

**“Evaluación electroquímica de Tequila 100% agave en sus diferentes clases: Hacia el desarrollo de sensores electroquímicos útiles para la evaluación de la calidad de la bebida”**

TESIS PRESENTADA POR:

**Q.F.B. WALTER MANUEL WARREN VEGA**

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRÍA EN ELECTROQUÍMICA**

**Marzo, 2023**

# **Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica**

REALIZADO POR:

**Q.F.B. WALTER MANUEL WARREN VEGA**

DIRIGIDA POR

**Dra. LINDA VICTORIA GONZALEZ GUTIERREZ**

CO-DIRIGIDA POR

**Dr. LUIS ALBERTO ROMERO CANO**

**SINODALES**

**Dr. Luis Antonio Ortiz Frade**  
Presidente

---

Firma

**Dr. Goldie Harikrishna Oza**  
Secretario

---

Firma

**Dr. Armando Campos Rodríguez**  
Vocal

---

Firma

**Dr. José Luis Herrera Celis**  
Suplente

---

Firma

## RESUMEN

---

El Tequila es una bebida alcohólica derivada de las cabezas de agave de la especie *tequilana* Weber variedad azul la cual solo puede ser cultivada en los territorios correspondientes a los que la legislación vigente señale la Norma Oficial Mexicana NOM-006-SCFI-2012. Dentro de esto, el tequila se clasifica de acuerdo con su tiempo de maduración siendo blanco, joven u oro, reposado, añejo y extra-añejo dentro de los cuales adquiere características relacionadas a este proceso. En el presente trabajo de investigación se realizó la caracterización fisicoquímica y electroquímica de diferentes bebidas de interés para obtener información fundamental que permita diseñar electrodos específicos útiles como sensores electroquímicos para evaluar la calidad de las bebidas alcohólicas. La caracterización fisicoquímica consistió en cromatografía de gases y líquidos, espectrometría de masas de relaciones isotópicas y espectroscopia de absorción atómica. Se observó que los parámetros cromatográficos declarados por las normas oficiales mexicanas vigentes deben complementarse con otra técnica analítica para discriminar entre Tequila y muestras problema. Los resultados anteriores se relacionan satisfactoriamente con los estudios electroquímicos. Los voltamperogramas de pulso diferencial de las muestras de Tequila 100% agave en sus diferentes clases mostraron tres señales características: i)  $-0.05\text{ V vs. Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$  atribuible a la reducción de  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^0$  presente en la muestra; ii)  $0.34\text{ V vs. Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$  relacionado con la fracción polifenólica que tiene actividad antioxidante; por tanto a la oxidación de compuestos orgánicos que contienen el grupo catecol, y iii)  $0.50\text{ V vs. Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$  debido a la oxidación del grupo flavonoide presente en la muestra debido al proceso de maduración; con estos resultados se determinó el índice electroquímico de color para Tequila 100% agave, muestras problemas y bebidas alcohólicas provenientes de otras especies de agave.

## ABSTRACT

---

Tequila is an alcoholic beverage derived from the agave heads of *tequilana* Weber blue variety which can only be cultivated in the corresponding territories to which the current legislation indicates the Official Mexican Standard NOM-006-SCFI-2012. Within this, tequila is classified according to its maturation time such as silver, gold, aged, extra-aged, and ultra-aged, within which it acquires characteristics related to this process. In the present research work a physicochemical and electrochemical characterization of different beverages of interest was carried out to obtain fundamental information that allows the design of specific electrodes useful as electrochemical sensors for evaluating the quality of alcoholic beverages. The physicochemical characterization consisted of gas and liquid chromatography, gas chromatography coupled with isotope ratio mass spectrometry, and atomic absorption spectroscopy studies. It was observed that the chromatographic parameters declared by the current Mexican official standards must be complemented with another analytical technique to discriminate between Tequila and problem samples. The above results relate satisfactorily to electrochemical studies. The differential pulse voltammograms of the Tequila 100% agave samples in their different classes showed three characteristic signals: i)  $-0.05\text{ V vs. Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$  attributable to the reduction of  $\text{Cu}^{2+}$  to  $\text{Cu}^0$  present in the sample; ii)  $0.34\text{ V vs. Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$  related to the polyphenolic fraction that has antioxidant activity; therefore to the oxidation of organic compounds that contain the catechol group, and iii)  $0.50\text{ V vs. Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$  due to the oxidation of the flavonoid group present in the sample due to the maturation process; with this results, electrochemical color index was determined for Tequila and problem samples and alcoholic beverages obtained from other agave species.



**Este trabajo fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica (CIDETEQ), bajo la dirección de la Dra. Linda Victoria González Gutiérrez y la Co-dirección del Dr. Luis Alberto Romero Cano (UAG)**

## Agradecimientos

---

Me gustaría agradecer a mis directores de tesis, la Dra. Linda Victoria González Gutiérrez y al Dr. Luis Alberto Romero Cano por su apoyo y asesoría para la realización del trabajo de investigación.

Agradezco a los compañeros del laboratorio por el apoyo que me brindaron durante mi tiempo en el periodo de maestría.

Me gustaría agradecer por todo el apoyo que me brindaron para la realización de este trabajo de investigación y por sus aportes a la M.P.T. Rocío Fonseca Aguiñaga, M.P.T. Floriberto Miguel Cruz, Dra. Ana Itzel Zarate Guzmán y al IQ. Uriel Navarro Arteaga.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca proporcionada para la realización de mis estudios de maestría en electroquímica en el CIDETEQ.

Agradezco al Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica (CIDETEQ) por la oportunidad de realizar mis estudios de maestría y a todas las personas que me apoyaron y ayudaron en mi desarrollo profesional.

De igual forma a mis sinodales por su apoyo realizado dentro de las retroalimentaciones realizadas en mis seminarios para el aporte de este proyecto.

Y, por último, pero no menos importante, a mi familia, que siempre me ha demostrado su apoyo incondicional en impulsarme en mi desarrollo personal y profesional. Por sus consejos, los cuales me han brindado para seguir adelante y no dar marcha atrás.

# ÍNDICE

---

---

1. Introducción.....	15
1.1. Justificación .....	17
1.2. Hipótesis.....	18
1.3. Objetivo general.....	19
2. Marco teórico.....	21
2.1. Antecedentes.....	21
2.2. Técnicas analíticas empleadas con fines de autenticidad en el Tequila .....	25
2.3. Estudios empleando técnicas cromatográficas .....	26
2.4. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas de relaciones isotópicas 29	
2.5. Estudios espectroscópicos para validar la autenticidad en el Tequila .....	31
2.6. Estudios mediante técnicas electrónicas para el aseguramiento de la calidad y autenticidad en el Tequila.....	35
2.7. Técnicas electroquímicas en el análisis de bebidas alcohólicas.....	37
3. Materiales y métodos .....	41
3.1. Muestras.....	41
3.2. Caracterización fisicoquímica del Tequila .....	42
3.3. Estudios Electroquímicos.....	43
4. Resultados y Discusión .....	46
4.1. Estudio de caracterización en Tequila 100% agave .....	46
4.2. Estudios Electroquímicos (evaluación de condiciones óptimas).....	48
4.3. Estudios electroquímicos en bebidas alcohólicas .....	50
4.4. Casos de estudio: Discriminación de muestras alcohólicas ( <i>grupo-PS</i> y <i>grupo-M</i> ) .....	54
4.5. Casos de estudio: bebidas alcohólicas con color (series S-A, S-EA y S-UA) .....	56
5. Conclusiones.....	61
Bibliografía .....	63
Anexos .....	73
Anexo A1. A critical review on the assessment of the quality and authenticity of .....	74
Tequila by different analytical techniques: Recent advances and perspectives .....	74
Anexo A2. Electrochemical study of Tequila 100% agave in its different classes: Towards the development of electrochemical sensors useful for the evaluation of the quality of the beverage .....	75
Anexo A3. Constancia de participación en congreso de la Sociedad Química de México. "Estudio en la caracterización de Tequila 100% agave y sus clases por técnicas electroquímicas empleando electrodos de óxido de grafeno" .....	77

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

---

Figura 2.1. Ubicación geográfica de las regiones que otorgan la Denominación de Origen del Tequila.....	21
Tabla 2.1. Estudios en la evaluación de la calidad del Tequila en sus diferentes etapas de producción.....	22
Tabla 2.2. Evaluación de la autenticidad del Tequila empleando técnicas de cromatografía de gases y líquidos.....	26
Tabla 2.3. Parámetros analíticos auxiliares para determinar la autenticidad de la fuente de azúcar utilizada para la producción de etanol ( $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ ) y tiempo de maduración de la bebida ( $\delta^{18}\text{O}_{\text{VSMOW}}$ ).....	31
Tabla 2.4. Estudios empleando técnicas espectroscópicas para el análisis de calidad y autenticidad en Tequila.....	32
Tabla 2.5. Estudios enfocados en la calidad y autenticidad del Tequila mediante técnicas electrónicas.....	35
Tabla 4.1. Caracterización fisicoquímica de las bebidas analizadas.....	47
Figura 4.1. Análisis por VPD para evaluar el efecto de pH en Tequila 100% agave en buffer de fosfatos 0.1 M concentración al 50% de muestra: a) pH 4, b) pH 6, c) pH 8 y d) pH 10. Buffer (línea punteada), clases de Tequila 100% agave: blanco (línea negra), reposado (línea roja), añejo (línea azul) y extra añejo (línea verde). Condiciones de trabajo: paso de 5 mV, amplitud de 50 mV, tiempo de modulación de 50 ms y velocidad de barrido de 10 mV/s.....	49
Figura 4.2. Análisis por VPD para evaluar el efecto de concentración en Tequila 100% agave en buffer de fosfatos 0.1 M (electrolito soporte/analito): a) (50/50), b) (75/25) y c) (0/100). Condición de trabajo: velocidad de barrido de 10 mV/s.....	50
Figura 4.3. Voltamperogramas de muestras de Tequila 100% agave y sus clases. X blanco, ▲ añejo, ◆ añejo y ■ extra añejo.....	51
Figura 4.4. Espectros UV-Visible de las muestras: a) grupo-T, b) grupo-PS y c) grupo-M.....	52
Tabla 4.2. Parámetros electroquímicos obtenidos de Tequila 100% agave y muestras problema.....	53
Figura 4.5. Voltamperogramas de muestras clase blanco: a) Tequila 100% agave clase blanco, b) PS-S1, c) PS-S2, d) PS-S3, e) PS-S4 y f) PS-S5.....	54
Tabla 4.3. Parámetros electroquímicos obtenidos para Tequila 100% agave clase blanco y muestras de mezcal clase blanco.....	55
Figura 4.6. Voltamperogramas de pulso diferencial se presentan de las bebidas destiladas agaváceas: a) Tequila 100% agave clase blanco, b) Mezcal clase blanco (M-S1) y c) Mezcal clase blanco (M-S2).....	55

Figura 4.7. Voltamperogramas de muestras clase reposado: a) Tequila 100% agave clase reposado (T-A) y b) PS-A1 .....	56
Figura 4.8. Voltamperogramas obtenidos para muestras de clase añeja: a) Tequila 100% clase añejo, b) PS-E1, c) PS-E2, d) PS-E3 y e) PS-S4.....	57
Figura 4.9 Voltamperogramas de muestras clase extra añeja: a) Tequila 100% agave clase extra añeja, b) PS-U1 y c) PS-U2.....	58
Tabla 4.4. Índice electroquímico obtenidos en Tequila 100% agave y en las muestras problema.....	59
Figura 4.10. Gráfico de efectos principales del índice electroquímico con respecto al tiempo de maduración.....	59

# **Prefacio**

# **Contenido y estructura de**

# **la Tesis**

## **Prefacio**

### **Contenido y estructura de la Tesis**

En la presente tesis se describe el desarrollo de un método electroanalítico para la caracterización de muestras de Tequila 100% agave y sus distintas clases: Blanco, Reposado, Añejo y Extra añejo; con la finalidad de obtener parámetros electroquímicos discriminantes hacia la búsqueda de ser criterios analíticos auxiliares para garantizar la calidad y autenticidad de la bebida hacia muestras no auténticas o de otra especie de agave como Mezcal.

A lo largo de los capítulos que comprenden esta tesis, se abordan las diferentes técnicas analíticas empleadas para la caracterización de la matriz fisicoquímica de la bebida alcohólica conocida como Tequila 100% agave, en la cual se realizan estudios para ser técnicas discriminantes ante productos no auténticos llegando a no ser concluyentes. Se ha optado por el uso de técnicas voltamperométricas para brindar una caracterización electroanalítica de Tequila 100% agave y sus clases en las cuales se describe su estudio mediante voltamperometría cíclica y voltamperometría de pulso diferencial. Junto a esto, se ha realizado una caracterización con otras técnicas instrumentales las cuales han demostrado precisión, sensibilidad y exactitud en los análisis. Se muestra el desarrollo de un método electroanalítico para contrastar las respuestas electroquímicas del Tequila 100% agave con muestras de estudio de productos no auténticos o pertenecientes a otras especies de agave.

En el **Capítulo I (Introducción)** se detalla de manera resumida la normativa mexicana que destaca y resguarda a la bebida alcohólica denominada “Tequila” y su clasificación. Se explica sobre la importancia del aseguramiento de la autenticidad y calidad del Tequila haciendo un breve análisis de las diferentes técnicas que actualmente se han sugerido para ser implementados como criterios de control, sin embargo, quedando inconcluyente por diversos factores. Además, se explica, la importancia que han tenido en los últimos años de las técnicas electroquímicas hacia la verificación de productos terminados en la Industria Alimentaria y su facilidad que demuestran ante otros métodos para ser considerado un método para implementarse dentro de la verificación continua que puedan de manera rápida y sencilla permitir diferenciar de productos apócrifos o manipulados con prácticas ilícitas. Finalmente, se presenta la hipótesis de la

investigación, junto a los objetivos, general y específicos, que se desarrollan a lo largo de la presente Tesis.

En el **Capítulo II** se desarrolla sobre los antecedentes de la presente investigación. Primero, se versa sobre la actual normativa mexicana que resguarda al Tequila, sus clasificaciones y los criterios de control que actualmente son implementados por las unidades de inspecciones para la validación de la autenticidad del Tequila para su comercialización. Se establece el fundamento de las técnicas electroquímicas con las cuales se desarrolló la presente investigación brindando una explicación de porque su implicación como técnicas sensibles para caracterizar esta matriz compleja. Así como la descripción de las técnicas instrumentales que complementan el método electroquímico que permitieron la validación de los hallazgos presentes en la caracterización electroquímica de las muestras de Tequila 100% agave. Posterior, se abordan los trabajos previos que varios grupos de investigación han realizado para comprender diversos fenómenos fisicoquímicos que permitieron caracterizar a la bebida con el objetivo de auxiliar a las autoridades correspondientes para su discriminación ante productos apócrifos. Así también, se aborda la discusión de estudios de otras bebidas alcohólicas en las cuales fueron empleadas diversas técnicas electroquímicas resaltando las variables de estudio que permitieron la validación del método electroquímico. Se discute como demostraron ser discriminantes ante productos de procedencia desconocida las cuales fueron confiscadas pero que presentan un perfil similar.

En el **Capítulo III y IV** se describen las condiciones de operación de las técnicas analíticas utilizadas para la caracterización fisicoquímica del Tequila 100% agave y sus clases, además de aquellas de carácter no autentico y otras especies de agave. Se muestra la metodología empleada para caracterizar las muestras mediante los criterios de control que dicta la Norma Oficial Mexicana en la cuantificación de los congéneres (metanol, alcoholes superiores, aldehídos, ésteres y furfural) junto con los parámetros analíticos auxiliares de  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{18}\text{O}$  mediante espectrometría de masas de relaciones isotópicas. Por otra parte, se describe las condiciones operacionales en las cuales se realizaron los estudios electroquímicos mediante la técnica de voltamperometría cíclica. A partir de la información obtenida de la voltamperometría cíclica, se permite realizar el desarrollo de un método electroanalítico por voltamperometría de pulso diferencial

evaluando variables de estudio (pH y concentración) que permitan la obtención de una respuesta electroquímica reproducible. A partir de las metodologías establecidas y con la información recabada se ha preparado el Capítulo IV en el cual se realiza un análisis de las técnicas cromatográficas y relaciones isotópicas para caracterizar el Tequila 100% agave. Por el contrario, se establecen las condiciones óptimas para la evaluación del Tequila 100% agave, se definen los parámetros electroquímicos (potencial, corriente y amplitud), a partir de esto se evalúan diferentes casos de estudio de las muestras no auténticas clasificándose en base a sus propiedades fisicoquímicas con la respectiva clase que asemejan permitiendo concluir lo discriminante que resulta la técnica respaldada bajo las otras técnicas instrumentales.

Por último, en el **Capítulo V** se presentan las conclusiones y perspectivas, respectivamente. Se destaca a partir de los resultados obtenidos los hallazgos obtenidos dentro de la presente investigación, estableciendo así la implementación del método electroanalítico para el análisis de las distintas clases de Tequila 100% agave y el fenómeno asociado que conllevan las respuestas electroquímicas con el proceso de maduración que tiene el Tequila en barrica, estableciendo así parámetros electroquímicos que permiten establecer un índice electroquímico para la diferenciación entre productos alcohólicos que asemejan propiedades similares al Tequila

Los resultados de esta Tesis han sido preparados para ser publicados como artículo científico en una revista científica especializada de alto impacto y difusión internacional.

# Capítulo I: Introducción

## 1. Introducción

En los últimos años, la Industria Tequilera ha demostrado tener un constante crecimiento en la producción de esta bebida siendo así que en el año 2021 se registró un aumento de 10% y 60% en Tequila y Tequila 100% agave respectivamente teniendo como resultado una producción total de 527.1 millones de litros estableciendo un posicionamiento e impacto económico de esta industria en los diferentes mercados nacionales e internacionales. Con la finalidad de mantener criterios de control y calidad que permitan realizar el proceso de inspección dentro del proceso de producción del Tequila, la actual normativa mexicana (NOM-006-SCFI-2012) junto con los organismos de conformidad encargados de realizar la validación de la autenticidad del producto mantienen parámetros para regular el contenido de compuestos congenéricos presentes en la bebida como son los alcoholes superiores, metanol, aldehídos, ésteres y furfural realizados por la técnica de cromatografía de gases y líquidos [1]. Además de esto, se realiza un proceso de inspección durante la producción de la bebida en el cual el Consejo Regulador del Tequila (CRT) es encargado de llevarlo a cabo a través de sus unidades de inspección, sin embargo, los controles de calidad ante autoridades nacionales e internacionales han demostrado la búsqueda de técnicas complementarias que puedan implementarse para la validación de la bebida en términos de calidad y autenticidad además de resultar ser discriminante con productos que han sido manipulados bajo prácticas ilícitas como la adulteración y falsificación de producto llegando así a impactar en diversos aspectos a esta industria como son lo económico, social y político.

Con esta finalidad de mantener criterios de aseguramiento de la autenticidad del Tequila, diversos grupos de investigación se han enfocado en utilizar técnicas cromatográficas [2, 3], espectroscópicas [4–6] y electrónicas [7–9] para la validación de la calidad en la bebida, sin embargo, actualmente han demostrado ser insuficientes en la discriminación entre clases, productos no-auténticos y bebidas destiladas provenientes a otras especies de agave. Por ello, actualmente los controles de calidad han buscado diversas estrategias alternas en las cuales se permita robustecer los parámetros analíticos abordando de manera sencilla, rápida y efectiva el análisis discriminante por medio de la matriz fisicoquímica y los componentes que la conforman como es el proceso de maduración de la bebida debido al enriquecimiento de compuestos orgánicos volátiles y fenólicos [10, 11].

Esto se ha podido lograr debido al uso de técnicas electroquímicas en las cuales permite realizar la validación de un perfil electroquímico de la bebida [12], determinación de la composición fisicoquímica [13] e identificación de adulteraciones [14–16] en diversas bebidas alcohólicas como es el vino, brandi y cerveza. Con esto, el uso de la electroquímica en el análisis de bebidas alcohólicas se ha vuelto de gran importancia debido a que se ha permitido evaluar en el brandi la capacidad antioxidante [14] atribuida al perfil fisicoquímico de la bebida o la caracterización electroquímica del vino con la finalidad de obtener un índice electroquímico que permita caracterizar entre bebidas alcohólicas relacionándose al color que esta bebida presenta [17, 18]. Siendo así, una estrategia novedosa en la cual permita realizar un análisis en cuestión de minutos permitiendo realizar los análisis de manera *in situ* junto a que no se deben realizar pretratamientos de la muestra.

La presente Tesis tiene el objetivo de establecer un método electroanalítico en el cual se permita realizar el análisis de Tequila 100% agave y sus diferentes clases con el fin de determinar así parámetros electroquímicos capaces de discriminar entre muestras problema confiscadas por el CRT y mezcal previamente analizados por los métodos oficiales (cromatografía de gases y líquidos), al igual que por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas de relaciones isotópicas. En base a esto, se podrá evaluar la factibilidad del método electroanalítico desarrollado en el presente trabajo de posgrado ante otras técnicas instrumentales.

## **1.1. Justificación**

En la Industria Tequilera, la producción de Tequila 100% agave mantiene un proceso controlado bajo ciertos estándares de calidad con el objetivo de mantener un perfil fisicoquímico que se confiere a lo largo de las etapas del proceso. Actualmente las especificaciones que son empleadas para la evaluación del producto terminado mediante los métodos oficiales se han vuelto insuficientes para el aseguramiento de Tequila y discriminación de productos apócrifos u adulteraciones. Por ello, se ha buscado el uso de métodos auxiliares que permitan garantizar la calidad del Tequila y robustezcan al actual proceso de inspección evitando así repercusiones que involucren un riesgo de salud a los consumidores y afecten la imagen de la bebida en los mercados nacionales e internacionales.

Por tal motivo, se propone realizar la caracterización del Tequila 100% agave (en sus diferentes clases) mediante técnicas electroquímicas con la finalidad de brindar parámetros analíticos que permitan ser considerados como criterios de calidad hacia la discriminación de muestras problema y bebidas provenientes de otras especies de agave. Para tal fin es necesario desarrollar una metodología que permita evaluar el perfil electroquímico de la bebida y sus diferentes clases para establecer así parámetros electroquímicos obtenidas a partir de voltamperometría empleando electrodos de carbón vítreo.

## **1.2. Hipótesis**

Empleando técnicas electroanalíticas será posible realizar una caracterización electroquímica de Tequila 100% agave (en sus diferentes clases). A partir de los resultados obtenidos se permitirá definir parámetros electroquímicos que robustezcan los controles de calidad actuales encargados en evaluar el producto terminado

### **1.3. Objetivo general**

Caracterizar mediante técnicas electroquímicas Tequila 100% agave en sus diferentes clases proponiendo así el desarrollo de un método para la discriminación ante productos alcohólicos y bebidas

#### **Objetivos particulares**

- Caracterizar mediante técnicas cromatográficas las especificaciones fisicoquímicas de las muestras de Tequila 100% agave, muestras problema y mezcal, de acuerdo con lo establecido en la NOM-006-SCFI-2012
- Determinar mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas de relaciones isotópicas Carbono 13 y Oxígeno 18 que permitan la validación de muestras de Tequila 100% agave, muestras problema y mezcales.
- Estudiar mediante técnicas electroquímicas la matriz de Tequila 100% agave y sus diferentes clases para evaluar las respuestas electroquímicas asociadas a la matriz definiendo así parámetros de análisis
- Evaluar el método electroanalítico para Tequila 100% agave realizando una comparación ante muestras problema y bebidas agaváceas.
- Analizar los resultados obtenidos por voltamperometría de pulso diferencial ante las otras técnicas instrumentales evaluando la factibilidad del método electroquímico

# Capítulo II: Marco Teórico

## 2. Marco teórico

### 2.1. Antecedentes

De acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-006-SCFI-2012 [1], el Tequila es una bebida alcohólica regional obtenida por destilación de mostos, preparadas directa y originalmente del material extraído, en las instalaciones de una fábrica de un productor autorizado. El tequila se elabora a partir de *Agave tequilana* Weber variedad azul, cultivada dentro de regiones protegidas específicas de México que constituyen al territorio geográfico de la Denominación de Origen Tequila (DOT), mostrada en la Figura 2.1. De acuerdo con las normas mexicanas, el tequila tiene una clasificación basada en su categoría (tequila 100% agave y tequila) y sus clases (blanco, oro, reposado, añejo y extra añejo). Según datos reportados por el Consejo Regulador del Tequila (CRT) en 2021, la industria tequilera produjo 352 millones de litros y exportó a 120 países, lo que demuestra el éxito de la bebida entre los consumidores nacionales e internacionales. Actualmente, la participación de la bebida en los mercados globales se concentra en el continente americano, seguido de Europa, Asia, Oceanía y África, siendo los países más consumidores son Estados Unidos de América, Alemania, España, Francia, Reino Unido, Japón, Canadá, Letonia y Sudáfrica.



**Figura 2.1.** Ubicación geográfica de las regiones que otorgan la Denominación de Origen del Tequila (DOT)

La industria tequilera tiene una estructura consolidada en su proceso de producción, estando definida por varias etapas principales como la cocción (hidrólisis), fermentación, destilación, dilución, filtración, maduración y embotellado. En la Tabla 2.1. se resume la descripción del proceso de producción en el que varios grupos de investigación han estudiado para la identificación de los pasos críticos durante la producción del Tequila.

**Tabla 2.1** Estudios en la evaluación de la calidad del Tequila en sus diferentes etapas de producción

<b>Etapas de producción</b>	<b>Descripción de la etapa de producción</b>	<b>Estudios en la evaluación de la calidad del Tequila</b>	<b>Referencias</b>
Cosecha	La cosecha de la planta de <i>Agave tequilana</i> Weber variedad azul debe ser dentro del territorio de la DOT.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Evaluación del agave en la producción de Tequila.</li> <li>• Evaluación del rendimiento de etanol en el estudio de la planta.</li> </ul>	[19–21]  [22]
Hidrólisis y extracción	Se introducen la materia prima cruda en un horno de mamposteo u autoclave. Los exudados son recolectados y el agave hidrolizado es exprimido en molino de rodillos.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Determinación de fructanos durante el proceso.</li> <li>• Determinación de compuestos de Maillard en jugo y agave hidrolizado.</li> <li>• Estudios de parámetros operacionales para la mejora en la eficiencia de extracción.</li> </ul>	[23]  [24, 25]  [26]

**Tabla 2.1.** (Continuación) Estudios en la evaluación de la calidad del Tequila en sus diferentes etapas de producción

Etapa de Producción	Descripción de la etapa de producción	Estudios en la evaluación en la calidad del Tequila	Referencias
Fermentación	A partir de la hidrólisis, se obtienen los exudados y jugos. En esta etapa, existen diversas variaciones en sus condiciones: relación de agave/exudado, cepa, °Brix, pH, tipo de tanque y tiempo de fermentación.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Estudio en el uso de enzimas para la mejora en la eficiencia del proceso.</li> </ul>	[27]
		<ul style="list-style-type: none"> <li>Identificación y uso de cepas durante el proceso</li> </ul>	[28–31]
		<ul style="list-style-type: none"> <li>Estudio de parámetros operacionales para la generación de compuestos VOC's</li> </ul>	[31–33]
		<ul style="list-style-type: none"> <li>Efecto de la eficiencia en fermentación</li> </ul>	[34–36]
		<ul style="list-style-type: none"> <li>Estudio del proceso de producción a diferentes escalas</li> </ul>	[28, 37, 38]
		<ul style="list-style-type: none"> <li>Adición de nutrientes para la mejora en el rendimiento de la etapa</li> </ul>	[39, 40]

**Tabla 2.1. (Continuación)** Estudios en la evaluación de la calidad del Tequila en sus diferentes etapas de producción

Etapa de producción	Descripción de la etapa de producción	Estudios en la evaluación en la calidad del Tequila	Referencias
Destilación	<p>Durante el proceso de destilación, ocurren dos etapas: Primera destilación o destrozamiento: Contenido alcohólico de 25-30% v/v. El producto obtenido se llama ordinario. Segunda destilación: Conocida también como rectificación, el contenido alcohólico aumenta en un 55% (v/v). El producto obtenido se denomina Tequila.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Análisis de alcoholes superiores en “cabezas” y “colas”</li> <li>• Estudio de la evaluación en diferentes columnas de destilación</li> <li>• Evaluación de prototipos para obtener un ahorro energético</li> </ul>	<p>[19, 41]</p> <p>[42]</p> <p>[43]</p>
Maduración	<p>Proceso adicional en el cual se confiere propiedades organolépticas específicas en la bebida. En este se coloca en barricas de roble o encino Tequila clase blanco el cual queda en un proceso de añejamiento y reposo en la bodega de la empresa hasta que se alcance el tiempo determinado.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Evaluación de VOC's durante tiempo de maduración</li> <li>• Evaluación de VOC's minoritarios</li> <li>• Evaluación de las relaciones isotópicas de <math>\delta^{13}\text{C}</math> y <math>\delta^{18}\text{O}</math> durante el tiempo de maduración</li> </ul>	<p>[44–46]</p> <p>[47]</p> <p>[48, 49]</p>

La autenticidad y trazabilidad del Tequila se establecen a través de una inspección permanente que realiza el CRT en las instalaciones de los productores autorizados de Tequila, verificando el proceso de producción en todas sus etapas, de acuerdo con la NOM-006-SCFI-2012. Sin embargo, en la actualidad, el consumo de Tequila se ha incrementado en mayor volumen, siendo comercializado en más países alrededor del mundo demostrando así que es un producto exitoso teniendo un aumento en el número de consumidores; por consiguiente, se deben establecer y fortalecer controles de calidad para su ingreso a los países que se importan, principalmente en tres importantes áreas de impacto que son: calidad, inocuidad y autenticidad del Tequila. Debido a lo anterior, en los últimos años se han documentado en medios nacionales e internacionales

numerosos casos de falsificación de Tequila en diferentes partes del mundo, lo que ha llevado a la destrucción de estos productos en Estados Unidos de América, Uruguay, Grecia, Francia, Alemania y Chile. Esto representa una pérdida económica para la industria ocasionando que estas bebidas adulteradas afecten las ventas e imagen del Tequila [50]. Además de que pueden llegar a ocasionar un riesgo a la salud de los consumidores, debido a que en estos productos alcohólicos llega a existir un riesgo a la salud debido a la presencia de ciertos compuestos [51, 52].

En algunos casos, el CRT ha demostrado que los productos falsificados corresponden a la manipulación química de bebidas mediante la adición de compuestos químicos como metanol, alcoholes superiores, ésteres y aldehídos. Como resultado, se consigue un producto formulado que pueda cumplir con los parámetros cromatográficos y fisicoquímicos establecidos por las normas oficiales, aun cuando la matriz analizada no sea un producto auténtico, demostrando así una insuficiencia de métodos analíticos actuales para detectar productos no auténticos. Por ello, numerosos grupos de investigación han desarrollado nuevos métodos analíticos para combatir estas prácticas ilegales.

## **2.2. Técnicas analíticas empleadas con fines de autenticidad en el Tequila**

Como se mostró anteriormente en la Tabla 2.1, el proceso de producción de tequila consta de varias etapas con problemas específicos de calidad alimenticia que han demostrado ser significativos para establecer un criterio de control. No obstante, se han detectado y decomisado productos falsificados durante la comercialización en la que las técnicas analíticas deben enfocarse en determinar parámetros que permitan identificar las bebidas auténticas de las bebidas falsificadas. Por lo tanto, evaluar la autenticidad del Tequila aún necesita una solución que permita a los productores y autoridades federales acreditar que es original y genuino, ya que actualmente se realiza por un proceso de inspección en el cual se busca que este acompañado de un criterio auxiliar que permita una validación analítica. Varias investigaciones se han centrado en evaluar el perfil fisicoquímico [53] o discriminar con otro tipo de bebidas seleccionadas [54]. Sin embargo, las técnicas han evolucionado y se han propuesto nuevos métodos analíticos para determinar marcadores, huellas dactilares o parámetros adicionales que demuestren la sensibilidad y especificidad del tequila en comparación con otras bebidas.

Por esta razón, las técnicas analíticas se han clasificado en tres grupos: cromatográficos, espectroscópicos y electrónicos, que abarcan diferentes enfoques siendo algunas estrategias empleadas para el análisis del tequila como: quimiometría, cartas isotópicas, trazadores metálicos y compuestos orgánicos volátiles.

### 2.3. Estudios empleando técnicas cromatográficas

Los primeros estudios científicos fueron enfocados a salvaguardar la autenticidad del Tequila basándose en la determinación de analitos de interés presentes en la matriz alcohólica estableciendo límites permisibles los cuales se llevaron a cabo mediante cromatografía de gases y líquidos. Considerando los avances, se logró definir dentro de las normas oficiales el análisis de aldehídos, metanol, ésteres y alcoholes superiores mediante cromatografía de gases acoplado a un detector de ionización de llama. Por el contrario, el análisis de furfural se realiza mediante cromatografía de líquidos. En la Tabla 2.2 se presenta una compilación de los trabajos de investigación reportados en literatura encaminados a salvaguardar la autenticidad del Tequila mediante técnicas cromatográficas.

**Tabla 2.2.** Evaluación de la autenticidad del Tequila empleando técnicas de cromatografía de gases y líquidos

Técnica analítica	Matriz	Analito de interés	Referencia
Cromatografía de gases acoplada a un detector de quimioluminiscencia de azufre (GC-SCD), ionización de flama (GC-FID) y espectrometría de masas (GC-MS)	Tequila 100% agave clase Blanco (n=1)	175 compuestos fueron detectados; entre ellos, más de 60 compuestos se identificaron como odorantes teniendo un impacto en las propiedades fisicoquímicas. Entre estos compuestos se destaca el isovaleraldehído, 2-fenil etanol, $\beta$ -damascenona y vainillina.	[55]
Cromatografía de gases bidimensional acoplada a espectrometría de masas con un detector de tiempo de vuelo (GCxGC/TOFMS)	Cachaça, ron, vodka, gin y tequila (n= n/s)	Ésteres, terpenos y aldehídos	[54]

**Tabla 2.2. (Continuación)** Evaluación de la autenticidad del Tequila empleando técnicas de cromatografía de gases y líquidos

Técnica analítica	Matriz	Analito de interés	Referencia
Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) y acoplada a olfatometría (GC-O)	Tequila 100% agave clase Blanco, Reposado y añejo (n= n/s)	2/3-metilbutanol, ácido decanoico y acetato de 2-feniletil	[56]
Cromatografía de gases y técnica headspace con micro extracción en fase sólida acoplada a espectrometría de masas (HS-SPME-GC-MS)	Raicilla, sisal, tequila, bacanora, sotol, pulque, (n=1 de cada una) y mezcal (n=4)	2-metoxi-4-metil-fenol y 2-metil-5-(1-metiletil)-fenol	[57]
Cromatografía de gases y cromatografía iónica	Tequila 100% agave (n=31), tequila (n=25), mezcal (n=10), sotol (n=16) y bacanora (n=13)	Metanol, 2-/3-metil-1-butanol y 2-feniletanol	[58]
Cromatografía líquida de alta resolución con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD)	Tequila 100% agave (n=9) 3 de cada clase siendo blanco, reposado y añejo. De Tequila (n=6) siendo 3 blanco y 3 reposado.	Ácido gálico, 5-(hidroximetil)-furfural, ácido 3,4-dihidroxibenzoico, vainillina, siringaldehído, sinapaldehído, confieraldehído, ácido vainillinico, ácido siringico, ácido ferúlico y escopoletina.	[2]
Cromatografía líquida de alta resolución con ionización por electropray-trampa de iones con espectrometría de masas (HPLC– ESI-ITMS)	Tequila 100% agave (n=22) siendo de cada clase blanco (n=6), reposado (n=12) y añejo (n=4).	Ácido siringico, vanílico, ácido 3,4-dihidroxibenzoico y compuestos fenólicos	[11]

**Tabla 2.2. (Continuación)** Evaluación de la autenticidad del Tequila empleando técnicas de cromatografía de gases y líquidos.

Técnica analítica	Matriz	Analito de interés	Referencia
Técnica de headspace por microextracción fase sólida con cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (HS-SPME-GC-MS) y cromatografía líquida de alta resolución con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD)	Tequila 100% agave (n=69) siendo clasificadas dentro de sus respectivas clases: blanco (n=22), oro (n=12), reposado (n=23) y añejo (n=12)	Se apreció una diferenciación entre clases mediante derivados de furano, alcoholes superiores y acetato de etilo (compuestos orgánicos volátiles)	[59]
Micro extracción de fase sólida (SPME) y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)	Tequila 100% agave clase blanco, oro, reposado y añejo (n=n/s).	Ésteres etílicos	[60]
Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) con monitoreo de iones seleccionados (SIM) usando una extracción líquido-líquido por precipitación inducida por sal	Tequila (n=28) para cada clase fueron: blanco (n=7), reposado (n=7), añejo (n=7) y extra añejo (n=7)	Guaiacol, 4-Metilguaiacol, 4-etilguaiacol, <i>trans</i> -whiskey lactona, <i>cis</i> -whiskey lactona, eugenol, vainillina, apocinina, siringaldehído	[61]

n=número de muestras analizadas; n/s= no especificado

El uso de la cromatografía como herramienta analítica para la determinación de contaminantes, compuestos orgánicos volátiles y otros compuestos claves que previamente se han analizado con éxito siendo una excelente técnica analítica para la autenticidad de los alimentos [62]. Una de las etapas críticas en el análisis de la bebida son las técnicas de extracción en las cuales, debido a la complejidad de la matriz, el rango de aplicación y análisis costo-efectividad son esenciales para demostrar la confiabilidad de analizar los compuestos orgánicos volátiles que se encuentran en

niveles traza (bajas concentraciones) que pueden usarse como marcadores para indicar una clasificación entre las clases de tequila y bebidas apócrifas.

#### **2.4. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas de relaciones isotópicas**

Para asegurar la autenticidad de la bebida, desde la década del 2000 y en los últimos años, se inició el estudio de la identificación de trazadores de autenticidad para la autenticación del Tequila en sus diferentes clases, utilizando algunas técnicas como la resonancia magnética nuclear y la cromatografía de gases por espectrometría de masas de relaciones isotópicas (GC/IRMS). Debido a esto, Thomas et al., (2010) [63] utilizaron una técnica analítica para determinar el deuterio mediante el fraccionamiento de isótopos naturales específicos del sitio mediante resonancia magnética nuclear (SNIF-NMR) en los carbonos CH<sub>3</sub> y CH<sub>2</sub> del etanol. Los resultados mostraron este método ser útil para la detección de adición de azúcares previamente no detectados (caña y maíz). No obstante, se debe robustecer el análisis sobre un mayor número de muestras ya que este estudio solo se realizó sobre 24 muestras.

Se han realizado varios estudios para regular ciertos compuestos que afectan la salud de los consumidores. Un compuesto que sin duda ha sido evaluado como parámetro ha sido la concentración de acroleína, en el que Kachele et al., (2014) [64] desarrollaron un método usando micro extracción en fase sólida con headspace usando cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (HS-SPME/GC-MS) y resonancia magnética nuclear (RMN). Se utilizó la técnica de RMN para evaluar la estabilidad del compuesto en soluciones hidroalcohólicas, luego el HS-SPME/GC-MS fue la técnica utilizada para detectar el compuesto en muestras reales como el Tequila, resultando confiable y de gran sensibilidad en su cuantificación, por lo que es posible utilizarlo como criterio de calidad. Sin embargo, las muestras analizadas fueron solo siete, por lo que aún falta un mayor número de muestras para determinar su importancia o relevancia.

La posibilidad de utilizar otras técnicas como relaciones isotópicas por espectrometría de masas fue estudiada en la investigación de Aguilar-Cisneros et al., (2002) [65] que consistió en headspace por microextracción en fase sólida (SPME) y una columna PLOT en un cromatógrafo de Gases con espectrometría de masas de relaciones isotópicas

(IRMS) en dos modos: “Combustión” (HRG-C-IRMS) y “Pirólisis” (HRG-P-IRMS) para obtener las proporciones isotópicas de Carbono 13 expresadas en relación a Vienna Pee Dee Belemnite ( $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ ) y Oxígeno 18 se expresarán en relación con el Vienna Standard Mean Ocean Water ( $\delta^{18}\text{O}_{\text{VSMOW}}$ ), respectivamente. El estudio se realizó con muestras en las que el contenido de etanol era de Tequila previamente autenticado (n=14), Tequila comercial (n=15) y de otras bebidas espirituosas (n=23). Los valores encontrados en Tequila 100% agave clase blanco para la relación isotópica Carbono 13 ( $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ ) fueron de -12.1 a -13.2 ‰, mientras que para la categoría Tequila el rango estuvo entre -12.5 a -14.8 ‰. Para este caso, las proporciones isotópicas de Oxígeno 18 ( $\delta^{18}\text{O}_{\text{VSMOW}}$ ) se encontraron valores en un intervalo de +22.1 a +22.8 ‰ para Tequila 100% agave, y Tequila en un intervalo de +20.8 a +21.7 ‰. Sobre el mismo tema, Fonseca-Aguiñaga et al., (2020) [66] realizaron una caracterización isotópica para Tequila (n=75) y Tequila 100% agave (n=145), ambos clase blanco, las muestras analizadas fueron proporcionadas por el CRT, seleccionadas por asignación proporcional considerando el total de productores activos de Tequila. Los resultados obtenidos para  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  mostraron que el 96% de los datos se encontraron entre -12.0 a -13.5 ‰, lo que puede estar relacionado con la planta utilizada como fuente de azúcar o materia prima para la obtención de la bebida, en el caso del *Agave tequilana* Weber variedad azul, su principal característica es según su metabolismo que se adapta a ambientes secos, siendo el Metabolismo de las Ácido Crasuláceas (CAM), una vía particular para fijar el  $\text{CO}_2$  atmosférico. Por otro lado, los datos experimentales de  $\delta^{18}\text{O}_{\text{VSMOW}}$  mostraron que el 96 % de los resultados de los datos estaban en el rango de +16.0 a +24.5 ‰, lo que se puede atribuir como un parámetro para determinar en qué región se produjo la bebida. Adicionalmente, para muestras seleccionadas, se realizó el análisis para determinación de cobre por Absorción Atómica, teniendo como resultado para Tequila y Tequila 100% agave, diferencias en sus valores  $< 0.4 \text{ mg L}^{-1}$ . A partir de los resultados obtenidos se construyó una tabla analítica utilizando como límites un rango de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}} = -12.0$  a  $-13.5$  ‰ y un rango de concentración de cobre = 0 a  $2 \text{ mg L}^{-1}$ . La tabla analítica propuesta arrojó una sensibilidad y especificidad del 100% para diferenciar tequila de mezcal, bacanora, raicilla, así como alcoholes de caña de azúcar, maíz, uva y muestras no auténticas que el CRT decomisó. El método analítico propuesto estableció límites máximos y mínimos permisibles para  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ ,  $\delta^{18}\text{O}_{\text{VSMOW}}$  y contenido de cobre,

lo que permite clasificar al Tequila auténtico con 100% de efectividad del Tequila auténtico 100% agave clase blanco de producto que no lo es.

A partir de los resultados anteriores, es posible establecer nuevos parámetros analíticos que sustenten a la Norma Oficial Mexicana NOM-006-SCFI-2012 (Tabla 2.3.) debido a que  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  puede estar relacionado con la planta utilizada como fuente de azúcar para alcohol (*Agave tequilana* Weber variedad azul, planta procedente del metabolismo CAM para reducir al mínimo la fotorrespiración). La técnica analítica propuesta permite distinguir con gran exactitud el Tequila y Tequila 100% de agave con otras bebidas alcohólicas, incluyendo bebidas no-auténticas y otras pertenecientes a otras especies de agave como la bacanora, el mezcal y la raicilla. Por otro lado, el  $\delta^{18}\text{O}_{\text{VSMOW}}$  está relacionado con el tiempo de maduración de la bebida [49] debido a la reacción de oxidación que sufre la bebida durante el proceso de maduración, la cual puede resumirse en la formación de acetaldehído, ácido acético y acetato de etilo [48].

**Tabla 2.3.** Parámetros analíticos auxiliares para determinar la autenticidad de la fuente de azúcar utilizada para la producción de etanol ( $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ ) y tiempo de maduración de la bebida ( $\delta^{18}\text{O}_{\text{VSMOW}}$ ).

Bebida	$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ (‰)			$\delta^{18}\text{O}_{\text{VSMOW}}$ (‰)		
	Min	Max	Promedio	Min	Max	Promedio
Tequila 100% agave clase Blanco	-13.38	-12.30	-12.84	17.38	21.66	19.52
Tequila 100% agave clase Reposado	-13.25	-12.43	-12.84	18.65	22.43	20.54
Tequila 100% agave clase Añejo	-13.20	-12.52	-12.86	19.42	23.48	21.45

## 2.5. Estudios espectroscópicos para validar la autenticidad en el Tequila

Como se discutió anteriormente, las técnicas de cromatografía se han utilizado ampliamente para determinar trazadores orgánicos como compuestos volátiles, compuestos fenólicos o compuestos aromáticos que podrían distinguir el tequila de otras bebidas. Sin embargo, el Tequila tiene un perfil fisicoquímico en el que se han realizado varias investigaciones para evaluar trazadores inorgánicos que enriquecen esta bebida para demostrar diferencias significativas entre Tequila como son sus categorías, clases o incluso establecer diferencias entre bebidas producidas a partir de otras especies de agave (mezcal, bacanora, raicilla, sotol) o bebidas falsificadas. Se han utilizado

diferentes técnicas espectroscópicas para conseguir estos objetivos debido a su sencillez, fácil manejo, cortos tiempos de análisis y alta fiabilidad. Como en apartados anteriores, la Tabla 2.4 muestra una recopilación de los estudios más importantes que han realizado las técnicas espectroscópicas.

**Tabla 2.4.** Estudios empleando técnicas espectroscópicas para el análisis de calidad y autenticidad en Tequila

Técnica analítica	Matriz	Analito de interés	Referencia
Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS)	Tequila (n=13) y Tequila 100% agave (n=27) con diferentes clases siendo blanco (n=20), reposado (n=20), añejo (n=9)	19 metales y metaloides	[67]
UV-Vis	Tequila and Tequila 100% agave clase blanco y Mezcal (n=82 muestras de Tequila y 23 de Mezcal)	Compuestos furánicos (furfural, 2-acetilfurano y 5-metilfurfural)	[68]
Espectrometría de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES)	Tequila 100% agave (n=121) y cuatro clases siendo blanco (n=44), oro (n=20), reposado (n=40) y añejo (n=17), además se tiene mezcales añejos (n=9)	Doce metales	[69]

**Tabla 2.4.** (Continuación) Estudios empleando técnicas espectroscópicas para el análisis de calidad y autenticidad en Tequila

Técnica analítica	Matriz	Analito de interés	Referencia
Espectroscopia Fluorescencia	Tequila (n=5), Tequila 100% agave blanco, reposado y añejo (n=10 de cada clase). Muestras apócrifas (n=5), etanol, agua destilada y metanol.	4 longitudes de onda (255, 330, 365, and 405 nm)	[52]
UV-Vis	Tequila y Tequila 100% agave con muestras de Blanco y Reposado (n=39 muestras de Tequila Blanco y 41 de reposado)	Espectro UV-Vis con estudio quimiométrico	[4]
UV-Vis	Tequila (n=170) para cada clase corresponde Blanco (n=65), reposado (n=53), añejo (n=39) y extra añejo (n=13)	Espectro UV-Vis con análisis por quimiometría (PCA, SIMCA, KNN, PLS, and PCA-DA)	[70]
UV-Vis	Tequila (n=170) en donde para cada clase corresponde de blanco (n=65), reposado (n=53), añejo (n=39) y extra añejo (n=13)	QDA, PLS-DA, PLS-KERNEL, SVM, and CPANN	[71]

**Tabla 2.4. (Continuación)** Estudios empleando técnicas espectroscópicas para el análisis de calidad y autenticidad en Tequila

<b>Técnica analítica</b>	<b>Matriz</b>	<b>Analito de interés</b>	<b>Referencia</b>
Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR)	Tequila 100% agave (n=12) y Tequila (n=23). Otras muestras fueron analizadas siendo Blanco 100% natural, brandi de agave y licor de agave.	Análisis por PCA mediante compuestos volátiles (metanol, acetato de etilo, propanol, isobutanol y 2-/3-metil-1-butanol)	[6]
Raman	Tequila 100% agave (blanco, reposado, y añejo) (n=1)	Dos longitudes de onda (532 y 785 nm) en la búsqueda de marcadores para evaluar maduración	[5]
Raman	Tequila clase blanco y reposado (n=15), bebidas destiladas, agua destilada y etanol (n=4)	Estudio cualitativo para evaluar el contenido alcohólico	[72]
MALDI-TOFMS e ICP-MS	Tequila (n=10) clase Blanco, reposado, añejo y extra añejo.	Cobre y plomo	[73]

## 2.6. Estudios mediante técnicas electrónicas para el aseguramiento de la calidad y autenticidad en el Tequila

Previos trabajos de investigación se han centrado en el análisis de diferentes muestras demostrando así ser de gran utilidad para la investigación. Por ello, el uso de cromatografía y espectroscopia dentro de los laboratorios de investigación son las principales herramientas de análisis para estudiar muestras complejas. Sin embargo, ha habido un gran interés en evaluar y caracterizar las propiedades fisicoquímicas mediante otras técnicas o parámetros analíticos utilizando sensores, señales fotoacústicas, propiedades dieléctricas o electroquímica. Se ha podido establecer ciertos factores para evaluar la calidad de la bebida. En la tabla 2.5 se presenta el resumen de las técnicas utilizadas para brindar una caracterización del Tequila y Tequila 100% agave utilizando métodos electrónicos y electroquímicos

**Tabla 2.5.** Estudios enfocados en la calidad y autenticidad del Tequila mediante técnicas electrónicas

Técnica analítica	Matriz	Analito de interés	Referencia
Voltamperometría de Redisolución anódica	Tequila (n=n/s)	Cobre	[74]
Voltamperometría diferencial de pulsos con redisolución anódica e ICP-OES	Tequila (n=1), Cachaça (n=3), Gin (n=1) y Vodka (n=1)	Cobre	[75]
Ojo electrónico	Tequila 100% agave blanco (n=8), reposado (n=12) y añejo (n=5)	Análisis por RGB (Rojo, verde y azul)	[76]
Sonda coaxial	Tequila 100% agave (n=9) y destilados agaváceos (n=3)	Propiedades dieléctricas en el rango de frecuencia de microondas	[77]

**Tabla 2.5. (Continuación) Estudios enfocados en la calidad y autenticidad del Tequila mediante técnicas electrónicas**

<b>Técnica analítica</b>	<b>Matriz</b>	<b>Analito de interés</b>	<b>Referencia</b>
Propiedades fisicoquímicas	Muestras de Tequila (n=53) dividido en blanco (n=53), oro (n=5), reposado (n=29) y añejo (n=8)	pH, viscosidad, conductividad, densidad, velocidad del sonido e índice de refracción	[78]
Fotoacústica pulsada	Tequila and Tequila 100% agave blanco (n=10) y reposado (n=1)	Señales fotoacústicas	[7]
Resonancia del plasmón de superficie (SPR)	Tequila blanco (n=4), reposado (n=8) y añejo (n=4). También se analizó tonayan, muestra apócrifa y mezcal.	Ancho y posición SPR	[79]
Sensores de capa delgada de ZnO	Tequila reposado (n=4) y licor de agave (n=1)	Fracción volátil	[80]
Sensor de fibra óptica recubierto con una película delgada de nanovarillas de óxido de ZnO	Tequila clase blanco (n= n/s)	Análisis de concentración de metanol en Tequila	[9]
Películas de nanovarillas ZnO	Tequila clase reposado con diferentes mezclas de metanol (n=n/s)	Metanol	[8]

n= número de muestras analizadas; n/s= sin especificar

## 2.7. Técnicas electroquímicas en el análisis de bebidas alcohólicas

Las técnicas electroquímicas han recuperado la atención por su uso en el análisis de bebidas alcohólicas para establecer criterios específicos para la determinación de la calidad. En el caso del Tequila, pocos estudios han considerado el uso de estas técnicas, teniendo como único objetivo su uso para analizar metales como el cobre en el que sus ventajas son: cribado rápido, menor tiempo de análisis y más accesible; en este caso, las técnicas electroanalíticas aplicadas han sido la voltamperometría de redisolución anódica (ASV) [74] y la voltamperometría diferencial de pulsos de redisolución anódica (DPAdSV) [75]. Ambas técnicas son una comparación efectiva con otros métodos como ICP-OES, donde el límite de detección y el rango de concentración utilizando un sensor de bajo costo como los electrodos de pasta de carbón han sido una excelente alternativa para reemplazar equipos y metodologías complejas que necesitan capacitación y mayor comprensión de cómo funciona el instrumento.

En los últimos años, se ha comenzado con el desarrollo de los métodos electroquímicos en diferentes industrias con la finalidad de brindar detección y determinación de parámetros que permitan establecer resultados fiables en muestras complejas siendo así una técnica rápida, eficaz y fundamentada que pueda respaldar y acreditar la autenticidad de una bebida. Previamente se han realizado ensayos electroquímicos empleando técnicas de cronoamperometría y voltamperometría de pulso diferencial para evaluar la calidad de Brandi a través de parámetros antioxidantes dentro de los cuales se realizaron ensayos teniendo condiciones de 0.1 M Buffer de fosfatos a pH 3.0 reportando la oxidación de ciertos compuestos orgánicos que impactan en las propiedades fisicoquímicas de la bebida como: ácido gálico, siringaldehído, ácido elágico, coniferaldehído y vainillina en una ventana de potencial de 0.2 a 1.2 V vs Ag/AgCl<sub>(sat)</sub> [14]. También se han realizado estudios para investigar ciertos compuestos orgánicos presente en bebidas alcohólicas que pueden impactar en la salud del consumidor como es la histamina en el cual se analizó en cerveza, vino blanco y tinto dentro del cual las condiciones experimentales fueron 0.1 M de buffer de fosfatos pH 6.0 mediante voltamperometría cíclica y de pulso diferencial en una ventana de potencial de 0.40 a 1.60 V vs Ag/AgCl<sub>(sat)</sub> con el cual el pico de oxidación se apreció a 1.25 V. Dentro de las conclusiones de esta investigación se apreció el uso de la técnica electroquímica

de voltamperometría de pulso diferencial como criterio de control de calidad ante la determinación de este analito en productos comerciales teniendo buena respuesta electroquímica asociada a la concentración de la histamina [16].

También se ha reportado su uso para la detección de moléculas como benzilpiperazina (estimulante) en bebidas alcohólicas como vodka, whisky y vino blanco dentro del cual con las condiciones experimentales de un soporte electrolito de buffer Britton-Robinson pH 5.0 con las técnicas electroquímicas de voltamperometría cíclica y pulso diferencial en una ventana de potencial de 0.1 a 1.2 V [15]. Esto ha permitido que se realicen diversos estudios electroquímicos capaces de brindar una caracterización electroquímica en bebidas alcohólicas en la cuales permita realizar una validación y entendimiento de como un perfil voltamperométrico es capaz de establecer un criterio de regulación para la comprensión de diversos fenómenos fisicoquímicos presentes en las diferentes bebidas alcohólicas haciendo que la ciencia de alimentos se ve cada vez con un mayor refuerzo [12].

Por último, da Silva et al. (2021) establecieron el uso de electrodos simples, rápidos con una respuesta electroquímica rápida para la determinación de tiramina presentes en vinos brasileños, con ello, a partir de electrodos hechos con lápiz de grafito, en condiciones experimentales de solución buffer 0.1 M de fosfatos pH 7.4, se realiza un estudio electroquímico completo que permite establecer mediante técnicas electroquímicas como Voltamperometría la importancia que ha tomado la electroquímica como criterio de calidad y diferenciador ante productos apócrifos o adulterados siendo así una de las nuevas estrategias ante este nuevo escenario de nuevos métodos de detección de parámetros analíticos para la autenticación de bebidas alcohólicas [81].

Estos estudios han demostrado el uso de las técnicas electroquímicas como estrategia para el aseguramiento de la calidad y autenticidad en diferentes bebidas alcohólicas teniendo así, de manera rápida y sencilla, la obtención de una respuesta electroquímica que pueda asociarse con el perfil fisicoquímico de la bebida y realizar una discriminación ante productos apócrifos. Por ello, en el presente trabajo de investigación se realizó mediante técnicas voltamperométricas la determinación de un perfil electroquímico para Tequila 100% agave (en sus diferentes clases) que nos permita realizar una

discriminación entre clases asociadas al proceso de maduración. También, se plantea realizar mediante técnicas electroanalíticas la distinción e identificación de productos alcohólicos que fueron confiscados bajo la Unidad de Inspección del CRT debido a ciertos criterios a lo establecido por la normatividad mexicana. Para evaluar la factibilidad del método electroquímico se realizaron estudios comparativos discriminantes entre las actuales técnicas oficiales encargadas de validar el perfil fisicoquímico del Tequila (cromatografía de gases y cromatografía de líquidos de alta resolución) además de los actuales criterios auxiliares que validan la categoría y tiempo de maduración de la bebida por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas de relaciones isotópicas.

# Capítulo III:

## Materiales y métodos

### **3. Materiales y métodos**

#### **3.1. Muestras**

##### **3.1.1. Muestras de Tequila 100% agave**

Se han utilizado muestras de Tequila 100% agave de dos empresas productoras ubicadas en la región Valles y Ciénega. Se analizó una muestra de cada una de las empresas correspondientes a cada una de las diferentes clases de Tequila (S: Blanco, A: Reposado, EA: añejo y UA: extra añejo). Las abreviaturas de las clases de Tequila se han realizado en base a la nomenclatura definida en inglés. Se denominó a este grupo como (*grupo-T*).

##### **3.1.2. Muestras problema y Mezcal**

A continuación, se describen las muestras empleadas para evaluar el uso de la técnica de voltamperometría en muestras que no son Tequila 100% agave siendo dos grupos (*grupo-PS* y *grupo-M*).

El *grupo-PS* corresponde a muestras problema incautadas por la unidad de inspección del CRT, las cuales no cumplen con los criterios de cumplimiento de la Norma Oficial Mexicana NOM-006-SCFI-2012. La nomenclatura S, A, E y U presentada en las muestras correspondientes al grupo PS se definió en función de la similitud cromática con muestras auténticas de las clases blanco, reposado, añejo y extra añejo, respectivamente.

Finalmente, para estudiar las diferencias entre las bebidas alcohólicas producidas a partir de diferentes especies de agave, se estudió el *grupo-M*, correspondiente a muestras de Mezcal clase blanco.

## **3.2. Caracterización fisicoquímica del Tequila**

### **3.2.1. Análisis por Cromatografía de gases**

El contenido de metanol, alcoholes superiores, ésteres y aldehídos se determinó de acuerdo con la metodología descrita por NMX-V-005-NORMEX-2018[82]. Se determinó el contenido de ésteres, alcoholes superiores, aldehídos y metanol. El análisis se realizó en un cromatógrafo de gases Agilent 7890B acoplado a un detector de ionización de llama y un muestreador automático con inyección capilar. Se utilizó una columna Agilent J&W DB-WAX UI de 30 m por 0.25 mm y 0.25  $\mu\text{m}$ . El horno se programó con una rampa de temperatura a partir de 34 °C durante 4 min, con incrementos de 10 °C  $\text{min}^{-1}$  hasta alcanzar una temperatura de 160 °C. Luego, se programó una segunda rampa con incrementos de 15 °C  $\text{min}^{-1}$  hasta alcanzar los 200 °C y se mantuvo constante durante 3 min. En todos los casos, se inyectó un volumen de muestra de 1.0  $\mu\text{L}$  en un modo dividido con una relación dividida de 30: 1 usando nitrógeno como gas portador con un flujo volumétrico constante de 1.13  $\text{mL min}^{-1}$ . Finalmente, las temperaturas de inyección y detección se establecieron en 250 °C.

### **3.2.2. Análisis por Cromatografía de Líquidos**

El furfural se cuantificó mediante cromatografía líquida mediante el método descrito por NMX-V-004-NORMEX-2018 [83], utilizando un cromatógrafo líquido de alta resolución Infinity 1260. Las condiciones operativas fueron columna Agilent Zorbax XBD-C18 4.6 dimensiones 150 mm x 5  $\mu\text{m}$ . La fase móvil se compuso de una solución de agua-metanol (50:50 p/p) con un flujo volumétrico de 0.5  $\text{mL min}^{-1}$ . En todos los casos, el volumen de inyección fue de 5  $\mu\text{L}$  y la fuente de luz se ajustó a 280 nm.

### **3.2.3. Determinación de relaciones isotópica de Carbono 13 y Oxígeno 18**

La preparación de las muestras consistió en un proceso de destilación descrito en el OIV-OENO-426-2011 en el Sistema de Control de Destilación Automática. La destilación consistió en recolectar el destilado del azeótropo etanol-agua (78° C) con un sistema automático con una columna Cadiot. El azeótropo etanol-agua se recupera completamente, el contenido alcohólico del destilado debe ser mayor al 92% m/m y el rendimiento de la destilación debe ser mayor a 96% para evitar el fraccionamiento de

isotopos. Después, con el alcohol obtenido fue analizado por GC/C/IRMS para la determinación de la relación isotópica del carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ) y GC/HTC/IRMS para relaciones isotópicas de oxígeno ( $\delta^{18}\text{O}$ ). Para determinar las relaciones isotópicas, primero, un cromatógrafo de gases de la marca Thermo Scientific, modelo Trace 1310, después de la separación cromatográfica, las muestras fueron introducidas en un espectrómetro de masas con relaciones isotópicas marca Thermo Scientific, modelo Delta V Plus. Todas las muestras se analizaron por triplicado. La metodología utilizada esta descrita a detalle ya ha sido previamente reportada [84].

#### **3.2.4. Análisis por Absorción atómica**

Las determinaciones de trazas de cobre en las muestras fueron realizadas por absorción atómica, utilizando un equipo de la marca *Perkin Elmer* modelo *PinAAcle 900F* y una lámpara de cátodo hueco *Perkin Elmer* (324.75 nm). Las mediciones fueron realizadas utilizando una flama de aire-acetileno con un ancho de ranura espectral de 0.5 nm. Las soluciones utilizadas para la curva de calibración fueron preparadas a partir de una solución estándar de cobre (1000 ppm) proporcionada por *Merck KGaA*. El método analítico se realizó de acuerdo a la norma mexicana NMX-AA-051-SCFI-2016 [85]. Todas las muestras fueron analizadas por triplicado.

#### **3.2.5. Análisis por Espectroscopia UV-Visible**

Los estudios de espectroscopia UV-VIS fueron obtenidos empleando un espectrofotómetro UV-1800 SHIMADZU en la región de 200 a 600 nm con un tamaño de paso de 0.5 nm.

### **3.3. Estudios Electroquímicos**

El potencióstato que se utilizará para realizar los experimentos electroquímicos se utilizó en un potencióstato/galvanostato *AUTO LAB PGSTAT 101* usando el software NOVA 2.0.

#### **3.3.1. Estudios electroquímicos: Voltamperometría de Pulso Diferencial**

Los estudios para la caracterización electroquímica de Tequila 100% agave en todas sus clases se realizaron en una celda electroquímica (15 mL) de tres electrodos siendo: electrodo de referencia ( $\text{Ag}/\text{AgCl}_{(\text{sat})}$ ), contraelectrodo (alambre de platino) y el electrodo

de trabajo (carbón vítreo) con un electrolito soporte de buffer de fosfatos (0.1M). Previo a realizar los estudios de voltamperometría de pulso diferencial, se realizaron estudios con voltamperometría cíclica para definir el potencial de trabajo. Los estudios de voltamperometría cíclica consistieron en analizar las muestras de Tequila 100% agave (en sus diferentes clases) a una velocidad de 100 mV/s empleando una celda electroquímica (15 mL) de tres electrodos.

Posteriormente, para definir las condiciones operacionales del método electroanalítico se evaluaron las variables de estudio:

- ✓ Concentración del analito (25%, 50% y 100%)
- ✓ Efecto del pH (4, 6, 8 y 10)

Al tener definido esos parámetros, se realizaron estudios de Voltamperometría de Pulso Diferencial (VPD) para lo cual se estableció un potencial de trabajo de 0.75 V vs Ag/AgCl<sub>(sat)</sub> por un tiempo de dos minutos. Las especificaciones del método fueron: barrido de potencial de 10 mV s<sup>-1</sup>, ventana de trabajo de -0.3 a 1.0 V vs Ag/AgCl<sub>(sat)</sub>, paso de 5 mV, amplitud de 50 mV y un tiempo de modulación de 50 ms.

Para la limpieza del electrodo se realizó una cronoamperometría a 1.2 V vs Ag/AgCl<sub>(sat)</sub> por un tiempo de 2 minutos con la finalidad de oxidar todos los compuestos que se hayan adsorbido en el electrodo, posteriormente se realizó un lavado con agua bidestilada en un baño ultrasónico y se secó a temperatura ambiente.

Dentro de la caracterización electroquímica se determinó el índice electroquímico (EI), el cual previamente se ha reportado por Lino et al. (2014) siendo representado por la siguiente ecuación:

$$EI = \frac{ip_2}{Ep_2} + \frac{ip_3}{Ep_3}$$

Siendo  $i_{p2}$  e  $i_{p3}$  las corrientes de las señales P<sub>2</sub> y P<sub>3</sub>, de igual manera se describe para  $E_{p2}$  y  $E_{p3}$  con los correspondientes potenciales de las señales de voltamperometría de pulso diferencial. Este índice electroquímico ( $\mu\text{A V}^{-1}$ ) permite correlacionar las señales electroquímicas asociadas con el perfil fisicoquímico de la bebida analizada, principalmente a compuestos asociados al color.

# Capítulo IV: Resultados y Discusión

**Estas páginas fueron eliminadas debido a que su contenido es información clasificada como confidencial de acuerdo con el Artículo 113 fracción II de la Ley Federal de Transparencia y Acceso a la Información Pública 2021, y con el Artículo 116 de la Ley General de Transparencia y Acceso a la Información Pública 2021.**

# Capítulo V: Conclusiones

## 5. Conclusiones

Para todas las muestras de Tequila 100% agaves analizadas (*serie T*) la concentración de congéneres (alcoholes superiores, metanol, aldehídos, esterés y furfural) se encuentran dentro de los límites máximos permisibles por la Norma Oficial Mexicana NOM-006-SCFI-2012. Se observa que los alcoholes superiores, esterés, aldehídos y furfural incrementan en las diferentes clases de tequila analizadas asociándose con reacciones de oxidación ocurridas en el interior de la barrica durante el proceso de maduración. En el caso de las muestras distintas a Tequila (*series PS y M*) la mayoría (10 de 14) cumplen con los perfiles cromatográficos establecidos por la Norma Oficial Mexicana NOM-006-SCFI-2012. Evidenciando la necesidad de proponer nuevos métodos analíticos auxiliares a los procesos de verificación actual para salvaguardar la calidad de la bebida. Es importante destacar que para todas las muestras analizadas los valores los resultados obtenidos para  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{18}\text{O}$  estuvieron en el rango  $-12.0\text{‰}$  y  $23.0\text{‰}$ , evidenciando que todas las bebidas estudiadas han sido preparadas a partir de azúcares obtenidos de especies de agave.

Adicionalmente, la caracterización fisicoquímica se complementó con la determinación de cobre por absorción atómica evidenciándose la presencia de este metal a nivel traza en las muestras de Tequila 100% agaves analizadas (*serie T*), atribuible al proceso de destilación de la bebida en el cual se utilizan alambiques de cobre a fin de enriquecer el perfil organoléptico de la bebida.

El método electroanalítico propuesto que mejor resultados arrojó fue la Voltamperometría de Pulso diferencial con las condiciones experimentales: volumen de la muestra 15 mL, pH 4, concentración de la muestra del 50% con respecto al electrolito soporte (buffer de fosfatos 0.1 M), empleando un electrodo de referencia (Ag/AgCl(sat)), un contraelectrodo (alambre de platino) y un electrodo de trabajo (carbón vitreo,  $\varnothing = 3\text{ mm}$ ). Las especificaciones del método en el software fueron: potencial de trabajo de 0.75 V vs Ag/AgCl(sat) por un tiempo de dos minutos, un barrido de potencial de 10 mV/s, ventana de trabajo de -0.3 a 1.0 V vs Ag/AgCl(sat), paso de 5 mV, amplitud de 50 mV y un tiempo de modulación de 50 ms.

Los voltamperogramas de pulso diferencial obtenidos para las muestras de Tequila 100% agave analizadas (*serie T*) mostraron tres señales características: i) -0.05 V vs.

Ag/AgCl<sub>(sat)</sub> atribuible a la reducción de Cu<sup>2+</sup> a Cu<sup>0</sup> presente en la muestra; ii) 0.34 V vs. Ag/AgCl<sub>(sat)</sub> relacionado con la fracción polifenólica que tiene actividad antioxidante; por tanto a la oxidación de compuestos orgánicos que contienen el grupo catecol, y iii) 0.50 V vs. Ag/AgCl<sub>(sat)</sub> debido a la oxidación del grupo flavonoide presente en la muestra debido al proceso de maduración. Con estos resultados fue posible proponer un índice electroquímico de color (EI) para Tequila 100% agave (en sus diferentes clases) parámetro útil como estrategia auxiliar para garantizar la calidad de la bebida

El método analítico desarrollado y el índice electroquímico de color obtenido para las muestras de Tequila 100% agave se contrastó contra muestras problema (serie PS y M) concluyendo que mediante la técnica electroanalítica propuesta es posible clasificar correctamente muestras de Tequila que cumplen con los criterios de calidad definidos por la Norma Oficial Mexicana NOM-006-SCFI-2012, mostrándose como una alternativa innovadora auxiliar a los procesos convencionales basados en cromatografía de gases y líquidos.

Finalmente, mediante una revisión bibliográfica rigurosa se realizó el estudio y comparación de las diferentes técnicas analíticas reportadas en la literatura útiles para la evaluación de la calidad y autenticidad de la bebida. Se concluye que las técnicas analíticas propuestas al momento se clasifican en estudios cromatográficos, estudios espectroscópicos y estudios con dispositivos electrónicos. Dentro de los dispositivos electrónicos es posible incluir al método analítico propuesto, teniendo como perspectiva de trabajo emplear las condiciones óptimas descritas en este estudio para desarrollar sensores electroquímicos útiles para evaluar la calidad de la bebida de manera rápida y eficiente.

## Bibliografía

1. Diario Oficial de la Federación M (2012) NOM-006-SCFI-2012. Norma Oficial Mexicana: Bebidas alcohólicas-Tequila-especificaciones. Mexico
2. Muñoz-Muñoz AC, Grenier AC, Gutierrez-Pulido H, Cervantes-Martinez J (2008) Development and validation of a High Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detection method for the determination of aging markers in tequila. *J Chromatogr A* 1213:218–223. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.10.018>
3. Lachenmeier DW, Sohnius EM, Attig R, Lopez MG (2006) Quantification of selected volatile constituents and anions in Mexican Agave spirits (Tequila, Mezcal, Sotol, Bacanora). *J Agric Food Chem* 54:3911–3915. <https://doi.org/10.1021/jf060094h>
4. Contreras U, Barbosa-García O, Pichardo-Molina JL, et al (2010) Screening method for identification of adulterate and fake tequilas by using UV-VIS spectroscopy and chemometrics. *Food Res Int* 43:2356–2362. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.09.001>
5. Espinosa-Vega LI, Belio-Manzano A, Mercado-Ornelas CA, et al (2019) Aging spectral markers of tequila observed by Raman spectroscopy. *Eur Food Res Technol* 245:. <https://doi.org/10.1007/s00217-018-3203-4>
6. Lachenmeier DW, Richling E, Lopez MG, et al (2005) Multivariate analysis of FTIR and ion chromatographic data for the quality control of tequila. *J Agric Food Chem* 53:2151–2157. <https://doi.org/10.1021/jf048637f>
7. Ruiz-Perez A, Perez-Castaneda JI, Castaneda-Guzman R, Perez-Ruiz SJ (2013) Determination of Tequila Quality by Photoacoustic Analysis. *Int J Thermophys* 34:1695–1702. <https://doi.org/10.1007/s10765-013-1397-z>
8. Maldonado-Arriola JA, Sanchez-Zeferino R, Alvarez-Ramos ME (2020) Photoluminescent properties of ZnO nanorods films used to detect methanol contamination in tequila. *Sensors Actuators A Phys* 312:. <https://doi.org/10.1016/j.sna.2020.112142>
9. Necochea-Chamorro JI, Carrillo-Torres RC, Sanchez-Zeferino R, Alvarez-Ramos ME (2019) Fiber optic sensor using ZnO for detection of adulterated tequila with methanol. *Opt Fiber Technol* 52:. <https://doi.org/10.1016/j.yofte.2019.101982>
10. Aguilar-Mendez O, Lopez-Alvarez JA, Diaz-Perez AL, et al (2017) Volatile compound profile conferred to tequila beverage by maturation in recycled and regenerated white oak barrels from *Quercus alba*. *Eur Food Res Technol* 243:2073–2082. <https://doi.org/10.1007/s00217-017-2901-7>
11. Magana AA, Wrobel K, Elguera JCT, et al (2015) Determination of Small Phenolic Compounds in Tequila by Liquid Chromatography with Ion Trap Mass Spectrometry Detection. *Food Anal Methods* 8:864–872. <https://doi.org/10.1007/s12161-014-9967-7>
12. Chiorcea-Paquim AM, Enache TA, De Souza Gil E, Oliveira-Brett AM (2020) Natural phenolic antioxidants electrochemistry: Towards a new food science methodology. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 19:1680–1726.

<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12566>

13. Makhotkina O, Kilmartin PA (2010) The use of cyclic voltammetry for wine analysis: Determination of polyphenols and free sulfur dioxide. *Anal Chim Acta* 668:155–165. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.03.064>
14. Ziyatdinova G, Salikhova I, Skorobogatova N, et al (2015) New Electrochemistry-Based Approaches to Brandy Quality Evaluation Using Antioxidant Parameters. *Food Anal Methods* 8:1794–1803. <https://doi.org/10.1007/s12161-014-0059-5>
15. Rocha RG, Silva I, Arantes LC, et al (2021) Simple and rapid electrochemical detection of 1-benzylpiperazine on carbon screen-printed electrode. *Microchem J* 167:. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106282>
16. Stojanovic ZS, Mehmeti E, Kalcher K, et al (2016) SWCNT-modified carbon paste electrode as an electrochemical sensor for histamine determination in alcoholic beverages. *Food Anal Methods* 9:2701–2710. <https://doi.org/10.1007/s12161-016-0452-3>
17. Lino FMA, De Sá LZ, Torres IMS, et al (2014) Voltammetric and spectrometric determination of antioxidant capacity of selected wines. *Electrochim Acta* 128:25–31. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2013.08.109>
18. Arribas AS, Moreno M, Moreno GA, et al (2018) Characterization of White Wines by Electrochemical Indexes Obtained Using Carbon Nanotube-modified Electrodes. *Electroanalysis* 30:1461–1471. <https://doi.org/10.1002/elan.201800073>
19. Acosta-Salazar E, Fonseca-Aguiñaga R, Warren-Vega WM, et al (2021) Effect of Age of Agave tequilana Weber Blue Variety on Quality and Authenticity Parameters for the Tequila 100% Agave Silver Class: Evaluation at the Industrial Scale Level. *Foods* 10:1–14. <https://doi.org/10.3390/foods10123103>
20. Mellado-Mojica E, de la Vara LE, Lopez MG (2017) Fructan active enzymes (FAZY) activities and biosynthesis of fructooligosaccharides in the vacuoles of Agave tequilana Weber Blue variety plants of different age. *Planta* 245:265–281. <https://doi.org/10.1007/s00425-016-2602-7>
21. Mellado-Mojica E, López MG (2012) Fructan Metabolism in A. tequilana Weber Blue Variety along Its Developmental Cycle in the Field. *J Agric Food Chem* 60:11704–11713. <https://doi.org/10.1021/jf303332n>
22. Pinal L, Cornejo E, Arellano M, et al (2009) Effect of Agave tequilana age, cultivation field location and yeast strain on tequila fermentation process. *J Ind Microbiol Biotechnol* 36:655–661. <https://doi.org/10.1007/s10295-009-0534-y>
23. Lopez MG, Mancilla-Margalli NA, Mendoza-Diaz G (2003) Molecular Structures of Fructans from Agave tequilana Weber var. azul. *J Agric Food Chem* 51:7835–7840. <https://doi.org/10.1021/jf030383v>
24. Prado-Jaramillo N, Estarrón-Espinosa M, Escalona-Buendía H, et al (2015) Volatile compounds generation during different stages of the Tequila production process. A preliminary study. *LWT - Food Sci Technol* 61:471–483. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.11.042>

25. Mancilla-Margalli NA, Lopez MG (2002) Generation of Maillard compounds from inulin during the thermal processing of Agave tequilana Weber var. azul. *J Agric Food Chem* 50:806–812. <https://doi.org/10.1021/jf0110295>
26. Waleckx E, Gschaedler A, Colonna-Ceccaldi B, Monsan P (2008) Hydrolysis of fructans from Agave tequilana Weber var. azul during the cooking step in a traditional tequila elaboration process. *Food Chem* 108:40–48. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.10.028>
27. Ávila-Fernández Á, Rendón-Poujol X, Olvera C, et al (2009) Enzymatic Hydrolysis of Fructans in the Tequila Production Process. *J Agric Food Chem* 57:5578–5585. <https://doi.org/10.1021/jf900691r>
28. Amaya-Delgado L, Herrera-López EJ, Arrizon J, et al (2013) Performance evaluation of *Pichia kluyveri*, *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* in industrial tequila fermentation. *World J Microbiol Biotechnol* 29:875–881. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1242-8>
29. Aldrete-Tapia A, Martínez-Peniche R, Miranda-Castilleja D, Hernández-Iturriaga M (2018) *Saccharomyces cerevisiae* associated with the spontaneous fermentation of tequila agave juice. *J Inst Brew* 124:284–290. <https://doi.org/10.1002/jib.499>
30. Lachance M-A (1995) Yeast communities in a natural tequila fermentation. *Antonie Van Leeuwenhoek Int J Gen Mol Microbiol* 68:151–160. <https://doi.org/10.1007/BF00873100>
31. Lopez-Alvarez A, Diaz-Perez AL, Sosa-Aguirre C, et al (2012) Ethanol yield and volatile compound content in fermentation of agave must by *Kluyveromyces marxianus* UMPE-1 comparing with *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeast used in tequila production. *J Biosci Bioeng* 113:614–618. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2011.12.015>
32. Díaz-Montaño DM, Délia M-L, Estarrón-Espinosa M, Strehaiano P (2008) Fermentative capability and aroma compound production by yeast strains isolated from Agave tequilana Weber juice. *Enzyme Microb Technol* 42:608–616. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.12.007>
33. Gonzalez-Robles IW, Estarron-Espinosa M, Diaz-Montaño DM (2015) Fermentative capabilities and volatile compounds produced by *Kloeckera/Hanseniaspora* and *Saccharomyces* yeast strains in pure and mixed cultures during Agave tequilana juice fermentation. *Antonie Van Leeuwenhoek Int J Gen Mol Microbiol* 108:525–536. <https://doi.org/10.1007/s10482-015-0506-3>
34. Gutiérrez-Lomelí M, Torres-Guzmán JC, González-Hernández GA, et al (2008) Overexpression of ADH1 and HXT1 genes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* improves the fermentative efficiency during tequila elaboration. *Antonie Van Leeuwenhoek Int J Gen Mol Microbiol* 93:363–371. <https://doi.org/10.1007/s10482-007-9213-z>
35. Diaz-Montaño DM, Favela-Torres E, Cordova J (2010) Improvement of growth, fermentative efficiency and ethanol tolerance of *Kloeckera africana* during the fermentation of Agave tequilana juice by addition of yeast extract. *J Sci Food Agric* 90:321–328. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3820>

36. Hernandez-Cortes G, Cordova-Lopez JA, Herrera-Lopez EJ, et al (2010) Effect of pH, aeration and feeding non-sterilized agave juice in a continuous agave juice fermentation. *J Sci Food Agric* 90:1423–1428. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3957>
37. Aldrete-Tapia J, Escalante-Minakata P, Martinez-Peniche R, et al (2020) Yeast and bacterial diversity, dynamics and fermentative kinetics during small-scale tequila spontaneous fermentation. *Food Microbiol* 86:.. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103339>
38. Cortés GH, Octavio J, Rodríguez V, et al (2016) Improvement on the productivity of continuous tequila fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* of Agave tequilana juice with supplementation of yeast extract and aeration. *AMB Express*. <https://doi.org/10.1186/s13568-016-0218-8>
39. Arrizon J, Gschaedler A (2002) Increasing fermentation efficiency at high sugar concentrations by supplementing an additional source of nitrogen during the exponential phase of the tequila fermentation process. *Can J Microbiol* 48:965–970. <https://doi.org/10.1139/W02-093>
40. Arrizon J, Gschaedler A (2007) Effects of the addition of different nitrogen sources in the tequila fermentation process at high sugar concentration. *J Appl Microbiol* 102:1123–1131. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03142.x>
41. Cedeño M (1995) Tequila Production. *Crit Rev Biotechnol* 15:1–11. <https://doi.org/10.3109/07388559509150529>
42. Prado-Ramírez R, Gonzáles-Alvarez V, Pelayo-Ortiz C, et al (2005) The role of distillation on the quality of tequila. *Int J Food Sci Technol* 40:701–708. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.00983.x>
43. Estarrón-Espinosa M, Ruperto.Pérez M, Padilla-de la Rosa JD, Prado-Ramírez R (2019) Innovation in Continuous Rectification for Tequila Production. *Processes* 7:.. <https://doi.org/10.3390/pr7050283>
44. Lopez-Ramirez JE, Martin-del-Campo ST, Escalona-Buendia H, et al (2013) Physicochemical quality of tequila during barrel maturation. A preliminary study. *CyTA - J Food* 11:223–233. <https://doi.org/10.1080/19476337.2012.727033>
45. Méndez OA, Arnoldo J, Álvarez L, et al (2017) Volatile compound profile conferred to tequila beverage by maturation in recycled and regenerated white oak barrels from *Quercus alba*. *Eur Food Res Technol* 243:2073–2082. <https://doi.org/10.1007/s00217-017-2901-7>
46. González-Robles IW, Cook DJ (2016) The impact of maturation on concentrations of key odour active compounds which determine the aroma of tequila. *J Inst Brew* 122:369–380. <https://doi.org/10.1002/jib.333>
47. Martin-del-Campo ST, Lopez-Ramirez JE, Estarron-Espinosa M (2019) Evolution of volatile compounds during the maturation process of silver tequila in new French oak barrels. *LWT - Food Sci Technol* 115:.. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108386>
48. Fonseca-Aguiñaga R, Warren-Vega WM, Miguel-Cruz F, Romero-Cano LA (2021) Isotopic Characterization of 100% Agave Tequila (Silver, Aged and Extra-Aged Class) for Its Use as an Additional Parameter in the Determination of the

- Authenticity of the Beverage Maturation Time. *Molecules* 26:1719. <https://doi.org/10.3390/molecules26061719>
49. Warren-Vega WM, Fonseca-Aguñaga R, González-Gutiérrez L V., et al (2021) Chemical characterization of tequila maturation process and their connection with the physicochemical properties of the cask. *J Food Compos Anal* 98:. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.103804>
  50. Ruiz-Pérez A, Pérez-Castañeda JI, Castañeda-Guzmán R, Pérez-Ruiz SJ (2013) Determination of Tequila Quality by Photoacoustic Analysis. *Int J Thermophys* 34:1695–1702. <https://doi.org/10.1007/s10765-013-1397-z>
  51. Ramirez-Guizar S, Gonzalez-Alatorre G, Perez-Perez MCI, et al (2020) Identification and quantification of volatile toxic compounds in tequila. *J Food Meas Charact* 14:2059–2066. <https://doi.org/10.1007/s11694-020-00452-x>
  52. Vazquez JMD, Fabila-Bustos DA, Quintanar-Hernandez LFD, et al (2015) Detection of Counterfeit Tequila by Fluorescence Spectroscopy. *J Spectrosc* 2015:1–7. <https://doi.org/10.1155/2015/403160>
  53. Benn SM, Peppard TL (1996) Characterization of Tequila Flavor by Instrumental and Sensory Analysis
  54. Cardeal ZL, Marriott PJ (2009) Comprehensive two-dimensional gas chromatography- mass spectrometry analysis and comparison of volatile organic compounds in Brazilian cachaca and selected spirits. *Food Chem* 112:747–755. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.057>
  55. Benn SM, Peppard TL (1996) Characterization of tequila flavor by instrumental and sensory analysis. *J Agric Food Chem* 44:557–566. <https://doi.org/10.1021/jf9504172>
  56. López MG (1999) Tequila Aroma. In: Shahidi F, Ho C-T (eds) *Flavor Chemistry of Ethnic Foods*. Springer US, Boston, MA, pp 211–217
  57. De Leon-Rodriguez A, Escalante-Minakata P, Jimenez-Garcia MI, et al (2008) Characterization of Volatile Compounds from Ethnic Agave Alcoholic Beverages by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Food Technol Biotechnol* 46:448–455
  58. Lachenmeier DW, Sohnius EM, Attig R, López MG (2006) Quantification of selected volatile constituents and anions in Mexican Agave spirits (Tequila, Mezcal, Sotol, Bacanora). *J Agric Food Chem* 54:3911–3915. <https://doi.org/10.1021/jf060094h>
  59. Ceballos-Magaña SG, de Pablos F, Jurado JM, et al (2013) Characterisation of tequila according to their major volatile composition using multilayer perceptron neural networks. *Food Chem* 136:1309–1315. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.048>
  60. Vallejo-Cordoba B, González-Córdova AF, Estrada-Montoya MDC (2004) Tequila volatile characterization and ethyl ester determination by solid phase microextraction gas chromatography/mass spectrometry analysis. *J Agric Food Chem* 52:5567–5571. <https://doi.org/10.1021/jf0499119>
  61. Diaz LFM, Wrobel K, Escobosa ARC, et al (2019) Identification of potential indicators of time-dependent tequila maturation and their determination by selected

- ion monitoring gas chromatography-mass spectrometry, using salting-out liquid-liquid extraction. *Eur Food Res Technol* 245:1421–1430. <https://doi.org/10.1007/s00217-019-03271-7>
62. Mota MFS, Waktola HD, Nolvachai Y, Marriott PJ (2021) Gas chromatography-mass spectrometry for characterisation, assessment of quality and authentication of seed and vegetable oils. *TrAC-Trends Anal Chem* 138:.. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116238>
  63. Thomas F, Randet C, Gilbert A, et al (2010) Improved characterization of the botanical origin of sugar by carbon-13 SNIF-NMR applied to ethanol. *J Agric Food Chem* 58:11580–11585. <https://doi.org/10.1021/jf102983v>
  64. Kachele M, Monakhova YB, Kuballa T, Lachenmeier DW (2014) NMR investigation of acrolein stability in hydroalcoholic solution as a foundation for the valid HS-SPME/GC-MS quantification of the unsaturated aldehyde in beverages. *Anal Chim Acta* 820:112–118. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.02.030>
  65. Aguilar-Cisneros BO, López MG, Richling E, et al (2002) Tequila authenticity assessment by headspace SPME-HRGC-IRMS analysis of  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  and  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  ratios of ethanol. *J Agric Food Chem* 50:7520–7523. <https://doi.org/10.1021/jf0207777>
  66. Fonseca-Aguiñaga R, Gómez-Ruiz H, Miguel-Cruz F, Romero-Cano LA (2020) Analytical characterization of tequila (silver class) using stable isotope analyses of C, O and atomic absorption as additional criteria to determine authenticity of beverage. *Food Control* 112:107161. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107161>
  67. Flores CR, Figueroa JAL, Wrobel K, Wrobel K (2009) ICP-MS multi-element profiles and HPLC determination of furanic compounds in commercial tequila. *Eur Food Res Technol* 228:951–958. <https://doi.org/10.1007/s00217-009-1010-7>
  68. Muñoz-Muñoz AC, Pichardo-Molina JL, Ramos-Ortiz G, et al (2010) Identification and Quantification of Furanic Compounds in Tequila and Mezcal using Spectroscopy and Chemometric Methods. *J Braz Chem Soc* 21:1077–1087. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532010000600018>
  69. Ceballos-Magaña SG, Jurado JM, Martin MJ, Pablos F (2009) Quantitation of Twelve Metals in Tequila and Mezcal Spirits as Authenticity Parameters. *J Agric Food Chem* 57:1372–1376. <https://doi.org/10.1021/jf803626k>
  70. Perez-Caballero G, Andrade JM, Olmos P, et al (2017) Authentication of tequilas using pattern recognition and supervised classification. *TrAC-Trends Anal Chem* 94:117–129. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.07.008>
  71. Andrade JM, Ballabio D, Gomez-Carracedo MP, Perez-Caballero G (2017) Nonlinear classification of commercial Mexican tequilas. *J Chemom* 31:.. <https://doi.org/10.1002/cem.2939>
  72. Frausto-Reyes C, Medina-Gutierrez C, Sato-Berru R, Sahagun LR (2005) Qualitative study of ethanol content in tequilas by Raman spectroscopy and principal component analysis. *Spectrochim Acta Part A Mol Biomol Spectrosc* 61:2657–2662. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2004.10.008>

73. Garcia MM, Wrobel K, Barrientos EY, et al (2018) Determination of copper and lead in tequila by conventional matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and partial least squares regression. *Rapid Commun Mass Spectrom* 32:2174–2184. <https://doi.org/10.1002/rcm.8297>
74. Carreon-Alvarez A, Casillas N, Ibanez JG, et al (2008) Determination of Cu in tequila by anodic stripping voltammetry. *Anal Lett* 41:469–477. <https://doi.org/10.1080/00032710701577989>
75. Oliveira PR, Lamy-Mendes AC, Rezende EIP, et al (2015) Electrochemical determination of copper ions in spirit drinks using carbon paste electrode modified with biochar. *Food Chem* 171:426–431. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.023>
76. Gomez A, Bueno D, Gutierrez JM (2021) Electronic Eye Based on RGB Analysis for the Identification of Tequilas. *Biosensors* 11:. <https://doi.org/10.3390/bios11030068>
77. Kataria TK, Sosa-Morales ME, Olvera-Cervantes JL, Corona-Chavez A (2017) Dielectric properties of tequila in the microwave frequency range (0.5-20 GHz) using coaxial probe. *Int J Food Prop* 20:S377–S384. <https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1297949>
78. Carreon-Alvarez A, Suarez-Gomez A, Zurita F, et al (2016) Assessment of Physicochemical Properties of Tequila Brands: Authentication and Quality. *J Chem* 2016:. <https://doi.org/10.1155/2016/6254942>
79. Luna-Moreno D, Monzon-Hernandez D, Noe-Arias E, Regalado LE (2012) Determination of quality and adulteration of tequila through the use of surface plasmon resonance. *Appl Opt* 51:5161–5167. <https://doi.org/10.1364/AO.51.005161>
80. Acuña-Avila PE, Calavia R, Vigueras-Santiago E, Llobet E (2017) Identification of Tequila with an Array of ZnO Thin Films: A Simple and Cost-Effective Method. *Sensors* 17:. <https://doi.org/10.3390/s17122943>
81. da Silva AG, Franco DL, Santos LD (2021) A simple, fast, and direct electrochemical determination of tyramine in Brazilian wines using low-cost electrodes. *Food Control* 130:. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108369>
82. Diario Oficial de la Federación M (2020) NMX-V-005-NORMEX-2018, BEBIDAS ALCOHÓLICAS-DETERMINACIÓN DE ALDEHÍDOS, ÉSTERES, METANOL, Y ALCOHOLES SUPERIORES-MÉTODOS EN ENSAYO (PRUEBA). Mexico City, Mexico
83. Diario Oficial de la Federación M (2020) NMX-V-004-NORMEX-2018 – Bebidas Alcohólicas – Determinación de Furfural- Métodos de Ensayo (Prueba). Mexico City, Mexico
84. Fonseca-Aguiñaga R, Gomez-Ruiz H, Miguel-Cruz F, Romero-Cano LA (2020) Analytical characterization of tequila (silver class) using stable isotope analyses of C, O and atomic absorption as additional criteria to determine authenticity of beverage. *Food Control* 112:. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107161>
85. Diario Oficial de la Federación M (2016) NMX-AA-051-SCFI-2016. Análisis de

86. Bortoletto AM, Alcarde AR (2013) Congeners in sugar cane spirits aged in casks of different woods. *Food Chem* 139:695–701. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.12.053>
87. Warren-Vega WM, Fonseca-Aguiñaga R, González-Gutiérrez L V, et al (2021) Chemical characterization of tequila maturation process and their connection with the physicochemical properties of the cask. *J Food Compos Anal* 98:103804. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.103804>
88. Ortega-Heras M, Gonzalez-Sanjose ML, Gonzalez-Huerta C (2007) Consideration of the influence of aging process, type of wine and oenological classic parameters on the levels of wood volatile compounds present in red wines. *Food Chem* 103:1434–1448. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.10.060>
89. Pinal L, Cedeño M, Gutierrez H, AlvarezJacobs J (1997) Fermentation parameters influencing higher alcohol production in the tequila process. *Biotechnol Lett* 19:45–47. <https://doi.org/10.1023/A:1018362919846>
90. Ziyatdinova G, Salikhova I, Budnikov H (2014) Chronoamperometric estimation of cognac and brandy antioxidant capacity using MWNT modified glassy carbon electrode. *Talanta* 125:378–384. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.03.039>
91. Ruenroengklin N, Zhong J, Duan X, et al (2008) Effects of Various Temperatures and pH Values on the Extraction Yield of Phenolics from Litchi Fruit Pericarp Tissue and the Antioxidant Activity of the Extracted Anthocyanins. *Int J Mol Sci* 9:. <https://doi.org/10.3390/ijms9071333>
92. Chethan S, Malleshi NG (2007) Finger millet polyphenols: Optimization of extraction and the effect of pH on their stability. *Food Chem* 105:862–870. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.02.012>
93. Deng J, Yang H, Capanoglu E, et al (2018) 9 - Technological aspects and stability of polyphenols. In: Galanakis Recovery, and Applications CMBT-PP (ed) *Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications*. Woodhead Publishing, pp 295–323
94. Šeruga M, Novak I, Jakobek L (2011) Determination of polyphenols content and antioxidant activity of some red wines by differential pulse voltammetry , HPLC and spectrophotometric methods. *Food Chem* 124:1208–1216. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.047>
95. Maddipatla D, Saeed TS, Narakathu BB, et al (2020) Incorporating a Novel Hexaazatriphenylene Derivative to a Flexible Screen-Printed Electrochemical Sensor for Copper Ion Detection in Water Samples. *IEEE Sens J* 20:12582–12591. <https://doi.org/10.1109/JSEN.2020.3002811>
96. Antunovic V, Tripkovic T, Tomašević B, et al (2021) Voltammetric Determination of Lead and Copper in Wine by Modified Glassy Carbon Electrode. *Anal Sci* 37:353–358. <https://doi.org/10.2116/analsci.20P302>
97. Brainina KZ, Stozhko NY, Belysheva GM, et al (2004) Determination of heavy

- metals in wines by anodic stripping voltammetry with thick-film modified electrode. *Anal Chim Acta* 514:227–234. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.03.047>
98. Carreon-Alvarez A, Casillas N, Ibanez JG, et al (2008) Determination of Cu in Tequila by Anodic Stripping Voltammetry. *Anal Lett* 41:469–477. <https://doi.org/10.1080/00032710701577989>
  99. Cedeño MC (1995) Tequila production. *Crit Rev Biotechnol* 15:1–11. <https://doi.org/10.3109/07388559509150529>
  100. Christoph N, Bauer-Christoph C (2007) Flavour of spirit drinks: Raw materials, fermentation, distillation, and ageing. *Flavours Fragrances Chem Bioprocess Sustain* 219–239. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-49339-6\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-540-49339-6_10)
  101. Casas R (2006) Between traditions and modernity: Technological strategies at three tequila firms. *Technol Soc* 28:407–419. <https://doi.org/10.1016/j.techsoc.2006.06.007>
  102. Sciban M, Klasnja M (2004) Study of the adsorption of copper(II) ions from water onto wood sawdust, pulp and lignin. *Adsorpt Sci Technol* 22:195–206. <https://doi.org/10.1260/0263617041503444>
  103. Blasco AJ, Rogerio MC, González MC, Escarpa A (2005) “Electrochemical Index” as a screening method to determine “total polyphenolics” in foods: A proposal. *Anal Chim Acta* 539:237–244. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.02.056>
  104. Magana AA, Wrobel K, Elguera JCT, et al (2015) Determination of Small Phenolic Compounds in Tequila by Liquid Chromatography with Ion Trap Mass Spectrometry Detection. *Food Anal Methods* 8:864–872. <https://doi.org/10.1007/s12161-014-9967-7>
  105. Ziyatdinova G, Kozlova E, Budnikov H (2016) Chronocoulometry of wine on multi-walled carbon nanotube modified electrode: Antioxidant capacity assay. *Food Chem* 196:405–410. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.075>
  106. Gonzalez A, Vidal S, Ugliano M (2018) Untargeted voltammetric approaches for characterization of oxidation patterns in white wines. *Food Chem* 269:1–8. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.104>
  107. Zamora F (2003) *Elaboración y crianza del vino tinto: Aspectos científicos y prácticos*, 1st ed. Madrid
  108. Andrés-Lacueva C, Lamuela-Raventós RM, Buxaderas S, De La Torre-Boronat MDC (1997) Influence of Variety and Aging on Foaming Properties of Cava (Sparkling Wine). 2. *J Agric Food Chem* 45:2520–2525. <https://doi.org/10.1021/jf960905p>
  109. Alcarde AR, Souza LM, Bortoletto AM (2014) Formation of volatile and maturation-related congeners during the aging of sugarcane spirit in oak barrels. *J Inst Brew* 120:529–536. <https://doi.org/10.1002/jib.165>
  110. Makhotkina O, Kilmartin PA (2012) The phenolic composition of Sauvignon blanc juice profiled by cyclic voltammetry. *Electrochim Acta* 83:188–195. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.electacta.2012.07.101>
  111. *Diario Oficial de la Federación M* (2016) NOM-070-SCFI-2016, Bebidas

alcohólicas-Mezcal-Especificaciones. Mexico

112. De León-Rodríguez A, González-Hernández L, De La Rosa APB, et al (2006) Characterization of volatile compounds of mezcal, an ethnic alcoholic beverage obtained from *Agave salmiana*. *J Agric Food Chem* 54:1337–1341. <https://doi.org/10.1021/jf052154+>
113. Pigani L, Rioli C, Foca G, et al (2016) Determination of polyphenol content and colour index in wines through PEDOT-modified electrodes. *Anal Bioanal Chem* 408:7329–7338. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9643-4>

# Anexos

# Anexo A1. A critical review on the assessment of the quality and authenticity of Tequila by different analytical techniques: Recent advances and perspectives

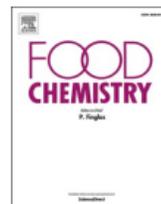
Food Chemistry 408 (2023) 135223



Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

## Food Chemistry

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/foodchem](http://www.elsevier.com/locate/foodchem)



## A critical review on the assessment of the quality and authenticity of Tequila by different analytical techniques: Recent advances and perspectives

Walter M. Warren-Vega<sup>a,b</sup>, Rocío Fonseca-Aguñaga<sup>a,c</sup>, Linda V. González-Gutiérrez<sup>b</sup>,  
Luis A. Romero-Cano<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Grupo de Investigación en Materiales y Fenómenos de Superficie, Departamento de Ciencias Biotecnológicas y Ambientales. Universidad Autónoma de Guadalajara. Av. Patria 1201, C.P. 45129, Zapopan, Jalisco, Mexico

<sup>b</sup> Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica (CIDETEQ), Parque Tecnológico Sanfandila, Pedro Escobedo, Querétaro 76703, Mexico

<sup>c</sup> Laboratorio de Isotopía, Consejo Regulador del Tequila A. C. Av. Patria 723, Zapopan, Jalisco C.P. 45030, Mexico

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Tequila  
Authenticity  
Traceability  
Organic tracers  
Inorganic tracers  
Analytical techniques

### ABSTRACT

Currently, the authenticity and traceability of Tequila are determined in an inspection process carried out by the Tequila Regulatory Council. However, in recent years, the authorities have seized illegal alcoholic products that are marketed as Tequila without being so, making it necessary to strengthen the current methods of detecting counterfeiting and/or adulteration. Therefore, it is important to establish a review of the current analytical techniques that have been proposed to solve this problem. In this review, emphasis is placed on the analysis of the analytical techniques that have been used to consolidate a profile of authenticity and quality in Tequila, thus highlighting new auxiliary analytical techniques to the current verification process, establishing future validation opportunities in terms of international quality control. The use of isotopic ratios stands out as the most robust technique because it establishes the type of sugar source used and the maturation time of the manufacturing process.

**Anexo A2.** Electrochemical study of Tequila 100% agave in its different classes:  
Towards the development of electrochemical sensors useful for the evaluation of the  
quality of the beverage

## **DOCUMENTO PREPARADO PARA PUBLICACIÓN** **ESTATUS: In Progress (14-02-2023)**

### **Electrochemical study of Tequila 100% agave in its different classes: Towards the development of electrochemical sensors useful for the evaluation of the quality of the beverage**

Walter M. Warren-Vega <sup>a,b</sup>, Rocío Fonseca-Aguiñaga <sup>a,c</sup>, Linda V. González-Gutiérrez <sup>b\*</sup>, Luis A. Romero-Cano <sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Grupo de Investigación en Materiales y Fenómenos de Superficie. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Guadalajara. Av. Patria 1201, C.P. 45129. Zapopan, Jalisco. MEXICO.

<sup>b</sup> Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica (CIDETEQ) S.C., Parque Tecnológico Sanfandila, Pedro Escobedo, Querétaro, 760703, MEXICO.

<sup>c</sup> Laboratorio de Isotopía. Consejo Regulador del Tequila A. C. Av. Patria 723, C.P. 45030. Zapopan, Jalisco. MEXICO

#### **Abstract**

Physicochemical and electrochemical characterization of different beverages of interest was carried out to obtain fundamental information that allows the design of specific electrodes useful as electrochemical sensors for evaluating the quality of alcoholic beverages. The physicochemical characterization consisted of gas and liquid chromatography, and atomic absorption spectroscopy studies. It was observed that the chromatographic parameters declared by the current Mexican official standards must be complemented with another analytical technique to discriminate between Tequila and problem samples. The above results relate satisfactorily to electrochemical studies. The differential pulse voltammograms of the Tequila 100% agave samples in their different classes showed three characteristic signals: i) -0.05 V vs. Ag/AgCl<sub>(sat)</sub> attributable to the reduction of Cu<sup>2+</sup> to Cu<sup>0</sup> present in the sample; ii) 0.34 V vs. Ag/AgCl<sub>(sat)</sub> related to the polyphenolic fraction that has antioxidant activity; therefore to the oxidation of organic compounds that contain the catechol group, and iii) 0.50 V vs. Ag/AgCl<sub>(sat)</sub> due to the oxidation of the flavonoid group present in the sample due to the maturation process; with this results, electrochemical color index was determined for Tequila and problem samples and alcoholic beverages obtained from other agave species.

#### **1. Introduction**

In recent years, the Tequila Industry has shown a constant growth in the production of this beverage. In 2022, according to historical data of Tequila Regulatory Council (CRT by its acronym

in Spanish), a total production of 651.4 million liters were produced representing an increase of 23% compared to the previous year.

**Anexo A3.** Constancia de participación en congreso de la Sociedad Química de México. “Estudio en la caracterización de Tequila 100% agave y sus clases por técnicas electroquímicas empleando electrodos de óxido de grafeno”

**UADY**  
UNIVERSIDAD  
AUTÓNOMA  
DE YUCATÁN

**Sociedad Química de México, A. C.**  
otorga la presente

**CONSTANCIA**

a

**Walter M. Warren-Vega, Rocío Fonseca-Aguñaga, Linda V. González-Gutiérrez, Luis A. Romero-Cano**

por su participación presentando el Trabajo Profesional en Modalidad Cartel Virtual titulado

**Estudio en la caracterización de Tequila 100% agave y sus clases por técnicas electroquímicas empleando electrodos de óxido de grafeno.**

**CISQM-SC-CP04**

en el Marco de las Actividades del  
**Congreso Internacional de la Sociedad Química de México 2022,**  
**“Una Química: Muchas Voces”**

29 de agosto al 2 de septiembre de 2022  
Mérida, Yucatán, México.

**Dr. David Quintanar Guerrero**  
Presidente Nacional Electo  
Presidente de Congresos  
Sociedad Química de México, A.C.

**M. en C. Wendy Fanny Brito Loeza**  
Presidente del Comité Organizador Local CISQM 2022  
Pro-secretaría, Comité Ejecutivo Nacional  
Sociedad Química de México, A.C.

**Dr. Alfonso Ramón García Márquez**  
Cordinador del CISQM2022  
Tesorero, Comité Ejecutivo Nacional  
Sociedad Química de México, A.C.

**SOCIEDAD QUÍMICA DE MÉXICO, A.C.**  
"La química nos une"