo para determinar calidad de mezcal comiteco de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-006-SCFI-2004 bebidas alcohólicas–tequila especificaciones que incluye: ácidos, alcoholes, aldehídos, ésteres, azúcares reductores, extracto seco y cenizas, estos compuestos se pueden generar en diferentes etapas de la elaboración de la bebida. Se realizó en la instalación del laboratorio tomando en cuenta los parámetros de validación parcial como: Reproducibilidad y Repetibilidad.

La bebida alcohólica que se usó para las determinaciones es proveniente de Comitán, clasificado en tequila blanco.

2. Justificación

La elaboración del tequila comiteco es una actividad tradicional que ha existido desde hace muchos años ocupando como materia prima el *Agave atrovierins*, actividad que genera ingresos económicos para las familias comitecas. Sin embargo, en Comitán la elaboración de la bebida alcohólica se ha llevan a cabo de manera artesanal y sin control de calidad alguno.

Desde entonces existe el interés por parte de los productores por mejorar las condiciones de elaboración y de aplicar medidas para tener un control de calidad, tipificar y permitir la autenticidad del mismo.

Las metodologías son parte de las Normas Mexicanas respecto a la presencia de ésteres, aldehídos, azúcares reductores, porcentaje de alcohol, furfural, alcoholes superiores, metanol, cenizas, extracto seco y metales pesados, que están asociados a la capacidad antioxidante del tequila, que serán implementadas en el laboratorio de bromatología para su posterior validación.

3. Objetivos

3.1.- General

Implementar para su validación los métodos de ensayo que determinan la calidad de tequila de agave Comiteco.

3.2.- Específicos

- Implementar los métodos para el mezcal comiteco de acuerdo a la Norma Oficial establecida.
- Determinar los análisis fisicoquímicos para bebidas alcohólicas destiladas tipo comiteco.
 - a. Determinación de ésteres
 - b. Determinación de aldehídos
 - c. Determinación de extracto seco
 - d. Determinación del contenido de cenizas
 - e. Determinación de alcoholes superiores
 - f. Determinación de furfural
 - g. Determinación de azúcares reductores
 - h. Determinación por ciento de alcohol
- Determinar si los parámetros fisicoquímicos, se encuentran dentro los criterios establecidos como control de calidad en la norma respectiva.

4. Caracterización del área de participación.

El área donde se realizó el proyecto fue en el Laboratorio de Bromatología de El Colegio de la Frontera Sur (centro público de investigación del CONACYT). Carretera Panamericana y Periférico Sur s/n Barrio Ma. Auxiliadora C.P 29290 San Cristóbal de las Casas, Chiapas. Tel 01967 67 4 900, extn 1800.

4.1.- MISIÓN

El Colegio de la Frontera Sur es un centro de investigación científica, con enfoque multidisciplinario de carácter nacional e internacional que busca contribuir al desarrollo sustentable de la frontera sur de México, Centroamérica y el Caribe a través de la generación de conocimientos, la formación de recursos humanos y la vinculación desde las ciencias sociales y naturales.

4.2.- VISIÓN

Una visión regional de los retos del desarrollo sustentable, comprometida con el desarrollo conjunto de los países vecinos de América Central y el Caribe. La convicción de que la investigación es esencial para construir las bases de conocimiento y capacidad requeridas para lograr un desarrollo equitativo y sustentable en beneficio de las poblaciones marginadas de la frontera sur.

5. Problemas a resolver priorizándolos.

El problema a resolver es implementar o estandarizar los métodos para la bebida alcohólica “Tequila Comiteco” de acuerdo a la NOM-006-SCFI-2004 y comparar los valores obtenidos con los criterios de aceptación establecidos en cada parámetro fisicoquímico.

6. Alcances y limitaciones

6.1.- Alcances

Se implementaron o estandarizaron las metodologías en el laboratorio de acuerdo a la infraestructura existente. Se realizó la documentación de estas según el sistema de calidad establecido en los laboratorios institucionales. Se realizaron ensayos de repetibilidad y reproducibilidad como primera fase de la implementación de las metodologías. Se compararon los datos obtenidos para verificar si se encuentran dentro de los criterios establecidos por la Norma Oficial Mexicana vigente NOM-006-SCFI-2004.

6.2.- Limitaciones

Debido a la falta de reactivos y equipos no disponibles no se realizaron las siguientes determinaciones: alcoholes superiores, metanol, furfural y metales pesados. El tiempo fue un factor para no culminar con la validación de cada método, y el material de referencia de la misma.

7. Fundamento teórico

7.1.- Antecedentes

Los agaves han sido utilizados por los habitantes de Mesoamérica desde hace aproximadamente 9.000 años. En general, antes de la llegada de los españoles la utilidad de los agaves fue para la producción de azúcares y fibras. Su uso decayó cuando el cultivo de la caña de azúcar llegó a México con los conquistadores.

El género *Agave*, cuyo significado es en griego: “noble” o “admirable” fue dado a conocer a la ciencia por Carlos Linneo en 1753 . Las plantas del género *Agave* son originarias del continente americano, con la mayor concentración de especies nativas de México en donde se les conoce con los nombres comunes de “magueyes” o “mezcales”. Especies de agave importantes en la producción de fibras son el “henequén” (*Agave fourcroides*), *Agave sisalan* y el *Agave tequilana*, con el cual se produce fibra a partir de la raíz con el bagazo de desecho de la industria tequilera y fibra de las hojas o pencas (Bob Emmons).

Los agaves producen distintos tipos de bebida. La savia natural cuando se extrae es de sabor dulce y se le conoce con el nombre de aguamiel, a éste mismo, después de fermentado se le llama pulque. El líquido destilado derivado de los agaves es conocido como mezcal o tequila. Otras bebidas destiladas de *Agave*, de importancia regional son la “raicilla” y el “vino barranca”. En los años recientes, se han cultivado cientos de hectáreas en el oeste de México con *Agave tequilana* y otras especies emparentadas, de cuyos tallos se destila el licor llamado tequila.

7.2.- Género *Agave*

Grupo americano de más de 200 especies. Gentry (1982) reconoció más de 136 especies sólo de Norteamérica. Muchas son cultivadas como ornamentales o para cercas vivas, por las fibras que contienen en sus hojas, como forraje y para la elaboración de pulque, mezcal, tequila y otros derivados (Lehtonen, M. y H. Suomalainen).

7.3.- Especies de *agave*

Se utiliza como única materia prima básica para la elaboración del Tequila, la popular bebida mexicana. A lo largo y ancho de la República Mexicana existen diferentes variedades de *Agaves*:

- Pulquero, para la fabricación de cuerdas.
- La variedad Azul es la que da origen al Tequila. El *Agave tequilana* Weber Variedad Azul se localiza en 181 municipios de seis estados de la República que forman parte de la Denominación de Origen Tequila como son: Jalisco, Michoacán, Tamaulipas, Nayarit, Guanajuato y Veracruz. Solamente en esos estados se puede utilizar la materia prima para la elaboración del Tequila.

De acuerdo con la definición prevista en la Norma Oficial Mexicana NOM-006-SCFI-2005 Bebidas Alcohólicas – Tequila – Especificaciones, Tequila es la “Bebida alcohólica regional obtenida por destilación de mostos, preparados directa y originalmente del material extraído, en las instalaciones de la fábrica de un Productor Autorizado la cual debe estar ubicada en el territorio comprendido en la Declaración, derivados de las cabezas de *Agave tequilana* Weber variedad azul, previa o posteriormente hidrolizadas o cocidas, y sometidos a fermentación alcohólica con levaduras, cultivadas o no, siendo susceptibles los mostos de ser enriquecidos y mezclados conjuntamente en la formulación con otros azúcares hasta en una proporción no mayor de 49% de azúcares reductores totales expresados en unidades de masa, en los términos establecidos por la NOM-006-SCFI-2004 y en la inteligencia que no están permitidas las mezclas en frío.

El Tequila es un líquido que, de acuerdo a su clase, es incoloro o coloreado cuando es madurado o cuando es abocado sin madurarlo (Bob Emmons).

Actualmente está resurgiendo la elaboración del auténtico comiteco, elaborado con la variedad de agave *Atrovirens haw* (maguey pulquero) es el que produce principalmente aguamiel, se encuentra por las zonas de clima frío templado, resiste sequía, raíz fibrosa, tallo corto y grueso, hojas verdes gruesas, florece una sola vez, con un qurote de 5 metros, excelente para aprovechar su ixtle. El maguey del comiteco tiene su hábitat natural en altitudes de los 900 a 1,800 metros sobre el nivel del mar, clima semiseco, suelo semiárido y duro, justo como el de la región alta de Comitán, donde comulga con árboles serranos como el pino y el roble blanco, cuya madera es idónea para su añejamiento en barricas.

Tiene una altura promedio de tres metros, ocupa un área de nueve metros cuadrados, es muy parecido al maguey pulquero del altiplano central (Hidalgo, Puebla, Tlaxcala, Estado de México); el acopio de aguamiel es similar al de éste (los tlachiqueros primero perforan su corazón o pulpa, luego lo raspan cada día para acopiar sus jugos) y cada planta produce de 300 a 400 litros durante varios meses de tlachique.



Fig 1. - Agave *Atrovirens Haw* (maguey pulquero)

7.4.- Categorías del tequila

De acuerdo al porcentaje de los azúcares provenientes del Agave que se utilice en la elaboración del Tequila, éste se puede clasificar en una de las siguientes categorías:

- **100% de agave:** es el producto, que no es susceptible de ser enriquecido con otros azúcares distintos a los obtenidos del *Agave tequilana* weber variedad azul cultivado en el territorio comprendido en la Declaración.

Para que este producto sea considerado como “Tequila 100% de agave” debe ser envasado en la planta que controle el propio Productor Autorizado, misma que debe estar ubicada dentro del territorio comprendido en la Declaración.

- **Tequila:** es el producto, en el que los mostos son susceptibles de ser enriquecidos y mezclados conjuntamente en la formulación con otros azúcares hasta en una proporción no mayor de 49% de azúcares reductores totales expresados en unidades de masa.

Este producto puede ser envasado en plantas ajenas a un Productor Autorizado, siempre y cuando los envasadores cumplan con las condiciones establecidas en la Norma Oficial Mexicana del Tequila.

7.4.1.- Clases de tequila

De acuerdo a las características adquiridas en procesos posteriores a la destilación, el Tequila se clasifica en una de las siguientes clases:

- Tequila blanco: producto cuyo contenido alcohólico comercial debe, en su caso, ajustarse con agua de dilución.

Es el que se obtiene después de la destilación. Pasa a las embotelladoras casi inmediatamente, es decir que solo está en barricas de encino unas horas o días por lo cual su sabor no varía. De allí pasa a los tanques surtidores de las máquinas embotelladoras. Allí se les hace nuevamente un proceso de filtrado y homogeneizado. En las botellas tiene una graduación mínima de 35°GL y hasta un máximo de 55 °GL.

- Tequila joven u oro: producto susceptible de ser abocado, su contenido alcohólico comercial debe, en su caso, ajustarse con agua de dilución.

El resultado de las mezclas de Tequila blanco con Tequilas reposados o añejos se considera como Tequila joven u oro.

- Tequila reposado.- Producto susceptible de ser abocado, sujeto a un proceso de maduración de por lo menos dos meses hasta menos de un año en contacto directo con la madera de recipientes de roble o encino. Es más suave que el blanco, tiene un color natural dorado tenue hasta un ámbar claro, y su sabor tiene un dejo a madera. Su graduación es de 35°GL y hasta un máximo de

55°GL .Su contenido alcohólico comercial debe, en su caso, ajustarse con agua de dilución. El resultado de las mezclas de Tequila reposado con Tequilas añejos se considera como Tequila reposado.

- El añejo: es el que se madura un año por lo menos en barricas de roble blanco, nuevas o de segundo uso de 600 L de capacidad. Su color va de un dorado fuerte a un ámbar oscuro. Su sabor está fuertemente impregnado con la madera. Se pueden añejar varios años (hasta 10). Su graduación alcohólica es de 35 a 55°GL. Es el más sofisticado y refinado de todos. El resultado de las mezclas de Tequila añejo con Tequila extra añejo se considera como Tequila añejo

- Extra añejo: producto susceptible de ser abocado, sujeto a un proceso de maduración de por lo menos tres años, sin especificar el tiempo de maduración en la etiqueta, en contacto directo con la madera de recipientes de roble o encino, cuya capacidad máxima sea de 600 litros, su contenido alcohólico comercial debe, en su caso, ajustarse con agua de dilución.

7.5.- Compuestos orgánicos: aldehídos y ésteres.

En el proceso de elaboración de las bebidas alcohólicas, principalmente en las etapas de cocción y fermentación, se producen compuestos orgánicos como aldehídos y ésteres, que son productos de la oxidación del etanol y que contribuyen a dar sabor y aroma al producto. Estos compuestos también se incorporan a las bebidas alcohólicas a partir de la madera de las barricas donde se reposan y añejan. (Peterson, w.r.).

Estos compuestos pueden llegar a ser tóxicos si rebasan ciertos límites de concentración en las bebidas alcohólicas, provocando desde irritación de mucosas hasta efectos narcóticos.

7.5.1.- Ésteres

El acetato de etilo es el éster que se encuentra en mayor cantidad de las bebidas alcohólicas y contribuye a la integración del bouquet. La síntesis del acetato de etilo se inicia en la fase activa de la fermentación, aumenta proporcionalmente con

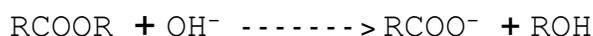
el etanol y llega a detenerse cuando la concentración de azúcar fermentesible tiende a cero (Eduardo P. Yufera).

Un éster es capaz de hidrolizarse en sus constituyentes ácido y alcohol



Como fundamento de un método analítico, la anterior reacción no es satisfactoria por estar descrita en esa forma, porque tal el equilibrio no esté lo suficientemente desplazado hacia la derecha, o porque es demasiada lenta la hidrólisis en agua pura. Además en solución alcalina, el ácido producido se convierte en su base conjugada y esta reacción secundaria desplaza completamente el equilibrio hacia la derecha (F. Klages).

Por estas razones, la hidrólisis de un éster, como medio de análisis, se efectúa siempre en medio alcalino fuerte. La reacción se escribe:



y este proceso se conoce como saponificación.

7.5.2.- Aldehídos

Está reportado que un gran número de aldehídos se encuentran presentes en las bebidas alcohólicas pero sólo algunos de ellos son de importancia. El acetaldehído CH_3CHO que es el más común, está presente en cantidades significantes (F. Klages).

El acetaldehído es un precursor del acetato así como del etanol, es formado a partir del piruvato por medio de enzimas glucolíticas. Existe una variación en la cantidad presente en las bebidas, cantidad que dependerá del tipo de proceso llevado a cabo y de la identidad de la bebida.

El etanol y el acetaldehído reaccionan lentamente para formar acetal, un compuesto de un olor bastante pronunciado y por consecuencia indeseable. Desde el punto de vista sensorial el acetaldehído es de suma importancia a razón de que sus reacciones con otros compuestos carbonílicos perjudican la calidad final de la bebida (Lehtonen, M. y H. Suomalainen).

7.6.- Extracto seco.

Por extracto seco se entiende la totalidad de las sustancias restantes después del proceso de evaporación. Entre estas sustancias se encuentran hidratos de carbono, glicerina, ácidos volátiles, combinaciones nitrogenadas, sustancias tánicas, colorantes, alcoholes superiores y minerales. El método se basa en la medición de la diferencia de pesos que sufre la muestra al pasar por un proceso de calentamiento controlado en el cual se evaporan las sustancias volátiles .

7.7.- Cenizas

La ceniza es el producto de la combustión de algún material, compuesto por sustancias inorgánicas no combustibles, como sales minerales. En el análisis de alimentos también se conoce con el nombre de cenizas al conjunto de minerales que no arden ni se evaporan. Después de calcinarlo o quemar la muestra orgánica. Las cenizas obtenidas no tienen necesariamente la misma composición que la materia mineral presente en el alimento original, ya que pueden haber existido pérdidas por volatilización o alguna interacción entre los constituyentes. El valor de las cenizas puede considerarse como una medida general de la calidad, y a menudo es un criterio útil para determinar la identidad de un alimento. Cuando hay un alto contenido de cenizas se sugiere la presencia de un adulterante inorgánico (K. Weissermel y H. J. Arpe).

En el caso de bebidas alcohólicas las cenizas se componen de la totalidad de cationes y aniones inorgánicos, más el ácido carbónico que recibe durante la combustión y el oxígeno. Los aniones comúnmente encontrados son sulfatos, fosfatos, cloruros y en cantidades menores fluoruros, bromuros, yoduros y boratos, como complemento los metales que componen las sales minerales que constituyen las cenizas son: potasio, sodio, calcio, hierro, cobre y en pequeñas cantidades aluminio, zinc, manganeso, arsénico y plomo estos dos últimos metales en concentraciones menores a 1 ppm (F. Klages).

Las cenizas se producen por calcinación del extracto seco de la bebida obteniendo comúnmente residuos blancos a temperatura entre 550 y 600 °C estando constituidas por sales minerales.

7.8.- Azúcares reductores

Los azúcares reductores, provocan la alteración de las proteínas mediante la reacción de glucosilación no enzimática también denominada reacción de Maillard o glicación. Esta reacción se produce en varias etapas: las iniciales son reversibles y se completan en tiempos relativamente cortos, mientras que las posteriores transcurren más lentamente y son irreversibles (Allinger N. L. et. Al) . Se postula que tanto las etapas iniciales como las finales de la glucosilación están implicadas en los procesos de envejecimiento celular y en el desarrollo de las complicaciones crónicas de la diabetes. La glucosa es el azúcar reductor más abundante en el organismo. Su concentración en la sangre está sometida a un cuidadoso mecanismo de regulación en individuos sanos, y en personas que padecen diabetes, aumenta sustancialmente. Esto lleva a que este sea el azúcar reductor generalmente considerado en las reacciones de glucosilación no enzimática de interés biológico. Sin embargo, cualquier azúcar que posea un grupo carbonilo libre puede reaccionar con los grupos amino primarios de las proteínas para formar bases de Schiff. La reactividad de los distintos azúcares está dada por la disponibilidad de su grupo carbonilo. Se sabe que la forma abierta o extendida de los azúcares no es muy estable, a tal punto que, por ejemplo, en la glucosa representa sólo el 0,002 % (Peterson, W.R).

De hecho, los azúcares fosfato, que son azúcares reductores de gran importancia en el interior celular, poseen mayor capacidad glucosilante que la glucosa dada su mayor proporción de forma carbonílica (abierta). La sacarosa es un disacárido que no posee carbonos anoméricos libres por lo que carece de poder reductor y la reacción con el licor de Fehling es negativa.

7.9.- Grado alcohólico.

Uno de los más valiosos componentes de una bebida destilada es el grado alcohólico (alcohol etílico), factor determinante de la calidad y valor comercial de la bebida. El alcohol etílico es un líquido incoloro, de olor agradable, se quema con llama azul produciendo agua y dióxido de carbono. El etanol presente en la bebida se separa de todas las sustancias que puedan interferir en la determinación por

medio de una destilación, tras lo cual se procede a determinar el grado alcohólico por medio de un alcoholímetro. Esta determinación se basa en la escala de Gay Lussac que es sumergido en el destilado dentro de una probeta a una temperatura de 15 ° C (R. T. Morrison y R. N. Boyd).

La graduación alcohólica se suele indicar en el etiquetado de la botella en tantos por ciento volumétricos: Vol. 27%; Vol.42 %, etc.

A cada unidad de porcentaje de alcohol en el volumen total le corresponde un grado en la escala alcohólica. Así, se habla de un vino con una graduación de 13,5° cuando tiene un 13,5% de alcohol, o sea 13,5 ml de etanol en cada 100 ml de vino. En las etiquetas de las bebidas alcohólicas, el grado alcohólico volumétrico se indica mediante el uso de la palabra alcohol o la abreviatura “alc”, seguida del símbolo “% vol”.

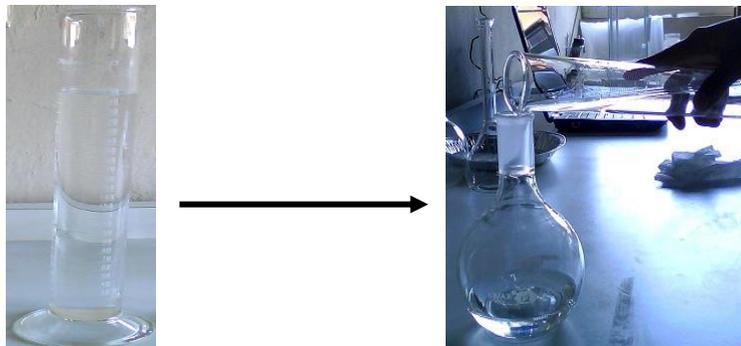
8. Procedimiento y descripción detallada de actividades

En el presente trabajo se utilizó la muestra que proporcionaron los productores de Comitán y por cada método se corrieron las muestras hasta que se obtuvieron datos cuyo valor repetía (estandarización del método). Después se programaron tres corridas en días diferentes y cada corrida de 10 muestras (Criterio de repetibilidad) se realizó el cálculo de desviación estándar como criterio de evaluación de repetibilidad y Análisis de varianza (ANOVA) como criterio de evaluación de reproducibilidad.

- 8.1.- *Método por ciento alcohol.* Se llevó a cabo como indica la Norma Oficial NMX-V-013-S-1980. La muestra debe de estar a la temperatura de 15 °C.

Desarrollo del método

1. En una probeta medir 250 mL de la muestra y mantener a 15 °C.



2. Transferirlos cuantitativamente con 44 mL de agua al matraz de bola fondo plano de 500 mL que contiene perlas de vidrio.
3. Conectarlo al refrigerante mediante el adaptador.
4. Abrir la llave para permitir el paso del agua.
5. Se enciende el mechero y calentar el matraz de destilación.



6. El destilado se recibe en un matraz volumétrico para medir la muestra y en el que previamente se agrega un poco de agua destilada para evitar pérdidas del destilado por falta de condensación. (sumergirlo en un baño de hielo durante el curso de la destilación).



7. Suspender la destilación cuando el destilado en el matraz volumétrico se haya acercado al aforo (0,5 cm debajo de la marca de aforo).



8. Retirar el matraz de recepción.
9. Llevar el destilado a la temperatura que se midió la muestra procurando no perder líquido.
10. Llevar a la marca de aforo con agua destilada.
11. Homogeneizar y transferir el destilado a la probeta.
12. Tomar la temperatura del líquido y cuando esta se encuentre a 288 K (15 °C), introducir el alcoholímetro y efectuar la determinación.

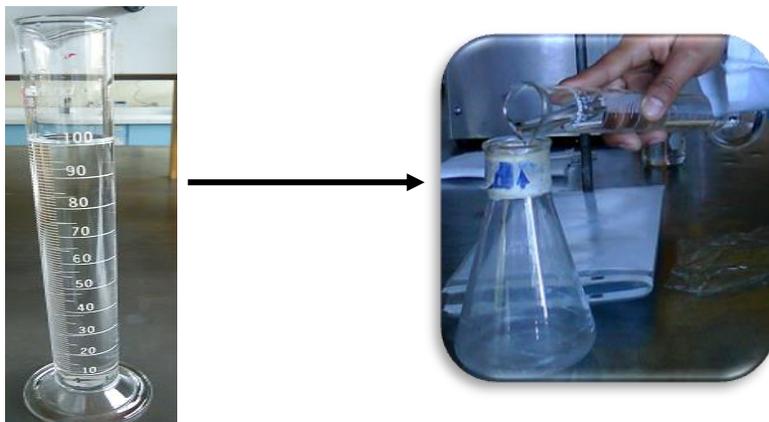


- 8.2. *Método de ésteres.* Para la prueba de repetibilidad se realizaron 7 corridas y cada corrida fue por triplicado debido al tiempo de reflujo (por titulación).

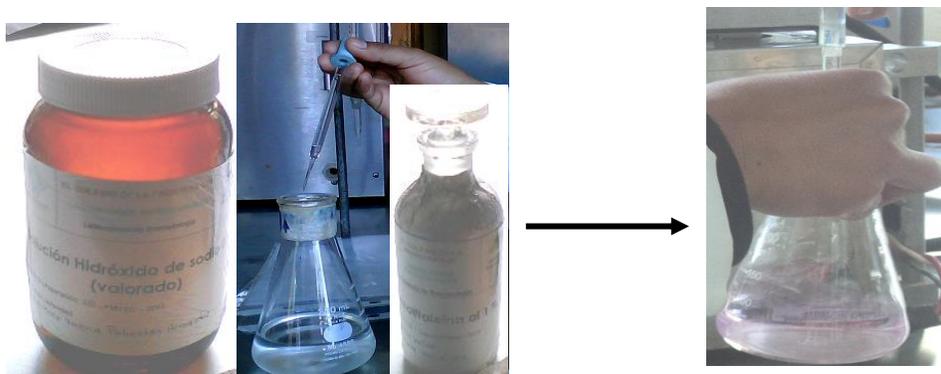
Preparación de la muestra. Como se indica en el punto 8.1

a).- Determinación de ésteres

- 1) Transferir 100 mL del destilado a un matraz Erlenmeyer de 250 mL.



- 2) Neutralizar el ácido libre con hidróxido de sodio 0,1 N, utilizando fenolftaleína como indicador.

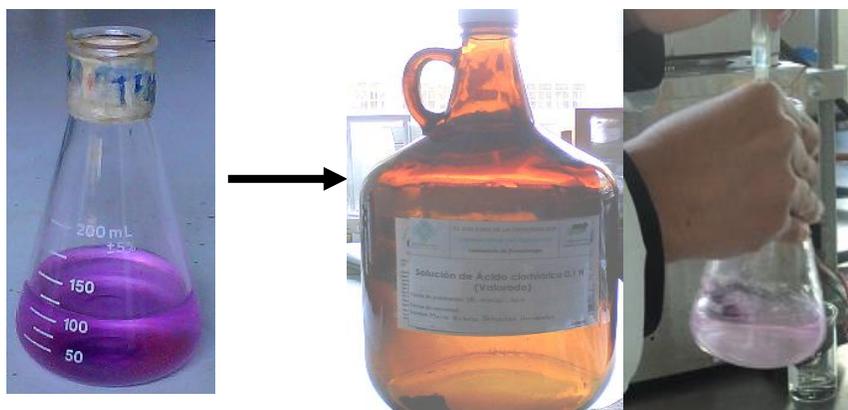


3) Agregar un exceso de disolución de hidróxido de sodio 0,1 N

4) Conectar el matraz al condensador de reflujo y calentar a ebullición durante dos horas.



5) Dejar enfriar y titular el exceso de álcali con disolución de ácido clorhídrico 0,1 N.



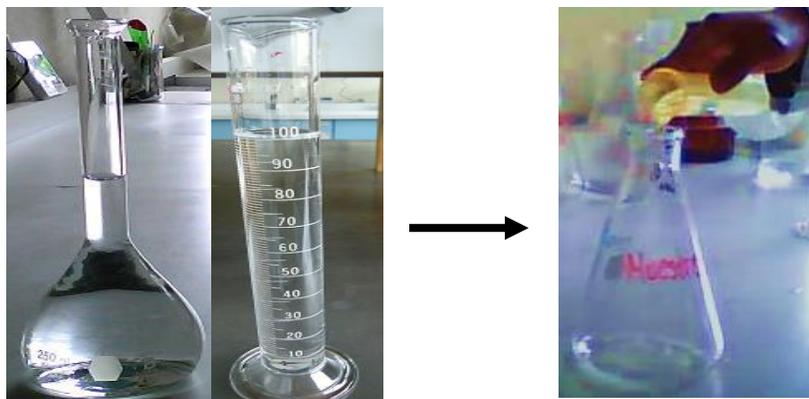
6) Desechar las determinaciones en las que el exceso de álcali gaste ácido clorhídrico en un volumen menor de 2 mL o mayor de 10 mL.

7) Preparar un testigo con la misma cantidad de reactivos utilizados en el problema sustituyendo la muestra por agua y trabajarlo como la muestra.

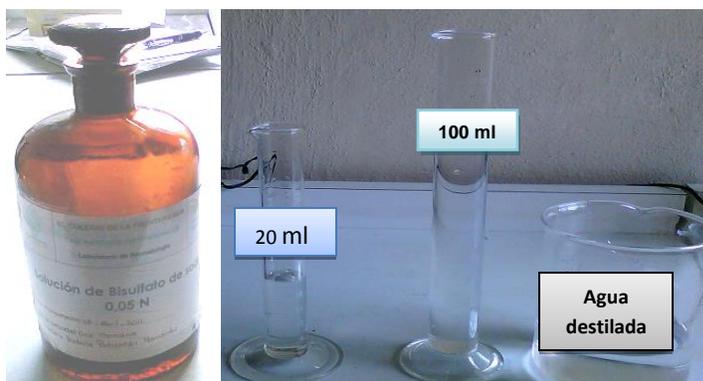
8) Se realizan los cálculos de los datos obtenidos y se elabora el cuadro de resultados.

➔ **b).- Método de aldehídos por titulación.**

- 1) Transferir 100 mL del destilado a un matraz Erlenmeyer de 500 mL, con boca y tapón esmerilados.



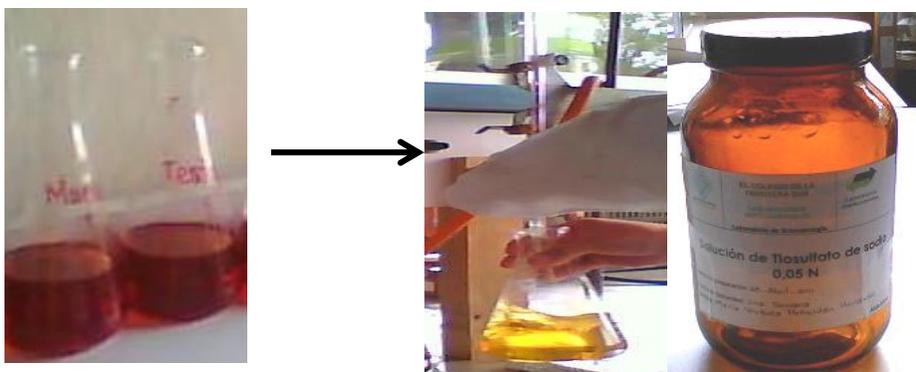
- 2) Agregar 100 mL de agua destilada y 20 mL de disolución de bisulfito de sodio 0,05 N.



- 3) Dejar reposar durante 30 minutos, agitando de vez en cuando.
- 4) Agregar 25 mL de la disolución de yodo 0,05 N



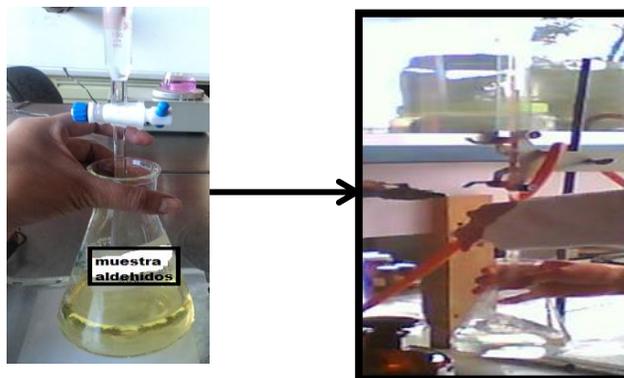
- 5) Agitar y titular el exceso de yodo con disolución de tiosulfato de sodio 0,05 N hasta aparición del color amarillo pálido.



6) Adicionar disolución de almidón como indicador.



7) Continuar la titulación hasta la decoloración total del amarillo pálido.



8) Preparar un testigo, tomando 100 mL de agua destilada.

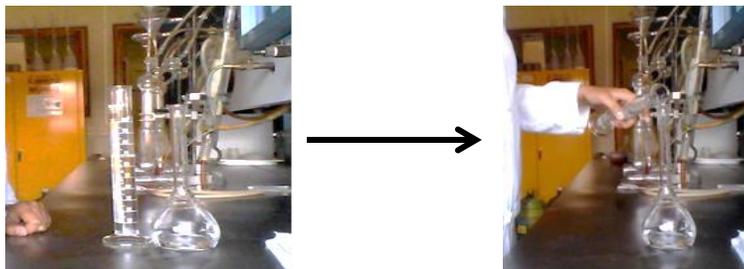
9) Adicionar las mismas cantidades de disolución de bisulfito de sodio y disolución de yodo utilizadas para la muestra y trabajarlo como la muestra.

10) Calcular los aldehídos como acetaldehído.

➔ 8.3.-*Determinación de azúcares reductores por el método de Lane y Eynon.*

Valoración de la solución de fehling

a).- Solución diluida de sacarosa: Medir 63 mL de solución diluida colocar en un matraz volumétrico de 250 mL.



b).- Agregar 3 gotas de fenolftaleína, neutralizar con NaOH 2 N y diluir a la marca con agua destilada (dilución = 0,95 mg de sacarosa / ml).



Titulación de la solución A y B (solución de Felhing)

a) Medir con pipeta volumétrica 5 mL de la solución sulfato de cobre y 5 mL de la solución de tartrato de sodio y potasio en un matraz Erlenmeyer de 500 mL.



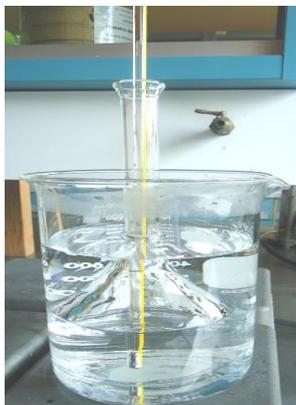
b) Agregar 100 mL de agua destilada y cuerpos de ebullición, calentar en parrilla y una vez que ebulla agregar poco a poco con una bureta la solución patrón de

sacarosa diluida, aproximadamente 10 mL (agitando constantemente el matraz), hasta la casi reducción total del cobre.

c) Agregar 2 mL de la solución de azul de metileno y continuar la titulación hasta la desaparición del color azul y aparición de color rojo tanto en líquido como en burbujas.

Desarrollo del método para la determinación de Azúcares reductores.

- 1.- Colocar 332 mL de muestra en un matraz aforado de 1000 mL.
- 2.- Agregar 252 mL de agua destilada.
- 3.- Agregar 100 mL de HCl girando el matraz poco a poco.
- 4.- Calentar el baño de agua a 70 °C
- 5.- Colocar el matraz con un termómetro dentro. Agitando constantemente hasta que el contenido llegue a 67 ° C, lo cual debe lograrse en 3 minutos.

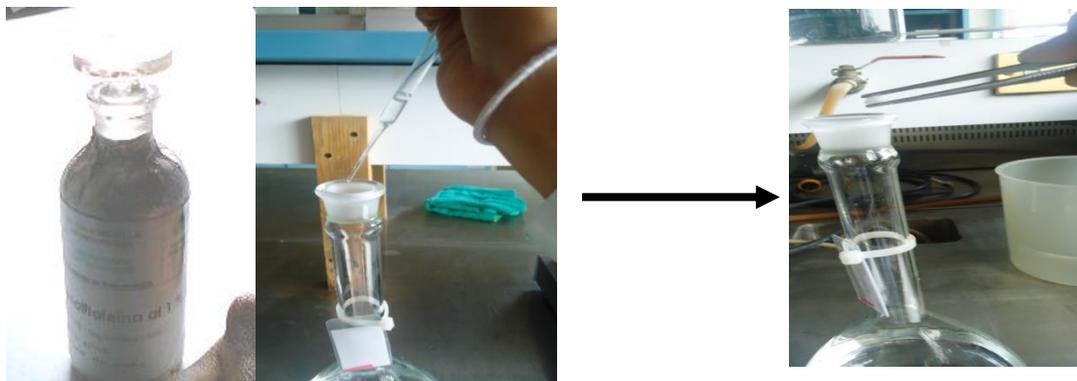


- 6.- Continuar calentando la solución exactamente 5 minutos, desde el momento que el termómetro marque 67 °C, tiempo durante el cual la temperatura del contenido del matraz debe llegar aproximadamente a 69 ° C.
- 7.- Al final de los 5 minutos, colocar el matraz en agua fría.

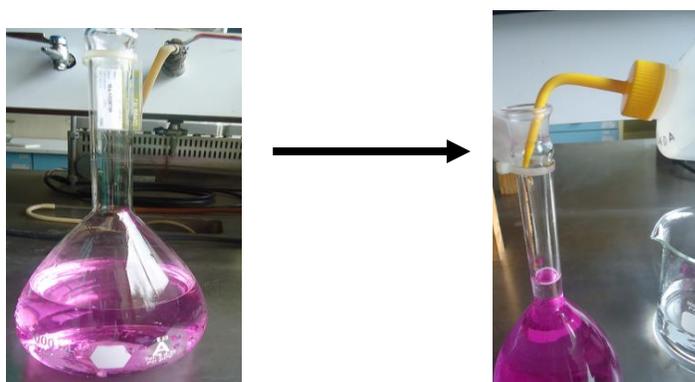


8.- Cuando se alcance más o menos la temperatura ambiente, enfriar en el baño de agua por 30 minutos más y retirar el termómetro.

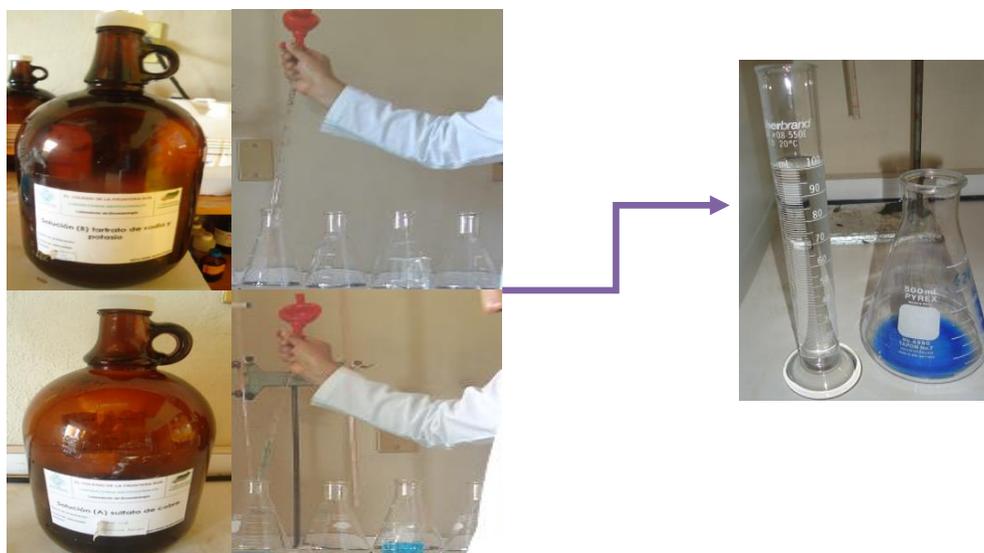
9.- Neutralizar con perlas de NaOH, agregando 5 gotas de indicador de fenolftaleína.



10.- Cuando llegue al vire aforar con agua y homogeneizar.

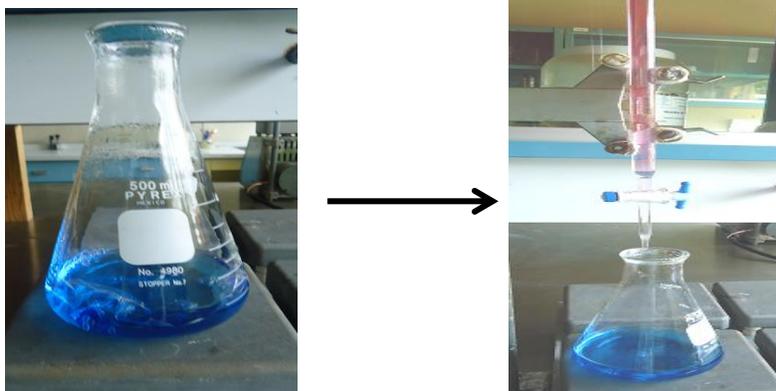


11.- Transferir 5 mL con una pipeta volumétrica de solución de sulfato de cobre y 5 mL de tartrato de sodio y potasio a un matraz Erlenmeyer de 500 mL y 100 mL de agua destilada.

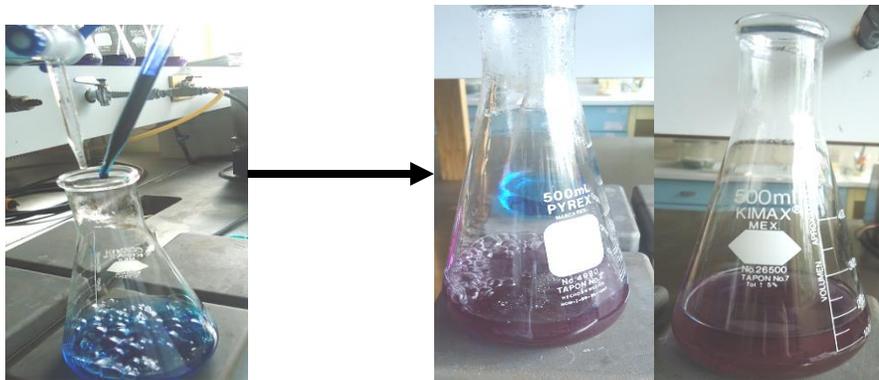


12.- Enjuagar una bureta graduada de 50 mL y llenar con la muestra preparada del n° 10.

13.- Colocar el matraz con la solución de Fehling sobre la parrilla eléctrica, calentar hasta el punto de ebullición y mantener a ebullición moderada por 2-3 minutos, agregar 10 mL de la solución de la muestra, hasta llegar al color azul suave. (Agregar perlas de ebullición para una ebullición uniforme).



14.- Sin quitar el calentamiento, adicionar 1 mL de la solución acuosa de azul de metileno (equivalente de 8-10 gotas) al 0,2 % y continuar con la titulación hasta decolorar el indicador.



- 8.4.- *Método de extracto seco*. NMX-V-017-NORMEX-1996. El volumen de la muestra se mide directamente. (Ver tabla en anexos).

Desarrollo del método

1.- Ajustar la temperatura de la mufla a 550 °C \pm 25 de acuerdo al instructivo de operación de la mufla.

- 2.- Introducir los crisoles a la mufla con la pinza para crisol.
- 3.- Llevar a peso constante los crisoles.
- 4.- Retirar los crisoles de la mufla con pinza para crisol y pasarlos al desecador.
- 5.- Transportar el desecador con los crisoles al laboratorio y dejar enfriar hasta que alcance la temperatura ambiente (aproximadamente 2 h).
- 6.- Pesar y registrar todos los datos obtenidos. Una vez terminado el peso constante proceder al método de extracto seco.
- 7.- Medir en los crisoles la cantidad de muestra indicada (tabla 13, anexos) y anotar los datos.
- 8.- Evaporar un baño de agua hasta completar sequedad.



- 9.- Transportar los crisoles a la estufa a la temperatura 100 °C durante 4 h.



- 10.- Dejar enfriar la muestra en el desecador hasta temperatura ambiente (1 h aprox), pesar y anotar datos.



11.- Pesar y registrar todos los datos.

- ➔ 8.5.- Para el procedimiento del método de cenizas se realizó una repetición que consta de diez muestras por día. Norma Mexicana NMX-V-017-1996.

Procedimiento.

- 1.- La cápsula que contiene el residuo del extracto seco, se coloca en la mufla a temperatura ambiente y se programa para que llegue (550 °C ± 25 °C).
- 2.- Se mantiene a esta temperatura hasta obtener cenizas blancas durante 5 horas aproximadamente.
- 4.- Sacar la cápsula de la mufla.
- 5.- Dejar enfriar en el desecador hasta temperatura ambiente (dos horas).
- 9.- Determinar la masa y anotar los datos.
- 10.- La diferencia de pesos no debe ser mayor a 1 mg. Si la diferencia es mayor, repetir el proceso hasta lograrlo.

9.- Resultados y discusión

Tabla 1. Porcentaje de alcohol.

| N° de muestras | Resultados 1 % | Resultados 2 % | Resultados 3 % |
|----------------------------|-------------------|-------------------|----------------|
| 1 | 27 | 27 | 27 |
| 2 | 27 | 27 | 27 |
| 3 | 27 | 27 | 27 |
| 4 | 27 | 27 | 27 |
| 5 | 27 | 27 | 27 |
| 6 | 27 | 27 | 27 |
| 7 | 27 | 27 | 27 |
| 8 | 27 | 27 | 27 |
| 9 | 27 | 27 | 27 |
| 10 | 27 | 27 | 27 |
| Promedio | 27 | 27 | 27 |
| Desviación estándar | 0.0016 | 0.0016 | 0.0016 |

Tabla 1: durante el curso de la destilación y la lectura efectuada con el alcoholímetro para calcular el porcentaje de alcohol se obtuvieron los siguientes resultados, el promedio fue de 27% y la desviación estándar de 0.0016 para las tres repeticiones. Se considera que el método es repetible bajo las condiciones de laboratorio establecidas.

Tabla 2. Resultados de la reproducibilidad por ciento alcohol ANOVA

| | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Media cuadrática | F | Sig. |
|--------------|-------------------|--------------------|------------------|---|------|
| Inter-grupos | .000 | 2 | .000 | | |
| Intra-grupos | .000 | 27 | .000 | | -- |
| Total | .000 | 29 | | | |

De acuerdo a los resultados obtenidos en el análisis de varianza (tabla 2) no se encontró valor de significancia debido a que los resultados fueron iguales por lo que se considera que no hay diferencia estadística significativa por lo que se concluye que la reproducibilidad se encuentra dentro del 95% de confianza.

Tabla 3. Resultados de ésteres

| N° de muestras | Resultados 1 mg/mL |
|----------------------------|---------------------------|
| 1 | 35.8518 |
| 2 | 32.2666 |
| 3 | 32.2666 |
| 1 | 32.2666 |
| 2 | 32.2666 |
| 3 | 32.2666 |
| 1 | 34.0592 |
| 2 | 32.2666 |
| 3 | 32.2666 |
| 1 | 34.0592 |
| 2 | 32.2666 |
| 3 | 32.2666 |
| 1 | 32.2666 |
| 2 | 34.0592 |
| 3 | 35.8518 |
| 1 | 35.8518 |
| 2 | 34.0592 |
| 3 | 32.2666 |
| 1 | 30.474 |
| 2 | 35.8518 |
| 3 | 32.2666 |
| Promedio | 33.2056 |
| Desviación estándar | 1.5647 |

Los datos (tabla 4) durante la titulación de cada triplicado nos indican que no se encontró valor de significancia obteniendo 0.817 siendo mayor a 0.05 por lo que no hay diferencia estadística, esto quiere decir que hay reproducibilidad dentro del 95 % de confianza.

Tabla 4.- Resultados de reproducibilidad de ésteres. (ANOVA)

| | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Media cuadrática | F | Sig. |
|-------------------------|-------------------|--------------------|------------------|-----------------------------|------|
| Inter-grupos | 8.263 | 6 | 1.377 | .474 | .817 |
| Intra-grupos | 40.703 | 14 | 2.907 | | |
| Total | 48.966 | 20 | | | |
| | | | | Subconjunto para alfa = .05 | |
| | | | N | 1 | |
| Student-Newman-Keuls(a) | 2.00 | 3 | 32.2666 | | |
| | 3.00 | 3 | 32.8641 | | |
| | 4.00 | 3 | 32.8641 | | |
| | 7.00 | 3 | 32.8641 | | |
| | 1.00 | 3 | 33.4617 | | |
| | 5.00 | 3 | 34.0592 | | |
| | 6.00 | 3 | 34.0592 | | |
| | Sig. | | | .847 | |
| HSD de Tukey(a) | 2.00 | 3 | 32.2666 | | |
| | 3.00 | 3 | 32.8641 | | |
| | 4.00 | 3 | 32.8641 | | |
| | 7.00 | 3 | 32.8641 | | |
| | 1.00 | 3 | 33.4617 | | |
| | 5.00 | 3 | 34.0592 | | |
| | 6.00 | 3 | 34.0592 | | |
| | Sig. | | | .847 | |

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.
a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3.000.

Durante la titulación (tabla 5) para determinar la cantidad de aldehídos presente en la muestra del tequila comiteco se obtuvieron promedios diferentes por cada paso, para el primero el promedio es de 11.2852 y la desviación estándar de 0.4724, el segundo 11.3667 desviación estándar de 0.5242 y el tercero 11.4889 con desviación estándar de 0.4208.

Tabla 5. Resultados aldehídos

| N° de muestras | R1 mg/mL | R2 mg/mL | R3 mg/mL |
|----------------------------|----------|----------|----------|
| 1 | 11.4074 | 11.0000 | 11.8148 |
| 2 | 10.1852 | 11.4074 | 11.4074 |
| 3 | 11.0000 | 11.8148 | 11.8148 |
| 4 | 11.0000 | 11.0000 | 11.8148 |
| 5 | 11.4074 | 11.8148 | 11.4074 |
| 6 | 11.4074 | 11.8148 | 11.8148 |
| 7 | 11.8148 | 10.5926 | 11.4074 |
| 8 | 11.4074 | 11.8148 | 10.5926 |
| 9 | 11.8148 | 11.8148 | 11.8148 |
| 10 | 11.4074 | 10.5926 | 11.0000 |
| Promedio | 11.2852 | 11.3667 | 11.4889 |
| Desviación estándar | 0.4724 | 0.5242 | 0.4208 |

De acuerdo a los resultados obtenidos en el análisis de varianza (tabla 6) no se encontró valor de significancia debido a que los resultados presentaron variaciones mínimas por lo que se considera que no hay diferencia estadística significativa por lo que se concluye que la reproducibilidad se encuentra dentro del 95% de confianza.

Tabla 6.- Resultados de reproducibilidad de aldehídos. (ANOVA)

| | Suma de cuadrados | Gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|--------------|-------------------|----|------------------|------|------|
| Inter-grupos | .210 | 2 | .105 | .467 | .632 |
| Intra-grupos | 6.075 | 27 | .225 | | |
| Total | 6.285 | 29 | | | |

| | | | Subconjunto para alfa = .05 |
|-------------------------|------|----|--------------------------------|
| VAR00002 | | N | 1 |
| Student-Newman-Keuls(a) | 1.00 | 10 | 11.2852 |
| | 2.00 | 10 | 11.3667 |
| | 3.00 | 10 | 11.4889 |
| | Sig. | | .608 |
| HSD de Tukey(a) | 1.00 | 10 | 11.2852 |
| | 2.00 | 10 | 11.3667 |
| | 3.00 | 10 | 11.4889 |
| | Sig. | | .608 |

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

(a) Usa el tamaño muestral de la media armónica = 10.000.

En el transcurso de la ebullición y punto final de la titulación (tabla 7) para el porcentaje de azúcares reductores presentes en la muestra del tequila comiteco se obtuvo una diferencia menor en el resultado 1 con respecto a los resultados 2 y 3 con diferencias de 0.0030 y 0.0033, la diferencia pudo haber sido por ser un método analítico, en el que influyeron factores como el tiempo de ebullición y el vire final de la titulación.

Tabla 7.- Resultados azúcares reductores

| N° de muestras | R1 % | R2 % | R3 % |
|----------------------------|--------|--------|--------|
| 1 | 1.544 | 1.5413 | 1.5387 |
| 2 | 1.5440 | 1.513 | 1.5130 |
| 3 | 1.5413 | 1.5387 | 1.5440 |
| 4 | 1.5440 | 1.5413 | 1.5413 |
| 5 | 1.5413 | 1.5440 | 1.5440 |
| 6 | 1.5413 | 1.5413 | 1.5413 |
| 7 | 1.5413 | 1.5413 | 1.5413 |
| 8 | 1.5413 | 1.5413 | 1.5413 |
| 9 | 1.5413 | 1.5413 | 1.5413 |
| 10 | 1.5413 | 1.5413 | 1.5413 |
| Promedio | 1.5421 | 1.5385 | 1.5388 |
| Desviación estándar | 0.0013 | 0.0090 | 0.0092 |

Tabla 8. Los datos de la titulación en cada paso realizado no presentan diferencia significativa en cuanto el contenido de azúcares en la muestra. Por lo que cumple con la reproducibilidad.

Tabla 8.- resultados de reproducibilidad de azúcares reductores. (ANOVA)

| | Suma de cuadrados | Gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|--------------|-------------------|----|------------------|------|------|
| Inter-grupos | .000 | 2 | .000 | .732 | .490 |
| Intra-grupos | .002 | 27 | .000 | | |
| Total | .002 | 29 | | | |

| | | | N | Subconjunto para alfa = .05 |
|-------------------------|------|----|--------|-----------------------------|
| | | | | 1 |
| Student-Newman-Keuls(a) | 2.00 | 10 | 1.5385 | |
| | 3.00 | 10 | 1.5388 | |
| | 1.00 | 10 | 1.5421 | |
| | Sig. | | .531 | |
| HSD de Tukey(a) | 2.00 | 10 | 1.5385 | |
| | 3.00 | 10 | 1.5388 | |
| | 1.00 | 10 | 1.5421 | |
| | Sig. | | .531 | |

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

Tabla 9. Resultados extracto seco.

| N° de muestras | R1 g/L | R2 g/L | R3 g/L |
|----------------------------|--------|--------|--------|
| 1 | 3.35 | 3.38 | 3.31 |
| 2 | 3.32 | 3.31 | 3.33 |
| 3 | 3.35 | 3.31 | 3.31 |
| 4 | 3.31 | 3.35 | 3.34 |
| 5 | 3.31 | 3.35 | 3.31 |
| 6 | 3.34 | 3.35 | 3.31 |
| 7 | 3.35 | 3.35 | 3.24 |
| 8 | 3.36 | 3.33 | 3.31 |
| 9 | 3.37 | 3.34 | 3.32 |
| 10 | 0 | 3.40 | 3.33 |
| Promedio | 3.34 | 3.347 | 3.311 |
| Desviación estándar | 0.0218 | 0.0279 | 0.0273 |

Tabla 9. Durante el proceso de la evaporación para determinar el extracto seco presente en la muestra del tequila comiteco, los resultados en promedio y desviación estándar presentaron variaciones mayores en los resultados 2 y 3 en comparación con el resultado 1 de 0.007 y 0.071.

Tabla 10.- Resultados de reproducibilidad de extracto seco. (ANOVA)

| | Suma de cuadrados | Gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|--------------|-------------------|----|------------------|-------|------|
| Inter-grupos | .007 | 2 | .004 | 5.372 | .011 |
| Intra-grupos | .018 | 26 | .001 | | |
| Total | .025 | 28 | | | |

De acuerdo a los resultados obtenidos en el análisis de varianza (tabla 10) se encontró valor de significancia de 0.011 por lo que se considera que hay diferencia estadística significativa por lo que se concluye que la reproducibilidad entre los tres grupos no se encuentra dentro del 95% de confianza.

| | | N | Subconjunto para alfa = .05 | |
|---------------------------|------|----|-----------------------------|--------|
| VAR00002 | | | 2 | 1 |
| Student-Newman-Keuls(a,b) | 3.00 | 10 | 3.3110 | |
| | 1.00 | 9 | | 3.3400 |
| | 2.00 | 10 | | 3.3470 |
| | Sig. | | 1.000 | .559 |
| HSD de Tukey(a,b) | 3.00 | 10 | 3.3110 | |
| | 1.00 | 9 | 3.3400 | 3.3400 |
| | 2.00 | 10 | | 3.3470 |
| | Sig. | | .053 | .825 |

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos. En (b) significa que los tamaños de los grupos no son iguales, y los niveles de error no están garantizados para la reproducibilidad.

Tabla 11. Resultados ceniza

| N° de muestras | R1 | g/L |
|----------------------------|----------------|-----|
| 1 | 220 | |
| 2 | 250 | |
| 3 | 240 | |
| 4 | 240 | |
| 5 | 280 | |
| 6 | 280 | |
| 7 | 330 | |
| 8 | 390 | |
| Promedio | 278.75 | |
| Desviación estándar | 56.4263 | |

Tabla 11. Durante el curso de la incineración para determinar cenizas de la muestra del tequila comiteco se obtuvieron datos con diferencias mayores entre cada una de las muestras debido a factores como el calentamiento uniforme de la mufla y el tiempo.

9.2.- Discusión de resultados.

Para la mayoría de los siguientes métodos: por ciento de alcohol, azúcares reductores, ésteres y aldehídos se obtuvieron datos aceptables para la repetibilidad y reproducibilidad (ANOVA) con intervalo de confianza de 95 %.

En los resultados de extracto seco, se obtuvo una significancia de 0,01 (existe diferencia estadística significativa) en el ANOVA, por lo que no hay reproducibilidad y los datos obtenidos para repetibilidad si cumplen.

Para el caso de cenizas no se logró alcanzar estos dos parámetros debido al límite del tiempo. La siguiente tabla muestra los límites máximos permisibles para el tequila blanco, por lo que para los valores del por ciento de alcohol, extracto seco, cenizas y azúcares reductores del tequila comiteco no son aceptables de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana bebidas alcohólicas –tequila- especificaciones.

Tabla 12.- análisis de las especificaciones fisicoquímicas del tequila.

| Parámetros | Tequila blanco | | Tequila joven | | Tequila reposado | | Tequila añejo | | Métodos de ensayo de prueba. |
|--|----------------|------|---------------|-----|------------------|-----|---------------|-----|------------------------------|
| | Min | Máx | Min | Máx | Min | Máx | Min | Max | |
| Contenido Alcohólico a 15 °C (% Alc. Vol.) | 38 | 55 | 38 | 55 | 38 | 55 | 38 | 55 | NMX-V-013-S-1980 |
| Extracto seco (g/l) | 0 | 0,20 | 0 | 5 | 0 | 5 | 0 | 5 | |
| Valores expresados mg/100 ml referido en alcohol anhidro | | | | | | | | | |
| Aldehídos | 0 | 40 | 0 | 40 | 0 | 40 | 0 | 40 | NMX-V-005-S-1980 |
| Esteres | 2 | 270 | 2 | 350 | 2 | 360 | 2 | 360 | NMX-V-005-S-1980 |
| Azúcares reductores | 49 % | | | | | | | | NMX-V-006-1983 |
| Furfural | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | |
| Metanol | 30 | 300 | 30 | 300 | 30 | 300 | 30 | 300 | NMX-V-021-1986 |
| Alcoholes superiores (en alcohol amílico) | 20 | 400 | 20 | 400 | 20 | 400 | 20 | 400 | NMX-V-014-1986 |

10. Conclusión

Se lograron estandarizar y/o implementar los métodos de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana bebidas alcohólicas –tequila-especificaciones.

Se han documentado de acuerdo al sistema de gestión de la calidad de los laboratorios institucionales de ECOSUR.

No se logró realizar la validación de cada método para el tequila comiteco debido al tiempo, sin embargo se obtuvieron resultados de repetibilidad y reproducibilidad sobre los métodos realizados como siguiente paso para el diseño experimental de la validación de cada método.

Con relación a los límites máximos permisibles de la Norma NOM-006-SCFI-2004 bebidas alcohólicas –tequila-especificaciones, los valores obtenidos de azúcares reductores, por ciento de alcohol, se encuentran muy por debajo de las Normas Oficiales permitidos, para los resultados del extracto seco y cenizas los valores están por encima de la NOM-006-SCFI-2004 bebidas alcohólicas –tequila-especificaciones.

11. Sugerencias y recomendaciones

11.1.- Recomendaciones.

Cuando se determina el contenido de alcohol de una muestra por medio de la utilización de un alcoholímetro de Gay Lussac es importante cuidar ciertos detalles para evitar obtener resultados erróneos: así durante la destilación del alcohol se recomienda, poner especial cuidado en todas las conexiones del equipo para evitar pérdida de etanol. En lo que respecta a la utilización del alcoholímetro, el menisco en la probeta debe observarse a una altura en forma perpendicular; el cuidado de la temperatura a la que se efectúe la determinación es de gran importancia a razón de la densidad con respecto a la temperatura.

Uno de los aspectos en los que hay que tener cuidado cuando se determina el contenido de aldehydos dentro de la bebida constituye la observación correcta del punto final de la titulación, a fin de facilitar la visualización de este cambio es

importante la adición de la solución de almidón hasta que se esté muy cerca del punto final pues de otra manera la desaparición del color amarillo resulta muy poco definida. Las soluciones de tiosulfato de sodio y bisulfito deben de usarse solo una semana a partir de su preparación, ya que si se usan fuera de lo establecido de la preparación provocará resultados erróneos.

En el método de ésteres presentes en la bebida, se debe cuidar de que el reflujo de la muestra y de la ebullición se realice de manera uniforme para evitar que estos se volatilicen y con esto se obtengan resultados erróneos.

Así mismo en la determinación de azúcares reductores se debe de tomar en cuenta en la reducción del cobre la utilización de la bureta, esta debe de estar inclinada cercana a las paredes del matraz (para evitar el contacto del vapor con el matraz) y al realizar la lectura de mililitros gastados se vuelve a colocar de forma horizontal. Se recomienda usar guantes de asbesto durante la manipulación del matraz durante el transcurso de la ebullición hasta el punto final de la titulación. Así también para la determinación de cenizas y extracto seco usar pinzas para crisol y guantes de asbesto y la temperatura de mufla y temperatura deben de ajustarse correctamente con un termopar.

12. Anexos

Definición de repetibilidad y reproducibilidad.

Repetibilidad. Es expresada en términos de desviación estándar, (σ) o (S_r), del cual es útil calcular el límite de Repetibilidad “r”, el cual permite al analista decidir si es significativa la diferencia entre el análisis duplicado de una muestra determinado bajo condiciones de Repetibilidad. Estas condiciones pueden ser:

- El mismo procedimiento de medición.
- El mismo observador.
- El mismo instrumento de medición utilizado en las mismas condiciones.
- El mismo lugar.
- La repetición dentro de un periodo corto tiempo.

Reproducibilidad. También se expresa en términos de desviación estándar (σ , o S_r), del cual es útil calcular el límite de Reproducibilidad “R”, y será evaluado por el analista en cuanto los resultados que obtendrá en variación de algún factor en su método notando que sus resultados no varíen siendo éstos reproducibles. Las condiciones que se hacen variar son:

- El método de medición.
- El observador.
- El instrumento de medición.
- El patrón de referencia
- El lugar.
- Las condiciones de uso.
- El tiempo.

➔ **Cálculos y expresión de resultados de ésteres.**

$$E = \frac{E_1 \times 100}{G.A.R} \text{ o sea: } E = \frac{(V_1 \cdot N_1 - V_2 \cdot N_2 \times 88 \times 100)}{M} \times \frac{100}{G..A.R}$$

En donde:

E = Ésteres expresados en miligramos de acetato de etilo por 100 mL, referidos a alcohol anhidro.

E1 = Ésteres expresados en miligramos de acetato de etilo por 100 mL de muestra.

V1 = Vol. de disolución de hidróxido de sodio utilizado para saponificar en cm³.

V2 = Volumen de disolución de ácido clorhídrico utilizado para titular el hidróxido de sodio sobrante de la saponificación, en mL.

N1 = Normalidad de la disolución valorada de hidróxido de sodio.

N2 = Normalidad de la disolución valorada de ácido clorhídrico.

88 = Miliequivalente del acetato de etilo expresado en mg.

M = Parte alícuota (100 mL).

G.A.R. = Grado alcohólico real de la muestra a 288 K (15°C) en la escala Gay-Lussac, obtenido de acuerdo con la NOM-V-015-S.

➔ **Cálculos y expresión de resultados de aldehídos.**

$$A = \frac{A \times 100}{G.A.R} \text{ o sea: } A = \frac{(V_1 - V_2) \cdot N \times 22 \times 100}{M} \times \frac{100}{G..A.R}$$

En donde:

A = Aldehídos expresados en miligramos de acetaldehído por 100 mL de alcohol anhidro.

A1 = Aldehídos expresados en miligramos de acetaldehído por 100 mL de muestra.

V1 = Vol. de disolución de tiosulfato utilizado para la titulación de la muestra en mL.

V2 = Vol. de disolución de tiosulfato utilizado para la titulación del testigo, en mL.

N = Normalidad de la disolución de tiosulfato de sodio.

22 = Miliequivalente de acetaldehído expresado en mg.

M = Parte alícuota (100 mL).

G.A.R. = Grado alcohólico real de la muestra a 288 K (15°C) en la escala Gay Lussac, obtenido de acuerdo con la NOM-V-015-S.

➤ Cálculos y expresión de resultados de azúcares reductores.

Factor de Fehling.

$$\frac{\text{mg azúcar}}{100 \text{ ml}} = \frac{\text{azúcar reductor total requerido}}{\text{ml titulación}}$$

Reductores totales

$$R = \frac{k \times 80 \times 10000}{V \times m} \quad \text{Donde:}$$

R: es el porcentaje de reductores totales en la muestra.

K: son los gramos de reductores necesarios resultantes de la titulación de la solución de Fehling.

V: son los mL de solución de reductores totales gastados en la titulación.

M: son los gramos de muestra empleados.

Parámetros de validación

Repetibilidad. La diferencia entre los volúmenes de solución de reductores totales gastados en dos titulaciones, realizadas una inmediatamente después de la otra, por el mismo analista, con la misma muestra y con los mismos aparatos, no debe diferir de 0,1 mL.

Reproducibilidad. La diferencia entre dos datos obtenidos por dos analistas no debe diferir de 0,1 mL. El resultado es el promedio aritmético de las mismas.

➤ Cálculos y expresión de resultados de extracto seco y Cenizas.

$$Es = \frac{[(Me(g) - mv(g))] \times 1000 \text{ ml}}{V(ml)}$$

Donde:

Es: es la cantidad de extracto seco, expresado en g/L;

Me: es la masa de la capsula más extracto seco en g;

Mv: es la masa de la capsula vacía en g;

V: es el volumen de la muestra empleada en mL.

$$C = \frac{[(Mc - Mv)] \times 10^6}{V(ml)}$$

Donde:

C: es la cantidad de cenizas en mg/L

Mc: es la masa de la capsula más cenizas en g.

Mv: es el masa de la capsula vacía en g.

V: es el volumen de la muestra empleada en mL.

➔ Cálculos y expresión de resultados del por ciento alcohol.

Parámetros de validación

Repetibilidad: No debe exceder del 0,2 %, en caso contrario repetir las determinaciones.

Reproducibilidad: No debe excederse del 0,3 % de alcohol en volumen.

Tabla 13.- Cantidad de muestra empleada para la determinación de extracto seco.

| Tipo de bebida | Volumen de muestra (mL) |
|--|-------------------------|
| Bebidas destiladas secas (sin A.R) | 25-50 |
| Bebidas destiladas semisecas (hasta 10 g/l de reductores) | 10-25 |
| Bebidas hasta con 10 g/l de reductores | 10 |
| Licores con más de 25 g/l de reductores | 2 |
| Jarabes con más de 100 g/l de reductores. | 1 |

13. Bibliografía

- Allinger N. L. et. al. Química Orgánica, Ed Reverte, España, 1975.
- Association of Official Analytical Chemists (A.O.A.C.) Official Methods of Analysis. 12a. Edition 1975. William Horwitz Editor. Washington. D. C.
- Emmons B. The book the tequila, Ed Open Court, Chicago 1997.
- Primo E. Química orgánica básica y aplicada. De la molécula a la industria. Ed. Reverte, España 1995.
- Klages F. Tratado de química orgánica 1968, 2da edición, Ed Reverte, España, p.498-501.
- Weissermel K. y H. J. Arpe. Química orgánica industrial. Ed Reverte, España 1981.
- Lehtonen, M. y H. Suomalainen,(1977). "Rum", Alcoholic Beverages, A.H. Rose, Academic Press, Londres, p. 595-633.
- NMX-V-005-SCFI-1980, bebidas alcohólicas destiladas. Determinación de Esteres y Aldehídos.
- NMX-V-006-SCFI-1983, determinación de bebidas alcohólicas. Azúcares reductores totales.
- NMX-V-013-S-1980-NORMEX, determinación de contenido alcohólico por ciento en alcohol en volumen en la escala Gay Lussac a 288 K (15 °C)
- NMX-V-017-1996-NORMEX. Determinación de extracto seco y cenizas.
- NOM-006-SCFI-1994, bebidas alcohólicas-tequila- especificaciones.
- Peterson, W.R. Formulación y Nomenclatura Química Orgánica (6ta edición). Barcelona-España: Eunibar-editorial universitaria de Barcelona. pp. 98-101.
- R. T. Morrison y R. N. Boyd., 1976. Química orgánica, 3a edición, Fondo Educativo Interamericano, S.A. México,