



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

Determinación de cobre en mezcal por microextracción
líquido-líquido dispersiva y espectrofotometría de
absorción atómica de llama

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO INDUSTRIAL**

P R E S E N T A:

HECTOR URIEL ROSAS SANTIAGO

DIRECTOR DE LA TESIS:

DR. JOSÉ DE JESÚS OLMOS ESPEJEL

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO

2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: DRA. MARIA DEL CARMEN VALDERRAMA BRAVO
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de tesis y examen profesional.**

Determinación de cobre en mezcal por microextracción líquido-líquido dispersiva y espectrofotometría de absorción atómica de llama.

Que presenta el pasante: **Héctor Uriel Rosas Santiago**

Con número de cuenta: **418064391** para obtener el título de: **Licenciado en Química Industrial.**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 02 de Agosto de 2022.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez	
VOCAL	M.I. Alejandra Angel Viveros	
SECRETARIO	Dr. José de Jesús Olmos Espejel	
1er. SUPLENTE	Q.F.B. José Arturo Martín Tereso	
2do. SUPLENTE	M. C. Gabriel Israel Nava Nabte	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional

MCVB/cga*

Agradecimientos

A Dios:

*por permitirme lograr con vida, salud y amor una vez más un objetivo de mi vida
cumpliéndolo hasta su fin.*

A mis papás, Héctor y Vianney:

*por apoyarme siempre con su amor y tiempo en una más de mis locuras.
Los amo.*

A mis perr-hijos, el Cirilo y el Rufino:

*por siempre estar conmigo pese a todo lo que me sucede en la vida y por su compañía en
todo momento, su afecto y fidelidad.*

A “la” Paty y a “la” Shalma, mis amigas, compañeras de equipo y “alumnas”:

*agradezco mucho haber estado ahí para mí, así como yo para ustedes. Hicieron mi
estancia en la universidad algo tranquilo/preocupante y divertido. Por favor, ya no
rompamos más material y disculpen por tanto regaño por las “manos de chango”;
yo también las tengo.*

A Ilse:

*Por llegar a mi vida en un momento muy caótico, por aguantarme en mis peores
momentos; por apoyarme siempre y jamás soltarme; por darme paciencia y ayudarme a
ver mis “pequeños” defectos para poder ser un mejor humano. Por enseñarme que siempre
hay bondad y que los problemas son temporales, solo hay que tener fuerza para salir de
ellos.*

Al Dr. Jesús Olmos:

*por ser mi maestro, asesor, compañero y amigo, el cual me ha enseñado de diversas
maneras verme proyectado de forma profesional y personal. Gracias por compartirme sus
conocimientos, historias y anécdotas. Espero verlo en la maestría.*

A la Química Analítica:

*que sin ella no me hubiera dado cuenta de lo que realmente soy bueno y lo que me gusta
profesionalmente.*

A mis compañeros del laboratorio L-112/L12, Omar, Liliana, Evelyn, Sonia y Diego,

quienes me hicieron más amena la estancia en el laboratorio.

A la UNAM y la FESC:

*las cuales me brindaron la oportunidad de complementar mi formación y de “adoptarme”
pese a ser un “fóraneo” de otra institución. Gracias por ser mi segunda casa de estudios.*

Agradecimientos

A la DGAPA-UNAM por el financiamiento otorgado al proyecto PAPIME (PE208921) y por la beca otorgada.

A la FES Cuautitlán por el apoyo al proyecto PIAPIME ID 1.12.18.21.

A los miembros del jurado por su tiempo dedicado para la revisión, aportaciones y observaciones realizadas para el enriquecimiento de este trabajo.

~~Al COVID-19, por ayudarme a dar cuenta lo vulnerable que se puede ser ante un encierro y que todos necesitamos de alguien y que la salud mental es más importante que lo que se plantea.~~

DEDICATORIA.

A Dios, por darme vida para poder lograr todo lo que me proponga siempre.

A mis padres quienes me aman y me apoyan siempre en todo lo que haga.

A mis amigas, Paty y Shalma, por siempre estar cuando más las necesito.

A Ilse, por ayudarme a ver de forma muy diferente las cosas y por ser mi apoyo incondicional.

Dedicado principalmente a Uriel, el niño pequeño y tímido de 6 a 10 años, que nunca pensó que crecería hasta convertirse en lo que es hoy en día y en lo que aspira a ser. Además de mi yo de hace 5 años, que tenía más dudas que respuestas y pensó que no sabía nada. Ambos estarán orgullosos de lo que paso en 5 años y que se probaron a sí mismos para sobresalir y convertirse en alguien de bien.

Confía/Confíen siempre en ti/ustedes.

“Si no puedes volar, corre. Si no puedes correr, camina. Si no puedes caminar, gatea. Pero hagas lo que hagas, siempre sigue hacia adelante”.

Martin Luther King.

“Vuela alto Buzz, al infinito y más allá”.

Toy Story & Ligthyear.

“No hay decisiones buenas o malas... solamente decisiones”.

Octavio A. Ordoñez, Lección de vida.

“No hay luz sin oscuridad”.

“Siempre has sabido la respuesta [busca en tu corazón]”.

Ilse Miranda, Lección de vida.

El presente trabajo se desarrolló en los laboratorios L-112 y L-113 de la Sección de Química Analítica en Campo 1 de la FES Cuautitlán.

Parte de este trabajo se presentó en los siguientes eventos:

1^{er} Congreso Iberoamericano de Ciencia, Educación y Tecnología, organizado por la FES Cuautitlán - UNAM del 7 al 10 de diciembre del 2021, presentado en línea en modalidad cartel (mini-video), obteniendo mención honorífica.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	i
1. INTRODUCCIÓN	1
2. RESUMEN	3
3. ANTECEDENTES	5
3.1. Mezcal.	5
3.1.1. <i>Proceso de elaboración del mezcal.</i>	5
3.1.2. <i>Tipos de mezcal.</i>	10
3.1.3. <i>Composición química del mezcal.</i>	12
3.1.4. <i>Importancia del mezcal.</i>	13
3.2. Cobre, propiedades y toxicidad.	14
3.3. Normatividad para el contenido de cobre en bebidas alcohólicas.	16
3.4. Metodologías para la determinación de cobre en bebidas alcohólicas.	19
3.5. Microextracción líquido-líquido dispersiva.	20
3.6. Análisis de muestras en fase orgánica por espectrofotometría de absorción atómica.	28
4. OBJETIVOS	30
4.1. Objetivo general.	30
4.2. Objetivos particulares.	30
5. METODOLOGÍA	31
5.1. Materiales.	31
5.2. Equipo e instrumentación.	32
5.3. Preparación de estándares.	32
5.4. Optimización de la introducción de muestra en fase orgánica en el sistema de espectrofotometría de absorción atómica.	34
5.5. Evaluación del sistema espectrofotométrico.	35
5.5.1. <i>Linealidad.</i>	35
5.5.2. <i>Repetibilidad.</i>	35
5.5.3. <i>Límites de detección y cuantificación.</i>	36
5.6. Determinación de los volúmenes de reactivos y muestra óptimos.	36
5.7. Miniaturización de la extracción.	37

5.8. Desempeño del método miniaturizado.	38
5.8.1. <i>Linealidad.</i>	38
5.8.2. <i>Efecto matriz.</i>	39
5.8.3. <i>Recobro.</i>	39
5.8.4. <i>Repetibilidad.</i>	39
5.8.5. <i>Límites de detección y cuantificación.</i>	39
5.9. Análisis de muestras de mezcal.	40
6. RESULTADOS Y ANÁLISIS	41
6.1. Optimización de la introducción de muestra en fase orgánica en el sistema de espectrofotometría de absorción atómica de llama.	41
6.2. Evaluación del sistema espectrofotométrico.	43
6.3. Determinación de los volúmenes de reactivos y muestra óptimos.	44
6.4. Miniaturización de la extracción.	47
6.5. Desempeño del método miniaturizado.	51
6.6. Análisis de muestras de mezcal.	58
7. CONCLUSIONES	61
8. PERSPECTIVAS	62
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
ANEXOS	72
Anexo I. Gráficos obtenidos.	72
Anexo II. Comparación de parámetros de desempeño de los métodos de extracción desarrollados.	74
Anexo III. Ejemplos de cálculo de concentración de Cu en mezcal por el método desarrollado.	75
Anexo IV. Constancias obtenidas para el presente trabajo.	77

ABREVIATURAS

%RSD	Coefficiente de Variación
DDTC	Dietilditiocarbamato de sodio
DD	Disolvente de Dispersión
DE	Disolvente de Extracción
EAA-LL	Espectrofotometría de Absorción Atómica de Llama
ELL	Extracción Líquido-Líquido
ELLD	Extracción Líquido-Líquido Dispersiva
FDA	Administración de Alimentos y Drogas
LC	Límite de Cuantificación
LD	Límite de Detección
MEK	Metil-etilcetona
MELLD	Microextracción Líquido-Líquido Dispersiva
NOM	Norma Oficial Mexicana
oct	1-octanol
WHO/OMS	Organización Mundial de la Salud

1. INTRODUCCIÓN

El mezcal es una bebida alcohólica mexicana obtenida por la destilación de jugos fermentados de cabeza de agave maduras cocidas, la cual se encuentra protegida por Denominación de Origen para 9 estados de la República Mexicana y en la actualidad es considerado como uno de los productos representativos de México a nivel internacional -por detrás del tequila- con alta demanda en mercados nacionales y extranjeros. Su producción se efectúa por diversos procedimientos dependiendo de la región en la que se fabrica y está ligada con la tecnología involucrada en ésta, obteniéndose una gama amplia de categorías y clases del producto. Generalmente la fabricación de mezcal se divide en 6 etapas: preparación, cocimiento, molienda, fermentación, destilación y ajuste del grado alcohólico.

La composición química -orgánica e inorgánica- de cada categoría y clase de mezcal dependerá desde factores ecológicos (tipo de suelo, especie de agave, clima, ubicación), de proceso (tipo de agua de riego y alimentación, condiciones de fermentación, microorganismos involucrados, materiales y equipamiento empleado) y de tipo antropogénico (usos y costumbres de la población productora).

El cobre (Cu) es un metal de transición que se encuentra distribuido de forma ubicua en cualquier ambiente y posee una variedad de usos en cualquier estado de oxidación (Cu^0 , Cu^+ , Cu^{+2}), desde la elaboración de utensilios y equipo necesarios en el procesamiento de alimentos y bebidas hasta el uso para el control de enfermedades en plantas. Este es un oligoelemento esencial en reacciones bioquímicas en seres vivos; en humanos se relaciona con una variedad de enzimas metabólicas. El exceso de ingesta de cobre provoca manifestaciones gastrointestinales, hematológicas, hepáticas, renales, hepatocerebrales y enfermedades neurodegenerativas.

Las directrices normativas de inocuidad y calidad en materia de bebidas alcohólicas -de forma nacional como internacional- catalogan al metal cobre como un contaminante que solo tiene importancia en la calidad del producto y no como contaminante tóxico en alimentos, debido a que es un elemento necesario dentro de los requerimientos nutricionales y no posee significancia para la protección de la salud pública, hasta que alcanza niveles de acumulación tóxica por sobreingesta. La concentración máxima permitida de cobre en bebidas alcohólicas por dichas directrices alcanza valores de hasta 3.5 mg/L (*Food Code*, 2017; NOM-070-SCFI-2016).

La técnica espectrofotometría de absorción atómica de llama es la más empleada en análisis de iones metálicos a niveles traza por su selectividad, tolerancia a interferencias y simplicidad de instrumentación, pero la determinación directa en bebidas alcohólicas es difícil por el efecto matriz de la muestra, directamente relacionada con su alto contenido alcohólico; otras técnicas instrumentales, como espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente, proporcionan límites de detección adecuados para el manejo de la muestra directa, no obstante su instrumentación es costosa y requiere de demasiado tiempo e insumos para el procesamiento de la muestra.

La microextracción líquido-líquido dispersiva es una técnica de preparación de muestra y de preconcentración que se basa en la extracción líquido-líquido a escala miniaturizada. Es una técnica simple, de bajo costo, alta recuperación y tiempos cortos de análisis, y su aplicación se ha descrito en el análisis de iones metálicos en diferentes tipos de muestras.

En los Antecedentes del presente trabajo, se muestra una investigación documental amplia sobre *a)* el mezcal -la muestra de interés-, el proceso de su producción, sus tipos y clases, la composición química y se expone su importancia de este producto; *b)* cobre -el analito por analizar-, sus usos, propiedades fisicoquímicas y toxicidad asociada; *c)* la normatividad referente al contenido del analito de estudio en bebidas alcohólicas y *d)* descripción y fundamento de las técnicas de preparación de la muestra e instrumentales empleadas en este trabajo. Además, un compendio de las metodologías actuales usadas para el análisis de cobre en bebidas alcohólicas.

En posteriores apartados se plantean los objetivos con el fin de delimitar el alcance y las metas que pretende el presente trabajo; asimismo en el apartado de *Metodología*, se presenta los materiales, reactivos, equipos e instrumentos utilizados, así como la descripción de las actividades realizadas para la introducción de disolventes orgánicos en el sistema de espectrofotometría de absorción atómica, el establecimiento de las cantidades de reactivos y muestra óptimos para la extracción y su miniaturización, y el análisis de muestras de mezcal por los métodos propuestos.

Por último, en los apartados finales se expone los resultados obtenidos y su análisis de estos, las conclusiones a las cuales se llegaron con este trabajo, así como las perspectivas con las cuales se pudieran plantear futuros trabajos derivados de esta tesis.

2. RESUMEN

La microextracción líquido-líquido dispersiva (MELLD) es una técnica de preconcentración novedosa y eficiente que utiliza un sistema de disolventes de componentes ternarios y en la actualidad ha recibido especial atención debido a su simplicidad, bajo costo, alta recuperación, alto índice de concentración de los analitos y tiempos cortos de preparación de la muestra. Se ha utilizado para determinar una amplia variedad de compuestos orgánicos e inorgánicos en diferentes matrices, incluidas muestras clínicas, forenses, alimentarias y ambientales.

El mezcal es una bebida alcohólica destilada obtenida por la fermentación alcohólica de mostos de agave y/o maguey con Denominación de Origen para nueve estados de la República Mexicana. La producción de la mayoría de los mezcales es considerada como un proceso rudimentario y varía de región en región, sin embargo, de forma general el proceso posee las siguientes etapas: cocción, molienda, fermentación y destilación, en esta última comúnmente se emplean alambiques, los cuales en su mayoría están hechos de cobre.

El cobre, en forma de iones cúpricos, presente en niveles traza en bebidas alcohólicas destiladas proviene mayoritariamente de la corrosión de utensilios, equipamiento y/o revestimientos de cobre metálico usados en la etapa de destilación que están en contacto directo con la bebida alcohólica; este ion metálico es considerado como indicador de inocuidad y de calidad, ya que puede modificar algunas de las propiedades del producto final.

El objetivo del trabajo fue establecer los parámetros óptimos para la MELLD en la extracción de Cu(II) en diferentes categorías de mezcal y su cuantificación por espectrofotometría de absorción atómica de llama como un método alternativo.

Se establecieron como condiciones óptimas para la MELLD utilizar 7.0 mL de muestra, 1.0 mL de DDTC 1.5% (m/v) y para efectuar la extracción inyectar 3.0 mL de una mezcla de CCl₄:MeOH en proporción 23:77 (v/v). Para la introducción de fase orgánica al sistema de EAA-LL, se evaporó 500 µL del disolvente de extracción a temperatura ambiente y se resuspendió con el mismo volumen de MEK. Para su introducción en el instrumento se empleó una alícuota de 50 µL de quelato en MEK y se mezclaron con 150 µL de 1-octanol.

El desempeño del método mostró una buena linealidad con un coeficiente de determinación (r^2) de 0.9938 y una buena repetibilidad con %RSD (n=3) de 1.49%. Los límites de detección y de cuantificación fueron de 0.14 y 0.45 $\mu\text{g Cu/mL}$ mezcal, respectivamente. No se observó efecto matriz en la cuantificación de Cu en diferentes muestras de mezcal y el recobro del método fue de 106.14% evaluado a seis niveles de concentración.

3. ANTECEDENTES

3.1. Mezcal.

Etimológicamente la palabra “mezcal”, tiene sus raíces en los vocablos de lengua náhuatl *metl* (agave) e *ixcalli* (cocido), que en conjunto significa *mexcalli* o “agave cocido” (CDI, 2015). Con base a la definición establecida en la norma Oficial Mexicana NOM-070-SCFI-2016, “Bebidas Alcohólicas-Mezcal- Especificaciones”, el mezcal es una bebida alcohólica destilada mexicana obtenida por la destilación de jugos fermentados, con microorganismos espontáneos o cultivados, extraídos de cabezas maduras de magueyes o agaves cocidos y cosechados en el territorio comprendido por la zona geográfica de la República Mexicana protegida por Denominación de Origen.

La producción de esta bebida se establece en casi todos los lugares de México donde se cultive una o varias especies de agaves, sobresaliendo las especies *Agave angustifolia*, *A. cupreata*, *A. salmiana*, *A. potatorum* y *A. inaequidens*. Sin embargo, al ser un producto con Denominación de Origen, la ubicación geográfica del cultivo de agave y su producción de la misma se limita a nueve estados de México (Zacatecas, Durango, Guerrero, Michoacán, San Luis Potosí, Puebla, Guanajuato, Tamaulipas y Oaxaca) (Hernández López, 2017; SEGOB-SE, 2015). Así mismo, se ha convertido en un promotor del desarrollo económico en diversas zonas marginadas del país brindando oportunidades al sector productivo, principalmente a pequeños productores al proporcionar trabajo arraigado en el territorio, fortaleciendo la identidad cultural y las tradiciones de las diferentes regiones donde se cultiva la materia prima y se produce, además de dar protección al consumidor de un producto auténtico y de calidad (SEGOB- IMPI, 2018).

3.1.1. *Proceso de elaboración del mezcal.*

La elaboración de mezcal dentro de las regiones geográficas protegidas por la Denominación de Origen se realiza mediante diversos procedimientos y depende esencialmente de la región en la que se fabrica, la cual está estrechamente ligada con la tecnología involucrada en su producción, así como del agave y/o maguey empleado y de las tradiciones culturales que son transmitidas de generación en generación, por lo que es difícil establecer un proceso único y estandarizado de producción (Bautista & Ramírez, 2008; CDI, 2015; González Vizuet, 2017).

En la figura 1 se muestran las seis fases del proceso de elaboración del mezcal, las cuales comparte con la fabricación del tequila (SEGOB-SRE, 2011; Pérez Hernández, *et al.*, 2016; Gschaedler Mathis *et al.*, 2020).



Fig 1. Infografía sobre las etapas de producción de mezcal (SEGOB- SRE, 2016).

El proceso de producción inicia realizando el cultivo de una o varias especies de agave que es considerado como materia prima; el agave es una planta de la familia de las amarilidáceas, de hojas largas y fibrosas de forma lanceolada, de color verde azulado, se aprovecha el tallo y la base de sus hojas (llamadas coloquialmente “cabeza” o “piña”) para la elaboración de mezcal y además es considerado como un recurso forestal no maderable susceptible de explotación (SEGOB-SRE, 2015; Gschaedler Mathis *et al.*, 2020). El cultivo de agave es plurianual (cultivo que requiere varios años en dar fruto) y requiere de una aportación suficiente de nutrientes minerales y orgánicos del suelo y de una aplicación de agua adecuada -poco riego con regularidad y depende de la estación del año- para alcanzar altos rendimientos (traxco.es, 2016).

Esta etapa inicial continua con la selección de agaves que cuenten con la madurez requerida, asociada con la edad de la planta, siendo la edad óptima entre 6 y 28 años. Posteriormente la planta se deja en el campo de 6 a 12 meses antes de cosecharlo con el propósito de que el órgano vegetal de interés acumule la mayor cantidad de azúcares posibles. La cosecha de los agaves maduros se realiza de manera manual, para lo cual se cortan las hojas perimetrales del agave de forma *in situ*, dejando expuesta la “piña” (Gschaedler Mathis *et al.*, 2020; Scheinvar Gottdiener, 2017), como se muestra en la figura 2.



Fig 2. Cosecha de agave maduro y corte de hojas *in situ* (Scheinvar Gottdiener, 2017).

Las “piñas” de agave son sometidas al proceso de cocimiento en hornos de subsuelo, en hornos verticales de mampostería, hidrolizadores o en autoclaves con el fin de ablandar el material vegetal para facilitar la molienda, así como catalizar la hidrólisis de polisacáridos en la formación de azúcares asimilables por los microorganismos responsables de la fermentación y generar compuestos volátiles importantes que dan las características aromáticas del producto final, principalmente aromas ahumados (SEGOB-SRE, 2015; Pérez Hernández, *et al.*, 2016; Gschaedler Mathis *et al.*, 2020).

El siguiente proceso es la molienda, la cual tiene como objetivos disminuir el tamaño de la “cabeza” de agave cocido y la obtención de jugos de agave ricos en azúcares, facilitando la etapa de fermentación. Este proceso implica operaciones unitarias del uso de diferentes tipos de molinos o desgarradoras que funcionan a base de un motor eléctrico o de combustible, de forma manual o usando tahona (molino que funciona por la fuerza de caballos o mulas). Como producto final de esta etapa se obtiene el jugo o “miel” llamado mosto y las fibras vegetales conocidas como bagazo, donde generalmente el primero es depositado o bombeado a las tinas de fermentación (Gschaedler Mathis *et al.*, 2020).

La fermentación constituye el proceso crucial en la elaboración del mezcal y en esta etapa actúan microorganismos de metabolismo fermentativo, en particular levaduras, donde transforman parte de los azúcares en alcohol -principalmente etanol-, además de la transformación de otros compuestos importantes que dan ciertas características organolépticas del producto final (Pérez Hernández, *et al.*, 2016).

Cabe señalar que en la fermentación se añade agua o algún(os) otro(s) microorganismo(s) fermentativo(s) para completar la fermentación, sin embargo, la fermentación comúnmente se efectúa con la microbiota asociada a la “cabeza” de agave a temperatura controlada; no se adiciona ninguna otra sustancia química que pudiera acelerar el proceso. El tiempo promedio del proceso de fermentación es de 9 días. Diferencias de equipo y material del que están hechos los recipientes empleados (tinajas de madera, pilas forradas de madera, piedra o cemento, tanques de acero inoxidable o rústicamente empleando pieles curtidas de animales como res) puede influir en la prolongación o reducción de los tiempos de fermentación. Al fermento se le conoce como mosto muerto y tiene una graduación alcohólica entre 6 a 7% (v/v) (SEGOB-SRE, 2015; Gschaedler Mathis *et al.*, 2020).

La etapa de destilación consiste en calentar el mosto muerto hasta su temperatura de ebullición y condensar sus vapores generados, separando los compuestos volátiles de los no volátiles en función de su temperatura de ebullición. Para esta etapa se utilizan diferentes tecnologías como ollas de barro, montera de barro o madera, alambiques o de forma industrial se utilizan destiladores (SEGOB-SRE, 2015). Generalmente se emplea alambiques -un implemento rústico basado en el sistema traído por los españoles a América-, el cual consiste de tres partes:

- a) un cazo de cobre de capacidad aproximada de 250 litros en donde se pone a calentar a ebullición el mosto fermentado;
- b) un cono de madera, el cual se coloca arriba del cazo, cuya función es de columna de destilación y
- c) un segundo cazo de cobre, que se mantiene permanentemente con agua fría colocado en la parte superior del cono y su fin es condensar los vapores (Gschaedler Mathis *et al.*, 2020).

En la figura 3 se muestran ejemplos de los alambiques de cobre. Algunos de los productores de mezcal han optado por cambiar el material de los cazos del alambique por acero inoxidable conservando el proceso para mejorar la inocuidad de su producto (González Vizuet, 2017). La manera en la que se suministra calor al sistema de destilación es mediante vapor de agua -en procesos tecnificados- o a fuego directo en condiciones rústicas (Gschaedler Mathis *et al.*, 2020).



Fig 3. Alambiques artesanales de cobre y cobre-madera (destiladoresdecobre.com.mx, 2020; Coppel, 2018).

El producto obtenido posterior a la etapa de destilación tiene de 20 a 40% (v/v) de etanol, por lo que se efectúa una segunda destilación con la finalidad de elevar su contenido en etanol a 45 a 60% (v/v); a este proceso se le denomina rectificación. Para el ajuste de la cantidad de etanol del producto se efectúan diversos métodos, siendo el más común en los procesos artesanales la mezcla de las “puntas” -parte del destilado con mayor riqueza en etanol- y las “colas” -parte del destilado con menor riqueza en etanol- de la destilación mezcal rectificado, lo que hace cumplimiento de las especificaciones establecidas de la NOM-070-SCFI-2016 referente al volumen de alcohol étlico (35 a 55% v/v) (SEGOB-SRE, 2015; González Vizuet, 2017).

En la actualidad la fabricación de mezcal se ha convertido en un proceso industrializado respecto a las etapas de cocción, fermentación y destilación en la migración de nuevas tecnologías en las operaciones unitarias necesarias en estas etapas, haciendo que el producto final cumpla con los requisitos mínimos de buenas prácticas de higiene con el fin de evitar la contaminación de tipo física, química y microbiológica, además del análisis de peligros y puntos críticos de control (HACCP, por sus siglas en inglés) a lo largo del proceso cumpliendo con la normativa NOM-251-SSA1-2009 “Prácticas de higiene para el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios” (Bautista & Ramírez, 2008; NOM-070-SFCI-2016).

3.1.2. Tipos de mezcal.

Las características organolépticas descritas hacia esta bebida alcohólica muestran de forma general que es un líquido de olor y sabor *sui generis*, incoloro o ligeramente amarillento cuando es reposado o añejado, o cuando se aboque (adición de uno o más productos naturales, saborizantes, edulcorantes y/o aromatizantes permitidos por el acuerdo por el que se determinan los aditivos y coadyuvantes en alimentos, bebidas y suplementos alimenticios) para suavizar el sabor sin reposarlo o añejarlo (NOM-070-SCFI-2016; SEGOB-SRE, 2011). El carácter y las sensaciones organolépticas producidas para cada mezcal dependen principalmente de la región, lo cual hace referencia a factores antropogénicos tales como los usos y costumbres, antecedentes históricos y contexto socioeconómico de cultivo de agave y/o maguey y su proceso de elaboración, así como de factores ecológicos -tipo de suelo, especie de agave y/o maguey empleada, topografía, clima, tipo de agua empleada durante todo el proceso y tipo(s) de microorganismo(s) involucrado(s) en el proceso de fermentación- (NOM-070-SCFI-2016; Hernández López, 2017).

De acuerdo con la gran variedad de factores que dependen la elaboración del mezcal, la normatividad mexicana antes mencionada agrupa al mezcal en tres categorías con base al cumplimiento de las propiedades del proceso utilizado de cocción del maguey y/o agave, molienda, fermentación y destilación (Hernández López, 2017):

a) *Mezcal*: hace referencia a la bebida obtenida donde las etapas de cocción, molienda y fermentación no son relevantes en su procedimiento y equipamiento, siendo la etapa de destilación el empleo de un proceso tecnificado que lo optimice.

Siendo los hornos de pozo, hornos de mampostería o autoclave usados en la etapa de cocción; la tahona, molino chileno, molino egipcio, trapiche, desgarradora, tren de molinos o difusor como equipamiento empleado en la fase de molienda. Para efectuar la fermentación se emplean recipientes de madera, piletas de mampostería o tanques de acero inoxidable y alambiques o destiladores continuos de cobre o acero inoxidable en la etapa de destilación.

b) *Mezcal artesanal*: en esta categoría hace alusión a una bebida la cual se efectúa en la etapa de cocción de forma rústica empleando hornos de pozo u hornos elevados de mampostería; en la etapa de molienda el equipamiento necesario son molino de mazo, tahona, molino chileno o egipcio, trapiche o máquina desgarradora.

Se emplean en la etapa de fermentación oquedades de piedra, suelo o tronco, en piletas de mampostería, recipientes de madera o barro, pieles de animales; por último, la destilación se efectúa a fuego directo en alambiques de caldera de cobre u olla de barro y montera de barro, madera, cobre o acero inoxidable. Generalmente en las dos últimas etapas se incluyen los sólidos obtenidos de la molienda (fibra o bagazo de maguey y/o agave) dentro de los procesos.

c) *Mezcal ancestral*: es una bebida que en la etapa de cocción sólo se puede realizar en hornos de pozo; en la molienda se pueden emplear molinos de mazo, chileno o egipcio y tahona como equipo, y la destilación es efectuada en olla de barro y montera de barro o madera a fuego directo. La fermentación es igual a la establecida para la categoría de mezcal artesanal.

Para cada categoría de mezcal no es de importancia la especie de maguey y/o agave empleado, sea silvestre o cultivado, pero es de importancia que la materia prima se encuentre en una etapa madura y que su desarrollo biológico esté comprendido en el área geográfica protegida por la Denominación de Origen (NOM-070-SCFI-2016).

La misma normatividad clasifica a esta bebida de acuerdo con las características adquiridas en procesos posteriores a la destilación en 6 clases:

- i. *Mezcal joven (o blanco)*: producto incoloro y translúcido que no está sujeto a ningún proceso posterior.
- ii. *Mezcal madurado en vidrio*: es un mezcal estabilizado en recipiente de vidrio más de 12 meses, bajo tierra o en espacio con variaciones mínimas de luminosidad, temperatura y humedad.
- iii. *Mezcal reposado*: bebida que debe permanecer de 2 a 12 meses en recipientes de madera sin restricción de tamaño, forma y capacidad que garantice su inocuidad, conservado en un espacio con variaciones mínimas de luminosidad, temperatura y humedad para su estabilización.
- iv. *Mezcal añejo*: producto sujeto a un proceso de maduración de por lo menos un año, en recipientes de madera de roble blanco o encino con capacidad menor a 1,000 L, que garantice su inocuidad, conservado en un espacio con variaciones mínimas de luminosidad, temperatura y humedad.
- v. *Mezcal abocado con*: mezcal al que se incorporan directamente ingredientes para adicionar sabores, tales como gusano de maguey, damiana, limón, miel, naranja, manto, entre otros, siempre que estén autorizados por la normatividad referente a aditivos y coadyuvantes en alimentos, bebidas y suplementos alimenticios.
- vi. *Mezcal destilado con*: bebida que debe destilarse con ciertos ingredientes para incorporar sabores, tales como pechuga de pavo o pollo, conejo, mole, ciruelas, entre otros.

3.1.3. *Composición química del mezcal.*

La composición química, y por ende el perfil organoléptico, de cada categoría y clase de mezcal dependerá de la suma de varios factores, desde el tipo de suelo del cultivo, la especie de agave cultivado y empleado, condiciones climáticas, ubicación geográfica, tipo de agua de riego y de alimentación, condiciones de fermentación, microorganismos fermentativos involucrados, materiales y equipamiento empleado durante el proceso de producción, ingredientes empleados para los procesos de abocado y destilado, además de los usos y costumbres de la población productora de la región.

Se han identificado componentes de tipo orgánico en el mezcal y se han agrupado en especies químicas como acetales, ácidos orgánicos, alcoholes simples, alcoholes superiores, cetonas, aldehídos, ésteres, fenoles y terpenos, existiendo en mayor concentración y abundancia alcoholes, ésteres y ácidos orgánicos (De León-Rodríguez *et al.*, 2006; Molina Guerrero *et al.*, 2007; Vera-Guzmán *et al.*, 2016); mientras que los compuestos inorgánicos se han centrado en la búsqueda de cationes metálicos como aluminio (Al), bario (Ba), calcio (Ca), cobre (Cu), hierro (Fe), magnesio (Mg), manganeso (Mn), potasio (K), sodio (Na), estroncio (Sr), zinc (Zn), (Ceballos-Magaña, *et al.*, 2009), plomo (Pb) y arsénico (As) (NOM-070-SCFI-2016), así como azufre (S) y nitrógeno (N) (Ceballos-Magaña *et al.*, 2016; De los Ríos-Deras *et al.*, 2015).

3.1.4. Importancia del mezcal.

Históricamente la industria del mezcal se originó desde el siglo XVI, considerándose como una producción artesanal y social que se desarrolló colectivamente, por lo que el uso de materias primas, métodos de elaboración y rúbricas de evaluación de la calidad se construyeron comunitariamente durante cientos de años (SEGOB-SRE, 2016). Tras la declaración general de la protección de la Denominación de Origen del mezcal, en los últimos años se ha gestionado en impulsar fuertemente a esta industria mediante la creación de la norma oficial mexicana referente a las especificaciones y calidad del mezcal, la creación del Consejo Regulador del Mezcal, así como la Cámara Nacional de la Industria del Mezcal, ofreciendo buenas proyecciones del producto para su exportación. (SEGOB, 1994; SEGOB, 2018; SEGOB-SRE, 2011; mezcal.org, 2021).

El mezcal es considerado como uno de los productos más representativos de México a nivel internacional -por detrás del tequila-. Por su carácter artesanal y su variedad de presentaciones se ha convertido en una bebida altamente demandada en mercados nacionales y extranjeros, siendo los principales países de exportación Estados Unidos, Inglaterra, Alemania, Francia, España, Italia, Australia y Chile (SEGOB-SRE, 2015; SEGOB-SE, 2015). Con base al crecimiento de la demanda comercial internacional de esta bebida, se han incrementado el número de potenciales socios comerciales para México, ampliando las oportunidades de exportación (SEGOB-SAGARPA, 2017).

La industria de bebidas alcohólicas espirituosas del agave -principalmente tequila y mezcal- constituye la segunda actividad económica de mayor importancia respecto a las bebidas alcohólicas, representando el 18.6% de la producción bruta total, de los cuales aproximadamente el 13.0% corresponde a la industria productora de mezcal (SEGOB- SAGARPA, 2017; INEGI, 2019). En 2018 se reportó que las exportaciones de mezcal fueron de 7,125 miles de litros que representaron 53 millones de dólares (INEGI, 2019) y se estima que para el 2030 la producción de agave destinado para la elaboración de mezcal incremente de 208.12 MTon a 224.75 MTon (SEGOB-SAGARPA, 2017).

El comercio nacional e internacional del mezcal da un panorama favorable para el incremento del desarrollo económico en las comunidades productoras, las cuales mayoritariamente son marginadas y pobres, propiciando el aumento de ingresos de las personas que participan en el sistema de producción, además de la posibilidad de inversión hacia nuevas tecnologías que permitan hacer un mejor manejo agronómico y que en temas de inocuidad sean óptimos, ya que uno de los principales obstáculos técnicos para el comercio internacional de este producto es cumplir con los criterios de inocuidad alimentaria establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS), por lo que establecer especificaciones fisicoquímicas de bebidas alcohólicas destiladas, tales como límites máximos permitidos, facilite su comercialización internacional (Fonseca Varela & Chalita Tovar, 2021; SEGOB-SAGARPA, 2017).

3.2. Cobre, propiedades y toxicidad.

El cobre (Cu) es un metal de transición que es estable en su estado metálico (Cu^0) y forma cationes monovalentes (Cu^+ , cuprosos) y divalentes (Cu^{+2} , cúpricos), y se encuentra distribuido de forma ubicua en rocas, suelo, agua y aire (PubChem, 2022a).

Posee distintas características dependiendo en el estado de oxidación en que se encuentre; en su forma metálica su color es rojizo, posee brillo, es maleable, dúctil y un buen conductor de calor y electricidad, soporta la corrosión causada por el aire, humedad y agua de mar, y de forma catiónica puede impartir un color azul claro o azul verdoso, sabor amargo y sensación metálica disuelto en agua. (PubChem, 2022b; WHO, 2004).

Este elemento posee una alta gama de usos debido a su versatilidad y a sus propiedades. El cobre metálico se emplea para fabricar materiales eléctricos, materiales usados en el manejo y distribución de redes de agua potable (tuberías, válvulas pipas, etc.), accesorios y joyería, monedas, utensilios y equipo en la elaboración de alimentos y bebidas, además de ciertos materiales de construcción y revestimientos. En este estado de oxidación puede formar aleaciones para fortalecer sus propiedades de dureza y anticorrosión, dentro de las cuales destacan el bronce (combinación hasta un 25% en el contenido con estaño) y latón (aleación de 5 hasta 45% del contenido en zinc) (PubChem, 2022a; 2022b).

De forma catiónica, el ion cúprico es el estado de oxidación más común en medio acuoso y se emplea como fungicidas, alguicidas, insecticidas, conservantes de madera y en galvanoplastia; en agricultura para el tratamiento de enfermedades de plantas y en el tratamiento del agua; también en la fabricación de tintes azoicos, grabado, litografía, refinación de petróleo y pirotecnia. Los compuestos iónicos de cobre se pueden añadir a fertilizantes, piensos para animales y como aditivo alimentario como un nutriente para apoyar el crecimiento de plantas y animales (FDA, 1994; Landner & Lindstrom, 1999; ATSDR, 2004).

El cobre es un oligoelemento esencial para numerosas reacciones bioquímicas en plantas y animales, incluidos los humanos; en estos últimos este oligoelemento está relacionado con enzimas tales como la citocromo oxidasa -implicada en el sistema de transporte de electrones en el acoplamiento de adenosintrifosfato (ATP)-, en la actividad de la enzima dopamina monooxigenasa -necesaria para la actividad neuronal y la transmisión de impulsos nerviosos-, como parte esencial en la reacción de eliminación de radicales libres catalizada por la enzima superóxido dismutasa y componente de la enzima ceruloplasmina que cataliza la reacción de óxido-reducción con los iones hierro para su asimilación en el organismo (Gorman & Boosalis, 2019); el metabolismo del ion cúprico se efectúa vía hepática y se recomienda un consumo de 850 a 900 µg por día para adultos (Lewis, 2019).

Los síntomas clínicos por deficiencia de cobre en humanos son numerosos y engloba manifestaciones hematológicas (anemia, leucopenia y pancitopenia) y óseas (osteoporosis, fracturas o malformaciones). En este tipo de casos son mayormente reportados en lactantes, en niños malnutridos o en personas con síndromes de mala absorción (Scheiber *et al.*, 2013).

El exceso de cobre en el humano, contrario a la deficiencia, principalmente es causada por una sobreingesta accidental o intencional que provoca manifestaciones clínicas que van desde síntomas gastrointestinales (acidez estomacal, náuseas, vómito, diarrea, hemorragia gastrointestinal), dolor de cabeza, anemia hemolítica, insuficiencia hepática y renal (Scheiber *et al.*, 2013). La dosis letal observada en humanos va desde 10 hasta 20 g de Cu por día, teniendo como consecuencia la muerte (Royer & Sharman, 2021).

La toxicidad de este elemento también se ha implicado en la etiología de enfermedades hepatocerebrales (enfermedad de Wilson, enfermedad hepatocerebral no wilsoniana adquirida) y enfermedades neurodegenerativas (enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson) (Pal, 2013).

3.3. Normatividad para el contenido de cobre en bebidas alcohólicas.

Los estándares y normatividad relacionados con las bebidas alcohólicas se han descrito de forma nacional e internacional con el fin de garantizar la seguridad alimentaria, inocuidad y calidad de estas. De esta forma, se han establecido límites máximos permitidos de contaminantes adquiridos durante toda la cadena de producción de bebidas alcohólicas, tales como metanol, alcoholes superiores, carbamato de etilo, ácido cianhídrico, micotoxinas, ftalatos, aldehídos y metales pesados (Pang *et al.*, 2017), siendo esta última categoría de contaminantes de interés en el presente trabajo, y enfocándose en el metal cobre.

El principal mecanismo de contaminación por cobre en agua, bebidas y alimentos se da por corrosión de utensilios, equipamiento y/o revestimientos de cobre metálico que están en contacto directo con estos, debilitando el calibre del material y lixiviado de iones cúpricos hacia los productos de consumo (WHO, 2017; Soufleros *et al.*, 2008, *Food Code*, 2017). En los procesos de elaboración de bebidas alcohólicas destiladas se ha descrito que, el uso de alambiques de cobre durante la etapa de destilación, son susceptibles a la corrosión por las condiciones de operación tales como temperaturas altas, concentraciones elevadas de oxígeno disuelto en el agua añadida al proceso y pH menores a 6.0 en el líquido a destilar, además de malas prácticas de higiene e inocuidad en la limpieza del alambique y eliminación de óxidos generados (Soufleros *et al.*, 2008; Garvin, 2021; Carreón-Álvarez, *et al.*, 2012).

Otras fuentes reportadas de contaminación por este metal son provenientes del suelo de cultivo, fertilizantes, utensilios y equipamiento empleados durante todo el proceso, y procedentes del agua empleada para el riego del cultivo y usada durante las etapas del proceso de elaboración (Soufleros *et al.*, 2008).

De forma internacional, las directrices de calidad en materia de bebidas alcohólicas -así como de alimentos- están regidas por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (FAO, por sus siglas en inglés) dentro del *Codex Alimentarius*. Esta entidad a través del Manual de Procedimientos Generales del *Codex Alimentarius* y aplicados a la Norma General para Contaminantes y Toxinas en Alimentos y Piensos (GSCTFF, por sus siglas en inglés), excluye al analito de interés del presente trabajo de su definición de “contaminante de alimentos y piensos”, y lo agrupa en “contaminantes que solo tienen importancia en la calidad”, ya que no posee significancia en protección hacia la salud pública por ser un elemento necesario dentro de los requerimientos nutricionales, hasta niveles de acumulación tóxica por sobreingesta (WHO-JECFA, 1982; WHO-FAO-GSCTFF, 2019) marcando como límites máximos los establecidos por las buenas prácticas de fabricación para cada bebida (WHO-FAO, 2001).

Así mismo como se señala en el capítulo cuatro del *Food Code* (2017) titulado “Equipamiento, utensilios y revestimientos”, este tipo de utensilios no deben estar en contacto con alimentos y bebidas con un pH inferior a 6.0, excepto en los pasos de pre-fermentación y fermentación de la elaboración de cerveza, a causa puede provocar contaminación de iones cúpricos al lixiviar del utensilio o equipamiento usado por corrosión ácida (FDA, 2018). De tal manera, la FDA monitorea los niveles de cobre, además de otros elementos, como un metal necesario en los requerimientos diarios en alimentos, aditivos, grupo de alimento específico y en superficies que tienen contacto durante el manejo de alimentos mediante los programas *Total Diet Study*, *FDA’s Toxic Elements in Food and Foodware* y *Radionuclides in Food*, (FDA, 2021), considerando 3.5 mg de cobre por litro de bebida alcohólica, como concentración reportada en la cual se muestran signos de envenenamiento por cobre en humanos (*Food Code*, 2017).

De manera nacional, la regulación aplicable dentro del ámbito de bebidas alcohólicas se fundamenta en las Normas Oficiales Mexicanas (NOM), las cuales son regulaciones técnicas que rigen a la industria y son consideradas como herramientas que permiten atender y eliminar los riesgos a la población, animales y medio ambiente, además de fomentar la calidad de bienes y servicios asociados en el cumplimiento de sus especificaciones (SEGOB-SE, 2021).

En el caso particular de la muestra usada en el presente trabajo, se hace referencia a la NOM-070-SCFI-2016 “Bebidas alcohólicas -Mezcal- Especificaciones” cuyo objetivo es establecer las características (de autenticidad) y especificaciones (de calidad) de producción, envasado y comercialización que debe cumplir la bebida alcohólica destilada, con Denominación de Origen, Mezcal, donde se efectúa la especificación -en la versión del año 1994- de los límites máximos permisibles de contaminación por metales pesados para plomo (Pb) y arsénico (As) de 0.5 mg /L, para zinc (Zn) de 1.5 mg/L, y para cobre (Cu) de 2.0 mg/L. En esta correlaciona el marco normativo auxiliar respecto a las especificaciones sanitarias de producción, etiquetado y comercialización de bebidas alcohólicas (NOM-142-SSA1/SCFI-2014), los requisitos mínimos de buenas prácticas de fabricación e higiene en bebidas (NOM-251-SSA1-2009) y las especificaciones de calidad del agua para consumo humano (NOM-127-SSA1-1994). El organismo encargado de promover y vigilar el cumplimiento de la NOM-070-SCFI-2016, es el Consejo Mexicano Regulador de la Calidad del Mezcal (COMERCAM) cuyo fin es proteger al Mezcal de su posible adulteración y garantizar las características de la categoría y tipo de Mezcal, además de la marca certificando la calidad del producto (SEGOB-SE, 2021).

Por último, se hace referencia sobre los límites máximos permitidos de Cu en agua para consumo humano en el marco normativo nacional e internacional, ya que es considerada como una de las posibles fuentes de contaminación hacia el producto final (Ceballos-Magaña *et al.*, 2009), siendo este límite de 1.3 (EPA, 1991) hasta 2.0 mg/L (WHO, 2017; NOM-127-SSA1-1994).

3.4. Metodologías para la determinación de cobre en bebidas alcohólicas.

Se han utilizado varias técnicas instrumentales para el análisis cuantitativo de diferentes iones metálicos a nivel de elementos traza en bebidas alcohólicas, con el fin de evaluar su inocuidad y establecer criterios de calidad asociados, ya que algunos de estos iones pueden afectar las propiedades organolépticas como aroma, color y sabor en las muestras que los contienen (Reilly, 2002). Además, esta clase de análisis aplicado a quimiometría puede contribuir con establecer perfiles de elementos traza que pueden actuar como huella digital para determinar autenticidad, origen, variedad y su clase. Las bebidas alcohólicas se han considerado como matrices de muestra complejas debido a que contienen varios componentes a niveles macro, micro y traza, que dependerán de las materias primas usadas y del proceso de elaboración; por lo que la presencia, abundancia y concentración de estos componentes varía entre las distintas bebidas (Li & Hardy, 1999; Rodrigues *et al.*, 2011; Ceballos-Magaña *et al.*, 2009).

En la tabla 1, se recopilan diferentes metodologías reportadas para el análisis de iones metálicos en diferentes muestras de bebidas alcohólicas. En esta se visualiza, que la técnica de espectrofotometría de absorción atómica de llama es la más utilizada, debido a su selectividad, mayor tolerancia a interferencias y simplicidad de instrumentación.

Sin embargo, la determinación directa en estas muestras es difícil por su baja sensibilidad por el efecto matriz de la muestra (Doner & Ege, 2005); asimismo, se observa que la preparación de las muestras más empleada es la digestión por diferentes vías, siendo este procedimiento largo, costoso y peligroso por los reactivos y equipos empleados.

Entre otras técnicas instrumentales de cuantificación reportadas para el análisis de cobre se encuentra la espectrofotometría de absorción atómica por horno de grafito, fluorescencia de rayos X, voltamperometría, polarografía, cromatografía de intercambio iónico, electroforesis capilar de zona y espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente que, proporcionan límites de detección adecuados en el análisis directo de muestras (Ibañez *et al.*, 2008). Estas técnicas tienen el inconveniente de que requieren de una instrumentación costosa y no son adecuados para el análisis de un gran número de muestras por su complejidad de procesamiento al introducir la muestra en el instrumento (Gürkan & Altunay, 2013), por lo que en muchos casos el método exige una preconcentración previa antes del análisis (Mendiguchía *et al.*, 2002).

3.5. Microextracción líquido-líquido dispersiva.

En el análisis de muestras de naturaleza y procedencia diversa que presentan una matriz compleja puede ocurrir la obstrucción y entorpecimiento de la cuantificación del analito de interés, por lo que es necesario la eliminación de los componentes de la matriz que interfieren con el análisis. Estas muestras pueden ser ambientales, alimentarias, farmacéuticas, industriales, clínicas, entre otras.

La preparación de la muestra es considerada como la etapa más crítica dentro de un análisis químico, y es necesario tener cuidado en el manejo y disposición de la muestra para asegurar la correcta extracción, aislamiento, integridad y/o eliminación de moléculas interferentes de los analitos de interés en una matriz compleja con el fin de desarrollar métodos confiables y así aumentar la sensibilidad, precisión, exactitud y recuperación en los resultados (da Silva *et al.*, 2019).

Existe una variedad de métodos que realiza la preparación de la muestra para su posterior análisis, como la extracción líquido-líquido (ELL) o la cromatografía en columna de lecho abierto, sin embargo estas han mostrado daños hacia el medio ambiente por el empleo de grandes cantidades de reactivos químicos nocivos (predominando los disolventes orgánicos utilizados) y de muestra, altos costos y rendimientos de extracción bajos, además de ser procedimientos lentos y laboriosos para el personal que las efectúa (Quigley *et al.*, 2016).

En los últimos años, se han reportado varios métodos de preparación de muestras que aplican técnicas de extracción miniaturizadas, las cuales se fundamentan en las técnicas tradicionales dando un enfoque innovador en esta materia eliminando la mayoría de los problemas que se presentan con las técnicas de extracción clásicas (Sajid *et al.*, 2018; Nazario *et al.*, 2017).

La microextracción líquido-líquido dispersiva (MELLD) es una técnica de preparación de muestra y de preconcentración novedosa que utiliza un sistema ternario de disolventes que emplea la distribución o reparto de los analitos con mayor afinidad hacia las fases empleadas con volúmenes de disolvente de extracción en el intervalo de los microlitros (Saraji & Boroujeni, 2013). La MELLD ha recibido especial atención debido a su simplicidad, bajo costo, alta recuperación, alto índice de concentración de los analitos y tiempos cortos de preparación de la muestra (Zgoła-Grześkowiak & Grześkowiak, 2011).

Tabla 1. Métodos reportados para el análisis de cobre en bebidas alcohólicas.

Referencia	Muestra.	Método de extracción.	Reactivos y condiciones	Técnica de análisis.	Recobro (%)	Límite de cuantificación y de detección.
NOM-117-SSA1-1994* (1994)	Bebidas alcohólicas en general (40 g)	Digestión por vía húmeda	i) ≥ 10 mL HNO ₃ concentrado en matraz Kjeldhal con calentamiento ligero por 3 h o por toda la noche, hasta obtener color translúcido. ii) Aforar a volumen adecuado.	EAA-LL	NR	LD: 2 a 5 veces el LD instrumental. LC: NR
		Digestión por vía seca	i) 10 mL HNO ₃ concentrado dejar reposar toda la noche ii) Evaporación de la muestra en mufla a 350°C hasta cesar humos. iii) Calcinación en mufla a 550 °C por 16 h o por toda la noche. iv) Recuperar cenizas con 5 mL HCl 1N y aforar volumen adecuado.	□ CC-D □ CC-AP		
<i>Codex alimentarius</i> CXS 234-1999* (1999) AOAC 999.11* (2002).	Bebidas en general (10-20 g)	Digestión por vía seca	i) Evaporar a sequedad la muestra a 100°C ii) Calcinación en mufla a 450°C por al menos 8 h. iii) Adición de 3 mL de H ₂ O y calcinar por al menos 1 h iv) Recuperar cenizas con 5 mL HCl 6N y aforar volumen adecuado (10-30 mL) con HNO ₃ 0.1M.	EAA-LL CC-D	NR	LD: 3 veces la DS _{blanco} $n \geq 20$ LC: NR
Terol <i>et al.</i> (2011)	Bebidas alcohólicas destiladas en general. (8 mL)	Muestra diluida 1:2	□ 16 mL de muestra diluida 1:2, con alícuota de estándar Cu 1,000 mg/L y aforada a 20 mL. □ Inyección de 20 μ L al equipo.	CLAT-EEA-PAI CC-AP	~100	LD: NR LC: NR
Bonic <i>et al.</i> (2013)	Brandies Añejos (10 mL)	Digestión por vía seca	i) Añadir 10 mL Mg(NO ₃) ₂ 10% en etanol. ii) Evaporar a sequedad y caramelizar la muestra a 250°C. iii) Templar en horno por 12 h hasta 450°C iv) Adición de 4 mL de HNO ₃ 1:3 y templar por 1 h hasta 450°C v) Recuperar solución de digestión y aforar a 25 mL con HCl 2M.	EAA-LL CC-D	94.2 \pm 9.2	LD: 0.012 mg L ⁻¹ LC: 0.04 mg L ⁻¹
Iwegbue <i>et al.</i> (2014)	Bebidas alcohólicas destiladas en general. (20 mL)	Digestión por vía húmeda	i) 2 mL HNO ₃ concentrado + 2 mL H ₂ O ₂ 30% ii) Agitar y calentar a 100°C hasta obtener clarificación de la muestra iii) Recuperar solución de digestión y aforar a 25 mL con HNO ₃ 0.25M	EAA-LL NR	101	LD: 0.003 μ g mL ⁻¹ LC: 0.004 μ g mL ⁻¹

*: Método de Referencia; NR: No reportado; LD: Límite de Detección; LC: Límite de Cuantificación; EAA-LL: Espectrofotometría de Absorción Atómica de Llama; EAA-HG: Espectrofotometría de Absorción Atómica por Horno de Grafito; EM-PAI: Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente; EEO-PAI: Espectrometría de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente; CLAT-EEA-PAI: Cromatografía de Líquidos de Alta Temperatura acoplado a espectrometría de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente; MELLD: Microextracción Líquido-Líquido Dispersiva; CC-D: Curva de Calibración Directa; CC-AP: Curva de Calibración por Adiciones Patrón; DS_{blanco}: Desviación estándar del blanco

Tabla 1. Métodos reportados para el análisis de cobre en bebidas alcohólicas (Continuación).

Referencia	Muestra.	Método de extracción.	Reactivos y condiciones	Técnica de análisis.	Recobro (%).	Límite de Cuantificación y de detección.
Froes-Silva <i>et al.</i> (2015)	Bebidas alcohólicas preparadas (Vodka, Ron, destiladas) (1 mL/min)	Muestra Directa	Estándar de metal preparado en Etanol 7% (v/v), simulando la matriz.	EEP-PAI CC-D	111.3	LD: 0.2 µg L ⁻¹ LC: 0.7 µg L ⁻¹
Seeger <i>et al.</i> (2015)	Vino tinto y blanco (10 mL)	MELLD	<ul style="list-style-type: none"> ▫ Disolvente de dispersión: 900 µL Metanol ▫ Disolvente de extracción: 40 µL 1,2-diclorobenceno. ▫ pH de extracción: 4.5 ▫ Agente quelante: 500 µL DDTC 1.5% (m/v). ▫ Centrifugación 3,000 rpm por 5 minutos. ▫ 2 ciclos de lavados. 	EAA-LL Curva de calibración + MELLD	NR	LD: 6.3 µg L ⁻¹ LC: 19.0 µg L ⁻¹
Ajtony <i>et al.</i> (2016)	Bebidas alcohólicas destiladas húngaras, Pálinka. (20 µL)	Muestra directa	Adición de 5 µL modificador químico de matriz (Pd como nitrato 1,000 mg/L) en cada análisis.	EAA-HG CC-D	100.9±8.5	LD: 0.03 mg L ⁻¹ LC: NR
Ibanova-Petropulos <i>et al.</i> (2017)	Brandies (20 µL)	Muestra directa	<ul style="list-style-type: none"> ▫ Adición de 5 µL modificador químico de matriz (Pd 0.1%+0.6% Mg(NO₃)₂) en cada análisis. ▫ Estándar de metal preparado en Etanol 50% (v/v), simulando la matriz. 	EAA-HG CC-D	97±6	LD: 1.0 µg L ⁻¹ LC: NR
FDA* (2020)	Bebidas alcohólicas en general (5 g)	Digestión asistida por microondas	<ul style="list-style-type: none"> i) 5 mL HNO₃ concentrado + 1 mL H₂O₂ 30% por 20 minutos. ii) Digerir con microondas a 160 bar y 250°C por 15 minutos. iii) Recuperar solución de digestión con 25 g HCl 10% iv) Aforar a 50 g con H₂O 	EM-PAI ▫ CC-D ▫ CC-AP	100±10	LD: 6.02 µg kg ⁻¹ LC: 54.7 µg kg ⁻¹
<p>*: Método de Referencia; NR: No reportado; LD: Límite de Detección; LC: Límite de Cuantificación; EAA-LL: Espectrofotometría de Absorción Atómica de Llama; EAA-HG: Espectrofotometría de Absorción Atómica por Horno de Grafito; EM-PAI: Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente; EEO-PAI: Espectrometría de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente; CLAT-EAA-PAI: Cromatografía de Líquidos de Alta Temperatura acoplado a espectrometría de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente; MELLD: Microextracción Líquido-Líquido Dispersiva; CC-D: Curva de Calibración Directa; CC-AP: Curva de Calibración por Adiciones Patrón; DS_{blanco}: Desviación estándar del blanco</p>						

De forma general y convencional, la MELLD se basa en un sistema que involucra una fase acuosa (donde se encuentran los analitos de interés), un disolvente no polar de alta o baja densidad e inmisible en agua que actúa como disolvente de extracción. Los más usados son tetracloruro de carbono, cloroformo, diclorometano, tetracloroetileno, ciclohexano, 1-octanol, 1-undecanol y 1-dodecanol. Además, se utiliza un disolvente de dispersión, que a menudo es miscible en agua como metanol, etanol, acetonitrilo y acetona (Zuloaga *et al.*, 2015; Kokosa, 2020).

Posteriormente la mezcla dispersiva -que contiene el disolvente de dispersión y el disolvente de extracción- se inyecta rápidamente en la muestra acuosa generando la formación de una emulsión que es visible con la cual el disolvente de extracción es dispersado en finas gotas en toda la muestra generando mayor área de contacto con la fase acuosa. La mezcla ternaria se agita con el fin de maximizar el rendimiento de extracción. El equilibrio de reparto del analito entre la fase acuosa y el disolvente de dispersión se alcanza rápidamente disminuyendo el tiempo análisis (Zgoła-Grześkowiak & Grześkowiak, 2011; Saraji & Boroujeni, 2013; Zuloaga *et al.*, 2015). Por último, se rompe la emulsión generada para recuperar el disolvente de extracción (fase orgánica) con el analito extraído sedimentado en el fondo o en la superficie del recipiente en la MELLD empleando una jeringa o una pipeta y esta se analiza mediante técnicas instrumentales -cromatografía de gases, cromatografía de líquidos de alta resolución, espectrofotometría UV-VIS o de absorción atómica, espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente- de manera directa o con la posibilidad de evaporar y reconstituir el disolvente de extracción con un codisolvente de características similares de solubilidad respecto a los analitos extraídos (Sajari & Boroujeni, 2013; Kokosa, 2020). En la figura 4 se muestra un ejemplo del proceso de extracción por MELLD.

La MELLD posee variaciones en la técnica dependiendo de la naturaleza (orgánica o inorgánica) del analito, sus características fisicoquímicas (hidrofobicidad, comportamiento ácido-base, complejación, propiedad de derivatización) y tipo de matriz donde se encuentre. En las tablas 2, 3 y 4 se resumen las principales diferencias en el proceso de extracción, dependiendo de la forma de efectuar la dispersión, la selección del disolvente de extracción y la forma de romper la emulsión (Kokosa, 2020).

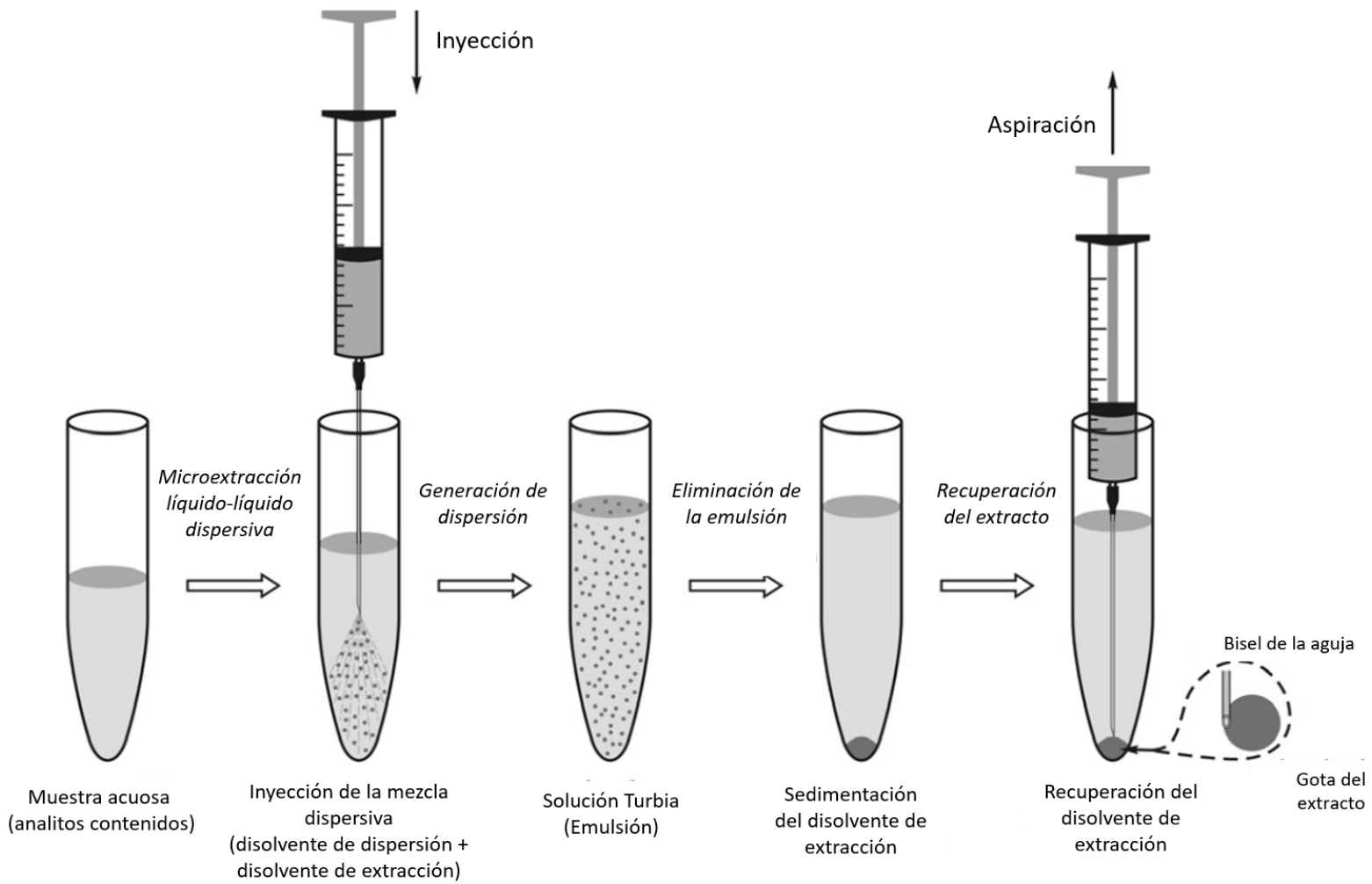


Fig 4. Procedimiento general para la técnica de microextracción líquido-líquido dispersiva (MELLD)
(Modificado de: Zgoła-Grześkowiak & Grześkowiak, 2011).

Tabla 2. Forma de generar la dispersión en la técnica de microextracción líquido-líquido dispersiva (MELLD) (Kokosa, 2020).	
Método de generación de dispersión.	Descripción.
MELLD con disolvente de dispersión.	Un disolvente insoluble en agua es disuelto en un agente de dispersión soluble en agua y la solución se inyecta rápidamente en la muestra.
MELLD asistida con <i>vortex</i> .	Un disolvente insoluble en agua es adicionado a la muestra acuosa y la mezcla se agita mecánicamente en <i>vortex</i> para producir la dispersión.
MELLD asistida con ultrasonido.	Un disolvente insoluble en agua es adicionado a la muestra acuosa y la dispersión es generada mecánicamente por ultrasonido.
MELLD asistida con gas.	Se agrega un disolvente insoluble a la muestra acuosa y se genera una dispersión burbujeando un gas en la mezcla para generar la dispersión.
MELLD asistida por efervescencia.	Se añade un ácido y una sal de carbonato junto con el disolvente de extracción a la muestra acuosa; las burbujas de CO ₂ generadas de la reacción de neutralización forman la dispersión. El ácido y la base se pueden agregar en forma sólida.
MELLD asistida por aire.	La mezcla de disolvente extracción y muestra acuosa, contenida en una jeringa, es expulsada rápidamente varias veces a través de la aguja adjunta generando turbulencia entre ambas fases obteniendo la emulsión. No requiere de disolvente de dispersión.
MELLD <i>in situ</i>	A la muestra acuosa se le añaden componentes solubles de líquidos iónicos o de disolventes eutécticos profundos para generar una dispersión insoluble de estos.

Tabla 3. Variación en el empleo de disolventes de extracción en la microextracción líquido-líquido dispersiva (MELLD) (Kokosa, 2020).

Clase de disolvente de extracción.	Características.
Disolventes tradicionales.	<p>Insolubles en agua, poseer interacciones intermoleculares y polaridad afines a los analitos, y ser compatibles con la técnica analítica de cuantificación de los analitos. Se debe seleccionar con base a sus propiedades de volatilidad, solubilidad en agua y toxicidad.</p> <p>Ejemplos: acetato de etilo, éter etílico, cloroformo (CHCl₃), 1-octanol, tetracloruro de carbono (CCl₄), ciclohexano.</p>
Líquidos iónicos.	<p>Compuestos de naturaleza catiónica y/o aniónica voluminosos que son de fácil síntesis. Poseen baja volatilidad, capacidad de solubilizar compuestos orgánicos e inorgánicos, estables térmicamente, menos tóxicos respecto a los disolventes tradicionales y muestran compatibilidad con instrumentos analíticos (cromatógrafo de líquidos y espectrofotómetro de absorción atómica).</p>
Disolventes eutécticos profundos.	<p>Esta clase de disolventes son considerados como una subclase de líquidos iónicos, siendo la diferencia que estos se encuentran unidos por puentes de hidrógeno y fuerzas de tipo van der Waals en lugar de fuerzas de tipo iónico. Son compatibles con cromatógrafos de gases y de líquidos.</p>
Disolventes magnéticos.	<p>Son líquidos iónicos o disolventes eutécticos profundos que incorporan sales de níquel, hierro o manganeso haciéndolos magnéticos. Se usa un imán fuerte para obtener el disolvente de extracción. Al empleo de estos, no es necesario el uso de disolventes de dispersión o alguna técnica para romper la emulsión.</p>

Tabla 4. Técnicas para romper la dispersión en la obtención del disolvente de extracción en la microextracción líquido-líquido dispersiva (MELLD) (Kokosa, 2020).	
Técnica para romper la dispersión.	Descripción.
Centrifugación	Aplicación de fuerza centrífuga -comúnmente velocidades de 3,000 a 5,000 rpm durante 2 a 5 minutos-, con el fin de que las pequeñas gotas del disolvente de extracción se aglomeren sedimentando o flotando en la fase acuosa, dependiendo de la densidad del disolvente de extracción.
Desemulsificación con disolventes	Involucra la adición de otro disolvente, generalmente disolvente de dispersión, a la emulsión para separar las fases. Sin embargo, este procedimiento conduce a mejorar la solubilidad del analito en fase acuosa.
<i>Salting out</i>	La adición sal (normalmente NaCl) a la muestra acuosa posterior a la MELLD, reduce la solubilidad del disolvente de dispersión causando la desestabilización de la emulsión, separando las fases.

El campo de aplicación de la MELLD se ha centrado con éxito a la extracción y preconcentración de una amplia variedad de compuestos orgánicos y iones metálicos, principalmente de muestras acuosas; no obstante, se ha extendido hacia muestras sólidas de suelo, de alimentos y farmacéuticas, siendo los analitos de principales de estudio plaguicidas, fenoles y polihidroxialcanoatos (PHA) (Zgoła-Grześkowiak & Grześkowiak, 2011).

Por último, se han reportado los procedimientos de MELLD en el análisis de iones metálicos trazas en muestras de agua. En estos procedimientos de MELLD ocurren tres procesos simultáneos: *a)* formación del complejo metálico neutro; *b)* formación de la emulsión y *c)* extracción del quelato metálico desde la matriz hacia el disolvente de extracción (Sajari & Boroujeni, 2013). Los reactivos comúnmente utilizados como agente quelante de extracción son las moléculas de pirrolidinditiocarbamato de amonio (APDC) y de dietilditiocarbamato de sodio (DDTC) (Zgoła-Grześkowiak & Grześkowiak, 2011).

3.6. Análisis de muestras en fase orgánica por espectrofotometría de absorción atómica.

El empleo de agua como matriz y/o disolvente se ha utilizado en la mayoría de las determinaciones por espectrofotometría de absorción atómica. Sin embargo, esta técnica instrumental no solo se limita al análisis de elementos en matrices acuosas, sino que puede usarse en el análisis de productos derivados del petróleo, aceites, alimentos y productos farmacéuticos oleosos o en muestras que requieren efectuar una extracción con disolventes orgánicos como técnica de preparación y preconcentración de la muestra (lab-training.com, 2015).

La técnica de extracción líquido-líquido (ELL) y sus variaciones, poseen muchas ventajas acopladas a la técnica instrumental de espectrofotometría de absorción atómica, entre las que se encuentran la preconcentración de elementos para el análisis de trazas, el mejoramiento de la señal instrumental y la eliminación de interferencias (Allan, 1961; Schadev *et al.*, 1967). Desde finales de los años 50's, se han descrito procedimientos para el análisis de diferentes iones metálicos traza por espectrofotometría de absorción atómica de llama previo a la extracción como quelatos neutros en fase orgánica (Morrison & Freiser, 1957; Sandell, 1959).

Se ha utilizado una variedad de disolventes orgánicos miscibles e inmiscibles en agua para aumentar la sensibilidad del análisis tales como cetonas, ésteres, alcoholes (de cadena corta o de cadena larga) y otros hidrocarburos que posean oxígeno en su estructura para que su combustión sea completa al momento de llegar al quemador del instrumento (Cantle, 1982; Allan, 1961). No obstante, se pueden utilizar disolventes orgánicos clorados, éteres, hidrocarburos alifáticos o aromáticos, los cuales presentan una combustión incompleta afectando la cantidad de átomos durante el proceso de nebulización y la estabilidad de la llama por cambios en la proporción de combustible/comburente causados por la inflamabilidad del disolvente (Allan, 1961).

El uso de ciertos disolventes orgánicos en la espectrofotometría de absorción atómica de llama contribuye al incremento de la señal de absorbancia y/o el incremento de la temperatura de la llama usada (Schadev *et al.*, 1967). Este problema puede ser corregido modificando la altura del quemador -la cual depende de la zona de la llama donde tiene lugar la combustión del disolvente-, el flujo de aspiración del disolvente orgánico -siendo de 3.0 mL/min el óptimo en la mayoría de los casos-, la composición de combustible/comburente de la llama y la longitud del capilar hasta el quemador (Robinson, 1970). También debe considerarse que las características fisicoquímicas del disolvente orgánico como viscosidad, tensión superficial, densidad, índice de evaporación y calor de combustión afectando la señal de absorbancia medida (Szivós, 1980; Schadev & West, 1970). Siempre que sea posible, estos efectos deben evitarse o corregirse mediante procedimientos estandarizados adecuados (Allan, 1961).

Por último, se deben realizar algunas consideraciones de seguridad durante el análisis de muestras en fase orgánica por espectrofotometría de absorción atómica de llama (McKenzie, 1980; Moffett, 1991), tales como: *a)* uso de disolventes orgánicos no tóxicos o con menor toxicidad; *b)* el analito debe ser soluble en el disolvente seleccionado; *c)* la temperatura de inflamabilidad del disolvente; *d)* si se emplea disolventes clorados, se deberá ventilar adecuadamente el lugar por la generación de vapores tóxicos (fosgeno) derivados de la combustión incompleta; *e)* los disolventes orgánicos pueden dañar los componentes de plástico del instrumento al contacto con ellos y *f)* el uso de solventes orgánicos aumenta la posibilidad de acumulación de depósitos de carbono en el quemador por lo que se deberá limpiar con regularidad cuando se usan disolventes orgánicos.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general.

Establecer las condiciones óptimas para la microextracción líquido-líquido dispersiva de cobre en mezcal y su posterior cuantificación por espectrofotometría de absorción atómica de llama como un método alternativo en su determinación.

4.2. Objetivos particulares.

- Optimizar las condiciones instrumentales para la introducción de la muestra en fase orgánica al sistema de espectrofotometría de absorción atómica de llama para la cuantificación de cobre extraído.
- Determinar las cantidades adecuadas de reactivos, disolventes de extracción y de dispersión y muestra necesarios para efectuar la extracción líquido-líquido dispersiva como técnica de preconcentración en la cuantificación de cobre.
- Miniaturizar la técnica de extracción líquido-líquido dispersiva propuesta para la extracción del quelato neutro de cobre.
- Evaluar el desempeño del método desarrollado para la determinación de cobre en mezcal a través de los parámetros de linealidad, recobro, efecto matriz, repetibilidad, límites de detección y cuantificación.
- Aplicar el método desarrollado al análisis del contenido de cobre en diferentes muestras de mezcales comerciales de diferentes estados de la República Mexicana.

5. METODOLOGÍA

5.1. Materiales.

Los materiales empleados en este trabajo (reactivos, disolventes, cristalería, material volumétrico o materiales de operación específica) se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Materiales empleados en el establecimiento de las condiciones óptimas de la MELLD en el análisis de Cu en mezcál.				
Reactivos.	Disolventes.	Cristalería.	Material Volumétrico.	Materiales específicos.
<p>CuCl₂ · 2H₂O, JT. Baker[®], Ensayo: 99.7%.</p> <p>Dietilditiocarbamato de sodio (DDTC), Sigma-Aldrich[®], Ensayo: 99%.</p>	<p>CCl₄, JT. Baker[®], Grado Reactivo Analítico.</p>	<p>Vasos de precipitado de 5, 10, 30, 50, 100 y 250 mL.</p>	<p>Matraz volumétrico de 100 mL, Pyrex[®], Tipo A.</p>	<p>Tubos de polipropileno para centrifuga de 50 mL.</p>
	<p>CHCl₃, JT. Baker[®], Grado Reactivo Analítico.</p>	<p>Agitador de vidrio.</p>	<p>Matraz volumétrico de 25 mL, Kimax[®], Tipo A.</p>	<p>Tubos de polipropileno para centrifuga de 15 mL.</p>
	<p>Metanol, TecSiQuim[®], Grado HPLC.</p>	<p>Pipetas graduadas de 0.2, 1, 5 y 10 mL</p>	<p>Pipetas volumétricas de 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 7 y 20 mL Kimax[®], Tipo A.</p>	<p>Jeringas con aguja desechables de 3 y 10 mL</p>
	<p>Etanol, TecSiQuim[®], Grado HPLC</p>			<p>Pipetas de transferencia de 2 mL (gotero)</p>
	<p>Acetona, TecSiQuim, Grado Reactivo Analítico</p>			<p>Placa de porcelana</p>
	<p>1-octanol, Sigma-Aldrich[®], Ensayo: 99%.</p>			
	<p>Metil-etilcetona, Químicos Monterrey, Grado Reactivo Analítico.</p>			
<p>Agua desionizada.</p>				

5.2. Equipo e instrumentación.

El equipo de laboratorio necesario para desarrollar las actividades descritas en el presente trabajo se enlista a continuación:

- Balanza Analítica Digital Mettler Toledo® PB303-S.
- Micropipeta de volumen variable de 10 a 100 μL CAPP® Ecopipette.
- Micropipeta de volumen variable de 20 a 200 μL Science Med®.
- Micropipeta de volumen variable de 100 a 1,000 μL Brand® Transferpette.
- Agitador *vortex* Science Med® MX-S.
- Termoagitador magnético Fisher Scientific®.
- Balanza mecánica OHAUS® PRIMER.
- Centrífuga Clínica VELAB® PRO-M8.
- Campana de extracción de gases, humos y vapores.

Además, se utilizó como instrumento un espectrofotómetro de absorción atómica marca Varian® modelo *SpectrAA-200* de flujo fijo de 5 mL/min, con una lámpara de cátodo hueco para cobre marca Varian® con número de serie SC-469 y como integrador de datos un equipo de cómputo con sistema operativo *Windows*® 98 y el software *SpectrAA*.

5.3. Preparación de estándares.

Se prepararon 100 mL de una solución *stock* de Cu con una concentración de 1,000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ pesando exactamente 0.269 g de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. A partir de esta, se efectuaron diluciones adecuadas para la realización de disoluciones individuales de concentración 12, 100, 120 y 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$, empleadas para la preparación de la curva de calibración en los sistemas espectrofotométrico y de extracción.

También, se prepararon 100 mL de una disolución de DDTC 1.5 % (m/v), pesando 1.515 g de DDTC.

Todas las disoluciones fueron preparadas con agua desionizada como disolvente y resguardadas a temperatura ambiente en viales ámbar.

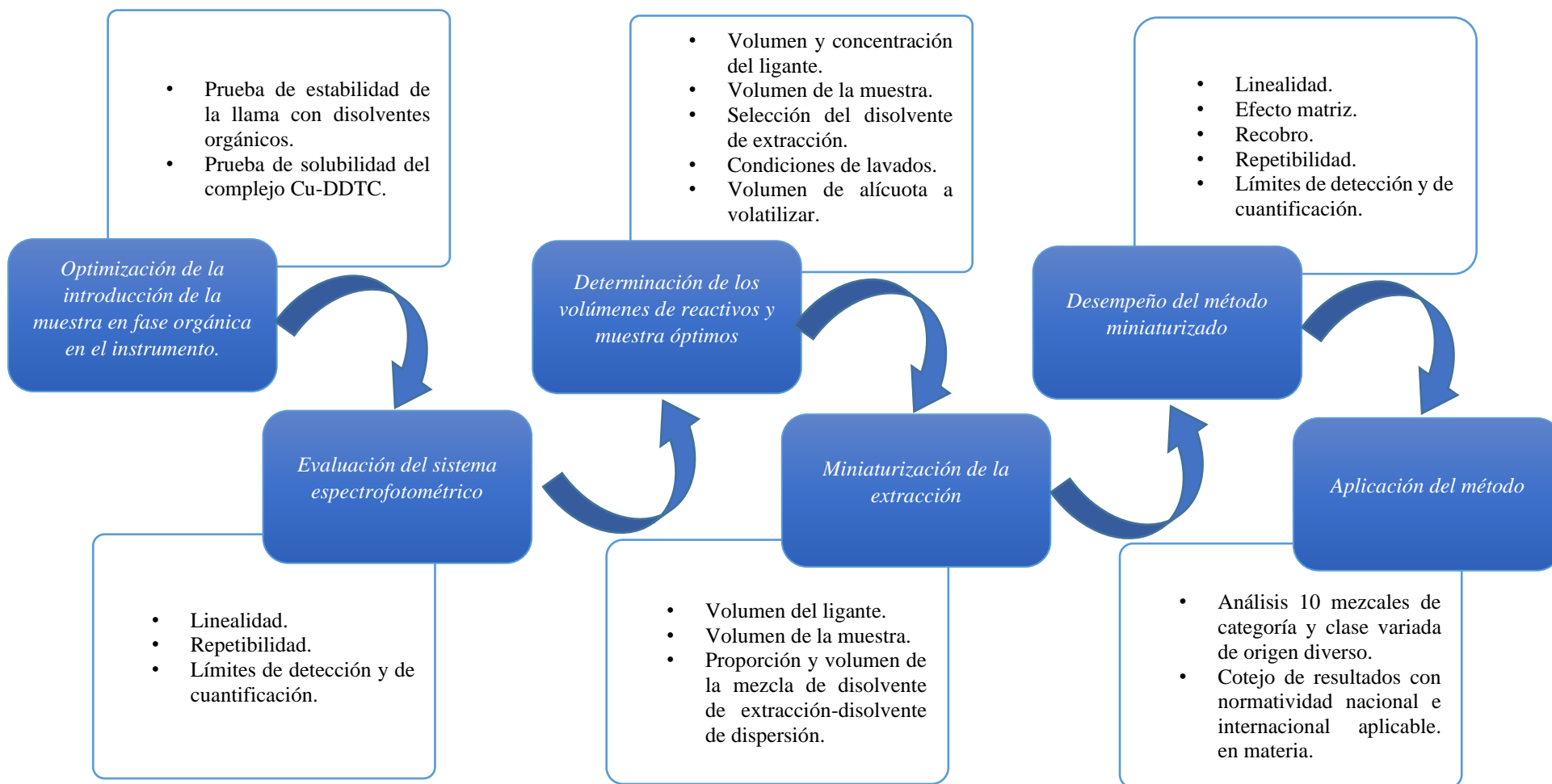


Fig 5. Diagrama de la optimización del método de análisis de Cu en mezcal por microextracción líquido-líquido dispersiva y espectrofotometría de absorción atómica de llama.

5.4. Optimización de la introducción de muestra en fase orgánica en el sistema de espectrofotometría de absorción atómica.

Debido a que el flujo de aspiración de la muestra en el instrumento de absorción atómica utilizado no se puede modificar, para la optimización de la introducción de la muestra en fase orgánica se realizaron pruebas cualitativas donde se aspiraron diferentes disolventes orgánicos como CCl_4 , CHCl_3 , metanol, etanol, acetona, 1-octanol, metil-etilcetona y mezclas de ellos, observando si la llama del instrumento se extinguía o no.

Asimismo, para seleccionar el disolvente de inyección óptimo, se consideró que el complejo neutro de cobre debía ser introducido en fase homogénea al instrumento para evitar la obstrucción del capilar de aspirado y para mantener estable la lectura de absorbancia. Por tal razón, se realizaron pruebas de solubilidad con diferentes disolventes o mezcla de ellos -usados previamente en la prueba de estabilidad de la llama del instrumento-, utilizando una alícuota de disolución (equivalente a 6 μg del complejo neutro de cobre) y añadiendo alícuotas de 50 μL hasta completar 300 μL como volumen límite de disolvente añadido. En cada adición de las alícuotas de disolvente se homogeneizó con una varilla de vidrio.

La cantidad del complejo de cobre empleado en las pruebas de solubilidad fue previamente obtenida por extracción líquido-líquido dispersiva (ELLD) usando 20 mL de una solución acuosa de estándar de Cu a 0.90 $\mu\text{g mL}^{-1}$, a la cual previamente se le añadió 2 mL de DDTC al 1.5% (m/v) y se agitó en *vortex* por 20 segundos. La extracción se efectuó inyectando de forma rápida a la solución 7.5 mL de una mezcla de CCl_4 :MeOH 33:67 (v/v) produciendo turbidez en la solución. Después, se agitó en *vortex* por 30 segundos y se centrifugó a 4,000 rpm por 2 minutos. Finalmente, se recuperó la fase orgánica y se volatilizó una alícuota de 500 μL en la campana de extracción de gases a temperatura ambiente hasta sequedad sobre una placa de porcelana.

5.5. Evaluación del sistema espectrofotométrico.

Con base a los parámetros recomendados en *Flame Atomic Absorption Spectrometry Analytical Methods*, se evaluó el sistema espectrofotométrico con las condiciones mostradas en la tabla 6.

Tabla 6. Condiciones instrumentales empleadas para la evaluación del sistema espectrofotométrico.			
Parámetro	Condición	Parámetro	Condición
Programa de medición	Integración	Tiempo de retraso (<i>delay</i>)	15 segundos
Número de lecturas	5 lecturas en diferentes puntos	<i>Slit</i>	0.2 nm
Tiempo de lectura	5 segundos entre cada lectura	Longitud de onda de lectura	327.5 nm

Como blanco se usó una disolución de DDTC al 0.3 % (m/v), preparada por triplicado a partir de 2 mL de DDTC 1.5 % (m/v) y aforada con agua desionizada a 10 mL.

La mezcla comburente/combustible empleada fue una mezcla aire/acetileno con un flujo de 13.5/2 L min⁻¹.

5.5.1. Linealidad.

La linealidad del sistema espectrofotométrico se evaluó preparando una curva de calibración a 6 niveles de concentración de Cu (0.75, 1.5, 3.0, 6.0, 9.0 y 12.0 µg mL⁻¹) en fase acuosa por triplicado. A cada sistema se añadió 2 mL de DDTC 1.5% (m/v) para la formación del complejo neutro. Se evaluó la tendencia lineal con el coeficiente de correlación (r^2) calculado a partir del ajuste de mínimos cuadrados usando Excel 2019.

5.5.2. Repetibilidad.

La repetibilidad del sistema espectrofotométrico se determinó preparando por triplicado una disolución estándar a una concentración de 6.0 µg mL⁻¹ de Cu en fase acuosa con un volumen de aforo de 10 mL a partir de una solución estándar de 30 µg mL⁻¹. A cada réplica del sistema se añadió 2 mL de DDTC 1.5% (m/v) para la formación del complejo neutro. Se estimó el coeficiente de extinción molar (ϵ) y se calculó el promedio de los valores de absorbancia, desviación estándar y el coeficiente de variación (%RSD).

5.5.3. Límites de detección y cuantificación.

El límite de cuantificación del sistema espectrofotométrico fue establecido como el primer punto de la curva de calibración construida en la evaluación de la linealidad del sistema. Se consideró como límite de detección es equivalente la concentración del primer punto de la curva de calibración dividido entre 3.3

5.6. Determinación de los volúmenes de reactivos y muestra óptimos.

El establecimiento de los volúmenes de reactivos y muestra óptimos para el método de extracción líquido-líquido dispersiva (ELLD) se basaron de acuerdo con los protocolos descritos por Seeger *et al.* (2015) en muestras de vino y Rosa *et al.* (2015) en muestras de miel con modificaciones. Para ello el método se dividió en 4 etapas: *a)* Formación del complejo; *b)* Extracción Líquido-Líquido Dispersiva; *c)* Eliminación de la fase acuosa y exceso de ligante y *d)* Técnica de Cuantificación. La elección de los volúmenes de reactivos y de muestra óptimos para realizar la extracción líquido-líquido dispersiva se efectuó de forma cualitativa.

En la primera etapa, se utilizó el reactivo de dietilditiocarbamato de sodio (DDTC) como agente complejante en la formación del quelato neutro con Cu, sin embargo, este ligante no es selectivo para este catión formado complejos con otros analitos presentes en la muestra. De esta forma, se estableció un volumen constante de 2 mL de DDTC 1.5% (m/v) añadidos con relación estequiométrica entre el analito y el ligante de más de 50 veces respecto a la concentración de $7.20 \mu\text{g mL}^{-1}$ del cobre en la muestra. La agitación en *vortex* después de la adición del ligante fue de 20 segundos.

En la optimización del volumen de muestra se probaron 20, 25 y 30 mL determinando cualitativamente el volumen máximo de muestra que permitía la formación del vórtice dentro de la mezcla de extracción durante la agitación.

En la etapa de Extracción Líquido-Líquido Dispersiva (ELLD), se estableció como disolvente de dispersión (DD) metanol y se probaron como disolventes de extracción (DE) CCl_4 y CHCl_3 , los cuales fueron mezclados en un vaso de precipitados usando las proporciones v/v de 30:70, 33:67 y 40:60 de disolvente de extracción y disolvente de dispersión, respectivamente. La mezcla de disolventes se tomó con una jeringa de volumen adecuado y se inyectó a 20 mL de agua desionizada o en una mezcla etanol-agua 40:60 (v/v) -simulando el contenido de alcohol en la muestra-, contenidos en un tubo de centrífuga de 50 mL. La proporción de volúmenes y la selección del disolvente adecuado de extracción se basó cualitativamente en la formación de turbidez en la solución y en la cantidad de fase orgánica recuperada posterior a la extracción. El tiempo de agitación posterior a realizar la inyección de disolventes fue de 30 segundos. Después, se centrifugó a 4,000 rpm por 2 minutos.

En la etapa de eliminación de fase acuosa y exceso de ligante, se realizaron 2 lavados que consistieron en eliminar la fase acuosa hasta un volumen de 5 mL del sistema con ayuda de una pipeta de transferencia y después añadir agua desionizada hasta un volumen de 10 mL; repitiendo el mismo ciclo de agitación-centrifugación realizado en la anterior etapa.

En la última etapa, una vez establecido el disolvente de extracción, se determinó el volumen de alícuota de la fase orgánica a volatilizar a sequedad en campana de extracción de gases a temperatura ambiente, probando 0.5, 0.75, 1.0, 1.25 y 1.5 mL de disolvente seleccionado. La elección del volumen se efectuó basado en el tiempo de evaporación mínimo.

5.7. Miniaturización de la extracción.

Con el fin de reducir insumos y residuos generados durante el análisis se efectuó la miniaturización del método disminuyendo los volúmenes de reactivos y muestra.

Se probaron las siguientes condiciones:

- a) volúmenes de 1.0 y 1.5 mL de DDTC al 1.5% (m/v);
- b) volúmenes de muestra de 5.0, 7.0 y 10.0 mL y
- c) un volumen de 3 mL de la mezcla de disolventes de extracción y de dispersión en proporciones de 17:83, 23:77, 33:67 (v/v), respectivamente.

Para la eliminación de la fase acuosa y exceso de ligante, se retiró la fase acuosa hasta un volumen de 2 mL del sistema y posteriormente se añadió un volumen de agua desionizada necesaria para completar 5 mL y efectuar así los lavados.

Las condiciones de agitación en *vortex*, el número de lavados, la velocidad y tiempo de centrifugado, alícuota de fase orgánica a evaporar, el volumen y disolvente de resuspensión, y la manera de introducción de la muestra en el instrumento se mantuvieron.

5.8. Desempeño del método miniaturizado.

Para la evaluación del desempeño del método de extracción miniaturizado, el instrumento se programó con base a las condiciones mostradas en la tabla 7 y se empleó una alícuota de 200 μL de muestra aspirada utilizando 1-octanol como blanco.

Parámetro	Condición	Parámetro	Condición
Programa de medición	Área del pico de absorbancia	Tiempo de retraso (<i>delay</i>)	3 segundos
Número de lecturas	1 lectura	<i>Slit</i>	0.2 nm
Tiempo de lectura	15 segundos	Longitud de onda de lectura	327.5 nm

La mezcla comburente/combustible empleada fue una mezcla aire/acetileno con un flujo de 13.5/2 L min^{-1} , respectivamente.

5.8.1. Linealidad.

Diferentes alícuotas de una muestra de mezcal que no se detectó Cu fueron fortificadas a los niveles de concentración de 0.45, 0.90, 1.80, 3.60, 5.40 y 7.20 $\mu\text{g Cu/mL}$ de mezcal. Cada nivel se preparó por triplicado y se analizaron con las condiciones óptimas del método miniaturizado. Se graficó la respuesta obtenida contra la concentración adicionada de cobre. La linealidad se evaluó con el coeficiente de correlación (r^2) calculado a partir del ajuste de mínimos cuadrados usando Excel 2019.

5.8.2. *Efecto matriz.*

Para evaluar el efecto matriz se preparó una curva de calibración sin muestra con los niveles de concentración 0.45, 0.90, 1.80, 3.60, 5.40 y 7.20 µg Cu/mL agua y extraídas con las condiciones óptimas del método miniaturizado. Se graficó la respuesta obtenida en función de la concentración de cobre adicionada. Después, se comparó la pendiente obtenida con la de la curva de calibración con muestra del punto anterior, como se muestra a continuación:

$$\text{Efecto matriz} = \frac{\text{Pendiente Curva con Matriz}}{\text{Pendiente Curva Estándar}}$$

Se considera que no hay efecto matriz cuando el resultado se encuentra entre 0.8 y 1.2 (Mohammed *et al.*, 2020).

5.8.3. *Recobro.*

A partir de los resultados de la curva de calibración con muestra del punto 5.8.1, se calculó la cantidad recuperada de Cu posterior a su extracción. Se graficó la concentración recuperada en función de la concentración adicionada y el recobro global se determinó multiplicando la pendiente obtenida por 100.

5.8.4. *Repetibilidad.*

La repetibilidad del método se determinó preparando por triplicado el sistema de extracción miniaturizado a una concentración de 3.60 µg Cu/mL de mezcal. Se estimó el coeficiente de extinción molar (ϵ) y se calculó el promedio de la absorbancia, la desviación estándar y el coeficiente de variación (%RSD) usando Excel 2019.

5.8.5. *Límites de detección y cuantificación.*

El límite de detección del método fue establecido con base a soluciones de diferentes concentraciones usadas que dieron una señal diferente del blanco del sistema de extracción miniaturizado. El límite de cuantificación se estableció como la concentración de cobre en mezcal del primer punto de la curva de calibración del método de microextracción.

5.9. Análisis de muestras de mezcal.

Aplicando el método de microextracción líquido-líquido dispersiva en la extracción del quelato neutro de cobre optimizado y su consiguiente cuantificación de la fase orgánica por en el sistema espectrofotométrico de absorción atómica de llama, se analizaron, por triplicado, diez muestras de diferentes categorías de mezcal provenientes del estado de Oaxaca (9) y del estado de Guerrero (1). Se determinó la concentración promedio de Cu en cada muestra y se calcularon los intervalos de confianza al 95% ($\alpha= 0.05$). Los resultados obtenidos se compararon con los límites máximos permitidos de Cu en mezcal en las normatividades nacionales e internacionales aplicables.

6. RESULTADOS Y ANÁLISIS

6.1. Optimización de la introducción de muestra en fase orgánica en el sistema de espectrofotometría de absorción atómica de llama.

En la tabla 8, se muestran los resultados cualitativos usando diferentes disolventes orgánicos para establecer las condiciones de introducción de la muestra en fase orgánica al instrumento de forma óptima.

Tabla 8. Resultados cualitativos en el establecimiento de condiciones óptimas de introducción de la muestra en fase orgánica empleando diferentes disolventes orgánicos.			
Disolvente probado	Prueba de estabilidad de la llama	Prueba de Solubilidad (6 µg del complejo Cu-DDTC)	
	¿Se apaga la llama del instrumento?	Volumen de disolvente máximo añadido (µL)	¿El complejo neutro Cu-DDTC fue soluble?
Agua	No	300	Ligeramente soluble
CCl ₄	Si	50	<i>Totalmente soluble</i>
CHCl ₃	Si	50	<i>Totalmente soluble</i>
Metanol	Si	300	Ligeramente soluble
Etanol	Si	300	Ligeramente soluble
Acetona	Si	300	Ligeramente soluble
1-octanol (oct)	<i>No</i>	300	Parcialmente soluble
Metil-etilcetona (MEK)	Si	50	<i>Totalmente soluble</i>

El CCl₄, CHCl₃ y la MEK fueron los disolventes que solubilizaron completamente al complejo. Sin embargo, extingue la llama del sistema a diferencia del 1-octanol que fue el único disolvente que permitiría introducir correctamente la muestra, pero presentó el inconveniente de no lograr solubilizar de forma total el complejo neutro de Cu-DDTC.

De esta forma, se prosiguió a efectuar mezclas de 1-octanol con los otros disolventes en diferentes proporciones. Estos resultados se muestran en la tabla 9.

Tabla 9. Resultados cualitativos en el establecimiento de condiciones óptimas de introducción de la muestra en fase orgánica empleando diferentes mezclas de disolventes orgánicos.			
Mezcla de disolventes probados	Prueba de estabilidad de la llama	Prueba de Solubilidad (6 µg del complejo Cu-DDTC)	
	¿Se apaga la llama del instrumento?	Volumen de mezcla de disolventes máxima añadida (µL)	¿El complejo neutro Cu-DDTC fue soluble?
oct:CCl ₄ 90:10 (v/v)	Si	200	<i>Totalmente soluble</i>
oct:CHCl ₃ 90:10 (v/v)	Si	200	<i>Totalmente soluble</i>
oct:MEK 90:10 (v/v)	No	300	Parcialmente soluble
oct:MEK 85:15 (v/v)	No	300	Parcialmente soluble
oct:MEK 80:20 (v/v)	No	250	Parcialmente soluble
oct:MEK 75:25 (v/v)	No	200	<i>Totalmente soluble</i>
oct:MEK 70:30 (v/v)	Si	200	<i>Totalmente soluble</i>

Con base a los datos obtenidos en la tabla 9, se observa que las mezclas de 1-octanol con disolventes clorados probados (CCl₄ y CHCl₃) siguen apagando la llama del instrumento pese que se mejora la solubilidad del complejo. Las mezclas de 1-octanol:metil-etilcetona (oct:MEK) en diferentes proporciones mostraron estabilidad de la llama, siendo una proporción de 75:25 (v/v) la que permitió la solubilización total del complejo en la mayoría de las disoluciones preparadas.

En cuanto a las condiciones instrumentales, la longitud de onda del espectro de línea seleccionada para efectuar la lectura de la concentración de Cu (327.5 nm), fue seleccionada porque presentó menor ruido instrumental observado por la señal de la línea base del blanco respecto a las demás líneas espectrales -principalmente la línea espectral de 222.6 nm-, ya que el ruido instrumental es un factor clave cuando se trabaja con el programa de medición del instrumento “área de pico de absorbancia”, ya que es integrado por el software arrojando resultados sobreestimados en estándares y muestras con nulo o poco contenido de Cu.

Además se visualizó que a la línea espectral de 324.7 nm no era viable usar a causa de que las absorbancias integradas fueron subestimadas para todo el rango de concentraciones probadas.

El rango de concentraciones en los extractos introducidos al instrumento (oct:MEK 75:25 v/v) en el cual se mostraron absorbancias integradas adecuadas que van desde 1.50 a 24.00 $\mu\text{g mL}^{-1}$, concentraciones alcanzadas por las técnicas de ELLD y MELLD desarrolladas en el trabajo como técnica de preparación de la muestra y preconcentración.

6.2. Evaluación del sistema espectrofotométrico.

En la espectrofotometría de absorción atómica de llama, la presencia de interferencias químicas es común por el proceso en el cual se atomiza la muestra, ya que al trabajar con complejos poco solubles en fase acuosa se pueden formar compuestos de baja volatilidad y/o incrementar la presencia de equilibrios de disociación durante la atomización que reducen la cantidad de elementos atomizados. Por esto, se evaluó el sistema espectrofotométrico complejando el catión metálico en fase acuosa.

En la tabla 10, se muestra los resultados de la evaluación del sistema espectrofotométrico.

Tabla 10. Parámetros estadísticos en la evaluación del sistema espectrofotométrico.	
Parámetro	Resultado
Intervalo de trabajo	0.75 - 12.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$
Coefficiente de determinación (r^2)	0.9909
Pendiente	0.0400 \pm 0.0020
Ordenada	0.0289 \pm 0.0138
%RSD (n=3)	3.52%
Límite de Detección (LD)	0.23 $\mu\text{g mL}^{-1}$
Límite de Cuantificación (LC)	0.75 $\mu\text{g mL}^{-1}$

La linealidad y la precisión obtenidas fueron adecuadas con valores de $r^2 \geq 0.9900$ y $\%RSD \leq 5.0\%$, respectivamente. Los límites de detección y cuantificación son apropiados, siendo indicativo que no se presenta interferencia química por la complejación con el ligante de extracción con el catión metálico. No se amplió el intervalo de concentraciones medido ya que a concentraciones menores a 0.75 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dieron señales iguales al blanco y en concentraciones mayores de 12 $\mu\text{g mL}^{-1}$ el complejo mostró insolubilidad en fase acuosa. La gráfica de linealidad se encuentra en el Anexo I, Gráfico 1.

6.3. Determinación de los volúmenes de reactivos y muestra óptimos.

El volumen de la muestra óptimo fue una alícuota de 20 mL de mezcal, ya que el empleo de volúmenes mayores de muestra, provocaba una agitación deficiente o nula al añadir los otros reactivos. En la tabla 11 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 11. Volumen de muestra a probar en la selección de la alícuota para realizar la extracción.		
Alícuota de la muestra a probar (mL)	Volumen final del sistema posterior a la extracción* (mL)	¿Se genera el vórtice dentro del tubo durante la agitación?
20	32	Si
25	37	No
30	42	No

*: Volumen empleado de disolvente de extracción (DE) – disolvente de dispersión (DD) de 10 mL y de DDTC 1.5% (m/v) de 2 mL.

Se observó que cantidades de los disolventes usados se solubilizan en la fase acuosa, recuperando menor cantidad de ellos respecto a la adicionada, esto debido al disolvente de dispersión empleado y de la cantidad de etanol proveniente de la riqueza alcohólica de las muestras que favorecen este proceso; por tal razón se decidió simular el grado alcohólico de la muestra a 40% (v/v) para efectuar la técnica de extracción de las soluciones estándar para que fuese reproducible en las cantidades de disolvente de extracción recuperado durante toda la experimentación.

En la tabla 12 se presentan los resultados de la optimización de los volúmenes de disolventes de dispersión y extracción.

La selección del disolvente de extracción se basó en el volumen recuperado posterior a la extracción, siendo los sistemas con CCl₄ los que permiten recuperar un mayor volumen en todos los ensayos realizados.

Tabla 12. Disolventes de extracción (DE) y proporciones de disolvente de extracción-disolvente de dispersión (DE-DD) probados para realizar la extracción.					
DE	Volumen de DE (mL)	Volumen de DD (mL)	Volumen final de la mezcla DE-DD (mL)	Proporción DE-DD (v/v)	Volumen de fase orgánica recuperada* (mL)
CCl ₄	1.5	3.5	5.0	30:70	1.0
	2.5	5.0	7.5	33:67	1.5
	4.0	6.0	10.0	40:60	3.5
CHCl ₃	1.5	3.5	5.0	30:70	0.8
	2.5	5.0	7.5	33:67	1.2
	4.0	6.0	10.0	40:60	3.0

*: volumen aproximado con base a la graduación del tubo empleado.

Para la proporción de DE-DD se consideró la formación, grado de turbidez y estabilidad del sistema disperso, este último definido por el tiempo en el cual se empieza a separar la fase orgánica. Se observó que la proporción adecuada fue de 33:67 v/v (CCl₄:MeOH) y un volumen de 7.5 mL. En las figuras 6 y 7 se muestran ejemplos sobre el aspecto de las dispersiones generadas con CCl₄ y CHCl₃ respectivamente.

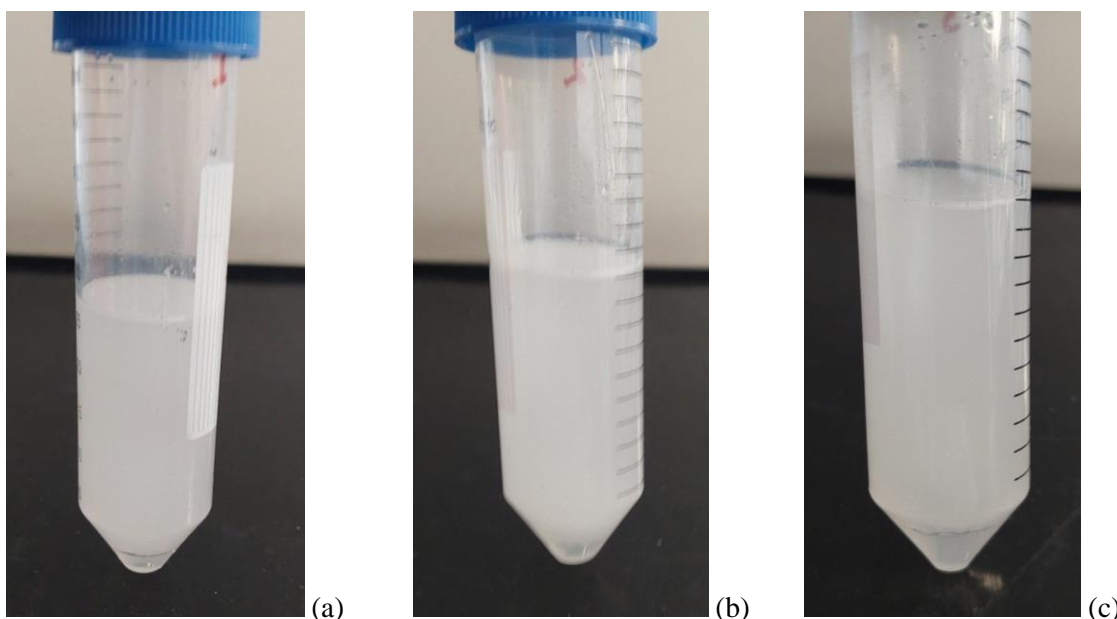


Fig 6. Aspecto de la dispersión generada durante la extracción líquido-líquido dispersiva (ELLD) usando CCl₄. (a) CCl₄:MeOH 30:70 v/v, moderada formación de la dispersión (turbidez moderada) con rápida aparición de la fase orgánica; (b) CCl₄:MeOH 33:67 v/v, gran formación de la dispersión (turbidez alta) con lenta aparición de la fase orgánica; (c) CCl₄:MeOH 40:60 v/v, poca formación de la dispersión (turbidez baja) con muy rápida aparición de la fase orgánica.

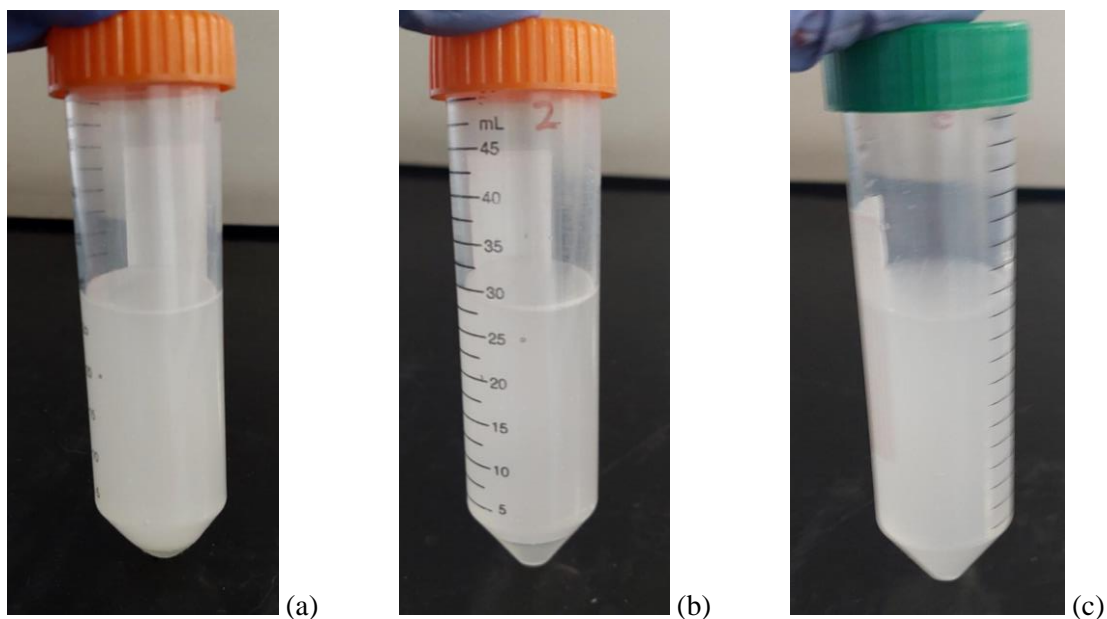


Fig 7. Aspecto de la dispersión generada durante la extracción líquido-líquido dispersiva (ELLD) usando CHCl_3 . (a) CHCl_3 :MeOH 30:70 v/v, gran formación de la dispersión (turbidez alta) con lenta aparición de la fase orgánica; (b) CHCl_3 :MeOH 33:67 v/v, poca formación de la dispersión (turbidez baja) con muy rápida aparición de la fase orgánica ; (c) CHCl_3 :MeOH 40:60 v/v, moderada formación de la dispersión (turbidez moderada) con lenta aparición de la fase orgánica.

Por último, en la tabla 13 se muestran los resultados de los tiempos necesarios para volatilizar el disolvente de extracción (CCl_4). Se estableció un volumen de 0.5 mL de CCl_4 debido a que presentó el menor tiempo de evaporación.

Volumen de fase orgánica por evaporar (mL)	Tiempo aproximado para volatilizar a sequedad la fase orgánica (min)
0.50	5
0.75	10
1.00	12
1.25	18
1.50	25

6.4. Miniaturización de la extracción.

Con las condiciones previamente optimizadas del método de extracción, para la miniaturización del método se mantuvo el mismo procedimiento cualitativo anteriormente descrito en la optimización de volúmenes de reactivos y de muestra.

La tabla 14 hace referencia sobre los volúmenes de muestra usados, más la adición de reactivos, en los cuales se podría agitar de manera adecuada en *vortex*.

Tabla 14. Volumen de muestra a probar en la selección de la alícuota para realizar la microextracción.		
Alícuota de la muestra a probar (mL)	Volumen final del sistema posterior a la extracción* (mL)	¿Se genera el vórtice dentro del tubo durante la agitación?
5	9.5	Sí
7	11.5	Sí
10	14.5	No

*: Volumen total empleado de DE-DD de 3 mL y 1.5 mL de DDTC 1.5% (m/v).

Se eligió usar una alícuota de 7 mL de muestra debido a que el volumen final del sistema de extracción permitió la generación del vórtice durante la extracción. Asimismo, la utilización de este volumen de muestra respecto a la alícuota de 5 mL favorece un incremento en la sensibilidad del método a causa de aumentar la cantidad de analito extraído presente en la muestra.

Para asegurar que el proceso de agitación fuera óptimo, se decidió disminuir el volumen de ligante considerando que se encontraba en exceso estequiométrico de al menos 80 veces respecto al cobre y a la concentración máxima monitoreada en mezcal ($7.20 \mu\text{g mL}^{-1}$). Los resultados cualitativos de agitación óptima se muestran en la tabla 15. Se empleó un volumen de 1 mL de DDTC 1.5% (m/v) con el fin de optimizar los insumos necesarios.

Tabla 15. Volumen de DDTC a probar en la selección de la alícuota para realizar la microextracción.		
Alícuota de DDTC 1.5% (m/v) a probar (mL)	Volumen final del sistema posterior a la extracción* (mL)	¿Se genera el vórtice dentro del tubo durante la agitación?
1.5	11.5	Si
1.0	11.0	Si

*: Volumen empleado de muestra 7 mL y de DE-DD de 3.0 mL.

Finalmente, se fijó el volumen de la mezcla de DE-DD con una reducción de 2.5 veces respecto a la previamente establecida en la ELLD usando solo 3.0 mL de la mezcla; el disolvente de extracción (CCl₄), como el disolvente de dispersión (MeOH) no se modificaron. Las proporciones de la mezcla de DE-DD fueron variables y la elección consistió de forma cualitativa en la formación de la dispersión (grado de turbidez, aspecto y en la estabilidad del sistema disperso posterior a su inyección). Además, de forma semicuantitativa se eligió la proporción en la cual se recuperaba una adecuada cantidad de DE posterior a la extracción por el efecto de solubilidad hacia la fase acuosa observado previamente. En la figura 8 se muestran las características visuales obtenidas al variar las proporciones de DE-DD y en la tabla 16 se visualiza el volumen recuperado de fase orgánica.

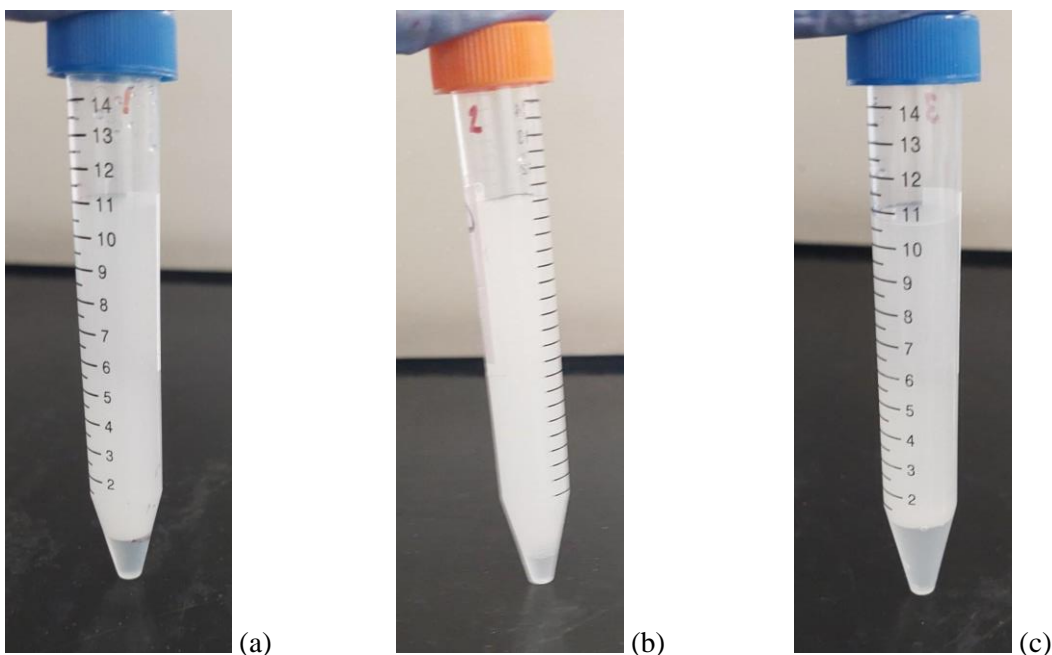


Fig 8. Aspecto de la dispersión generada durante la microextracción líquido-líquido dispersiva (MELLD). (a) CCl_4 :MeOH 17:83, moderada formación de la dispersión (moderada turbidez) con rápida aparición de la fase orgánica; (b) CCl_4 :MeOH 23:77, alta generación de la dispersión (turbidez alta) con lenta aparición de la fase orgánica; (c) CCl_4 :MeOH 33:67, baja formación de la dispersión (baja turbidez) con muy rápida aparición de la fase orgánica.

Tabla 16. Proporciones de disolvente de extracción-disolvente de dispersión (DE-DD) probados para realizar la microextracción.			
Volumen de DE (mL)	Volumen de DD (mL)	Proporción DE-DD (v/v)	Volumen de fase orgánica recuperada* (mL)
0.5	2.5	17:83	0.3
0.7	2.3	23:77	0.5
1.0	2.0	33:67	0.7

*: volumen aproximado con base a la graduación del tubo empleado.

Se seleccionó la proporción de DE-DD de 23:77 (v/v) debido a que presentó mayor turbidez, estabilidad de la dispersión respecto a las otras proporciones y un volumen de fase orgánica recuperada igual al volumen que proporcionó los tiempos más cortos de evaporación para realizar el cambio de disolvente de extracción al disolvente de resuspensión.

Con ello, el volumen final del sistema de extracción se redujo en al menos 2.5 veces, logrando la miniaturización del método. Las condiciones miniaturizadas obtenidas del método de extracción se muestran en la figura 9.



Fig 9. Diagrama de flujo de la metodología establecida para el análisis de Cu en mezcal por microextracción líquido-líquido dispersiva y espectrofotometría de absorción atómica de llama.

6.5. Desempeño del método miniaturizado.

En la tabla 17, se muestra los resultados del desempeño del método de cuantificación de Cu por microextracción líquido-líquido dispersiva y espectrofotometría de absorción atómica de llama desarrollado.

Tabla 17. Parámetros estadísticos en la evaluación del desempeño del método de cuantificación de Cu por microextracción líquido-líquido dispersiva y espectrofotometría de absorción atómica de llama.	
Parámetro	Resultado
Coefficiente de determinación (r^2)	0.9938
Intervalo de concentración en la muestra	0.45 – 7.20 $\mu\text{g mL}^{-1}$
Pendiente	0.1182 \pm 0.0049
Ordenada	0.0158 \pm 0.0200
%RSD (n=3)	2.50%
Límite de Detección (LD)	0.14 $\mu\text{g mL}^{-1}$ mezcal
Límite de Cuantificación (LC)	0.45 $\mu\text{g mL}^{-1}$ mezcal

La linealidad del método fue buena, evaluada por el coeficiente de determinación (r^2) que resultó mayor a 0.9900. El gráfico de linealidad del método se encuentra en el Anexo I, Gráfico 2.

Para evaluar la repetibilidad del método se calculó el parámetro de desviación estándar relativa (%RSD) siendo adecuado porque este valor fue menor del 3.0%; el LD y de LC establecidos para ambos métodos fueron de 0.14 y 0.45 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Referente al empleo de las 2 variantes de los métodos de extracción previamente descritos -ELLD y MELLD-, se comparó su aplicación analizando 5 muestras de mezcal (M1, M2, M3, M4 y M5), mostrando los resultados obtenidos en la figura 10. Para el análisis el quelato neutro, previamente volatilizada la fase orgánica, fueron resuspendidas con una alícuota de 50 μL de MEK y posteriormente se añadió 1-octanol hasta obtener 200 μL de la mezcla de disolventes de aspirado (oct:MEK 75:25 v/v).

Con ese ajuste la pendiente de la ecuación de la curva se modifica en un factor de 10 veces mayor haciendo más sensible el método. Este procedimiento se efectuó para obtener la concentración de muestras con bajo o nulo contenido de Cu para efectuar los ensayos de efecto matriz y recobro descritos en el apartado 5.8 “Desempeño del método miniaturizado”. En el Anexo III se muestra un ejemplo de cálculo para el análisis de Cu en cantidades traza.

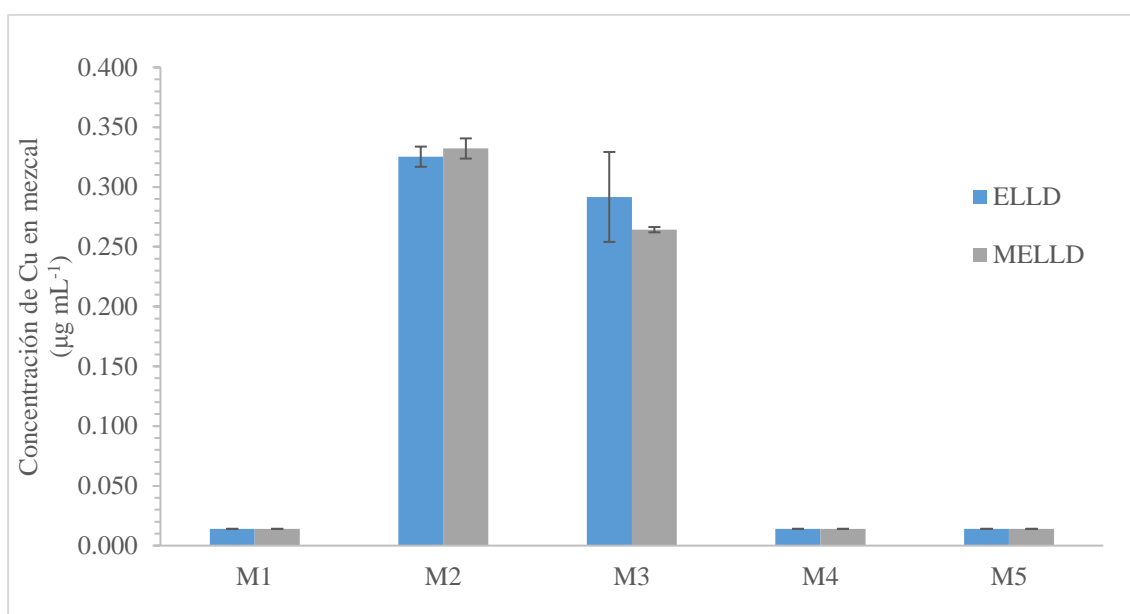


Fig 10. Comparación de dos variantes de los métodos de extracción desarrollados (Extracción Líquido-Líquido Dispersiva, ELLD y Microextracción Líquido-Líquido Dispersiva, MELLD) en el análisis de Cu en muestras de mezcal.

Se dictaminó que no hay diferencia en usar cualquiera de los dos métodos, sin embargo, el método miniaturizado resulta adecuado para el análisis de Cu en mezcal ya que reduce la generación de residuos y el consumo de disolventes, reactivos y muestra necesarios para el análisis. La comparación de parámetros de desempeño entre ambos métodos se encuentra en el Anexo II.

Se comprobó que no se presentó efecto matriz en la cuantificación de Cu bajo las condiciones del método, a causa de que el parámetro de comparación de pendientes de la curva de calibración con la muestra fortificada ($m=0.1255$) y la pendiente de la curva de calibración estándar ($m=0.1182$) fue de 1.0618, valor que se encuentra dentro del intervalo establecido de 0.8 a 1.2. El gráfico de la curva de calibración usando una muestra fortificada se encuentra en el Anexo I, Gráfico 3.

El recobro global del método miniaturizado fue de 106.14%. Este valor fue reproducible en el intervalo de concentraciones evaluado debido a que el coeficiente de determinación (r^2) fue mayor del 0.9900. El gráfico de recobro se encuentra en el Anexo I, Gráfico 4.

La técnica de microextracción líquido-líquido dispersiva desarrollada logró concentrar el analito -en forma de quelato neutro- en factores de 3.5 veces su concentración en la muestra (fase acuosa) para el análisis de cantidades traza. Asimismo, esta técnica eliminó la interferencia del etanol proveniente del grado alcohólico de la muestra, ya que mezclas agua:etanol en diferentes proporciones causan inestabilidad de la llama del instrumento empleado y permitió eliminar otras interferencias de la matriz en la cuantificación de Cu en un análisis directo de la muestra. En el Anexo III se muestra un ejemplo de cálculo de preconcentración alcanzada con la técnica de microextracción líquido-líquido dispersiva desarrollada.

Por último, se efectuó la comparación de los métodos de referencia nacional (NOM-117-SSA1-1994) e internacional (*Codex alimentarius* CXS 234-1999/AOAC 999.11) para la cuantificación de cobre aplicado a muestras de mezcal respecto al método desarrollado mediante MELLD y EAA-LL en este trabajo. Las principales diferencias son:

- a) *Cantidad de muestra*: la metodología establecida en este trabajo emplea 7 mL de mezcal, que equivalen entre 7.5 y 9.0 g, aproximadamente, la cual es una cantidad de muestra menor a la requerida en los análisis descritos por la NOM-117-SSA1-1994 (40 g) y por el *Codex alimentarius* CXS 234-1999/AOAC 999.11 (10 a 20 g). Lo anterior demuestra que el método desarrollado es más sensible respecto a los métodos de referencia.

b) *Preparación de la muestra y técnica de análisis:* En lo descrito en los métodos de referencia, se efectúa una digestión ácida (por vía húmeda o vía seca), la cual conlleva riesgos asociados al manejo de sustancias químicas peligrosas -principalmente ácidos fuertes concentrados-, mientras que la MELLD es una técnica más segura, ya que no utiliza ese tipo de sustancias y aunque los disolventes utilizados tienen cierta toxicidad, los volúmenes son pequeños siendo más amigables con el analista.

La técnica de EAA-LL y el método de cuantificación para los tres métodos comparados es la curva de calibración directa. Sin embargo, para lo descrito en el presente trabajo se efectúa la medición de área de pico de absorbancia y no la medición de absorbancia por integración como cumplimiento de las características de los métodos de referencia.

c) *Reactivos e insumos necesarios para el análisis:* las técnicas descritas en los métodos de referencia requieren de volúmenes grandes de ácidos fuertes concentrados para la elaboración de soluciones requeridas durante el ensayo; asimismo la cantidad de reactivos requeridos de estos son a escala de volúmenes de mililitros (mL), considerándose ensayos a macro escala. Mientras que el método desarrollado utiliza una técnica miniaturizada, la cual emplea volúmenes de reactivos a escala de microlitros (μL) optando como una alternativa menos costosa por la cantidad de insumos necesarios para el análisis.

d) *Infraestructura mínima para el análisis:* la infraestructura mínima requerida para efectuar las operaciones descritas en el presente trabajo durante la etapa de la MELLD consiste en equipo de laboratorio elemental como un agitador *vortex*, centrifuga y una campana extracción de humos, gases y vapores, infraestructura que no se requiere de una capacitación exhaustiva para su manejo.

Para los métodos de referencia se requiere de equipos en los cuales se pueda efectuar la digestión ácida a temperaturas altas como parrillas de calentamiento, mecheros Bunsen/Fisher, mantillas de calentamiento, entre otras. Además de campana de extracción de humos, gases y vapores de suficiente capacidad para el montaje del dispositivo de digestión, y equipos de calcinación (mufla). La mayoría de estos equipos requieren una capacitación más especializada para realizar el análisis ya que el manejo de estos posee alto riesgo a la integridad del analista.

e) *Duración del análisis*: los métodos descritos en la NOM-117-SSA1-1994 y en el *Codex alimentarius* CXS 234-1999/AOAC 999.11 son procedimientos exhaustivos, los cuales requieren de evaporar la muestra para la eliminación de agua y de una calcinación para la eliminación de sustancias orgánicas. Esto hace que el tiempo de análisis de una muestra se prolongue hasta por 35 h y la mayor parte del tiempo se emplea en la preparación de la muestra, siendo uno de los principales inconvenientes de estos procedimientos. La metodología desarrollada en este trabajo, es más rápida ya que las muestras se preparan en aproximadamente 20 minutos y, además favorece la preconcentración de la muestra en 3.5 veces en la fase orgánica. No obstante, una de las desventajas del método desarrollado es que, si se presenta alguna falla del instrumento, como obstrucción del capilar o sofocación de la llama, al ser una técnica destructiva se deberá preparar de nuevo la mezcla de inyección (50 μ L quelato en MEK + 150 μ L oct) o en caso de utilizar todo el extracto en MEK, de nuevo todo el procedimiento de extracción. No obstante, lo anterior implicaría un tiempo que sigue siendo menor al de los métodos de referencia.

f) *Residuos generados*: En adicional, el método desarrollado para la cuantificación de Cu en mezcal posee la ventaja ser más ecológico, ya que al ser una técnica miniaturizada la cantidad de residuos generados es menor en comparación a los métodos a macro escala, lo que se asocia con una disminución de los riesgos durante el manejo, contención y tratamiento de los mismos.

Los residuos generados durante la MELLD por análisis de una muestra consisten en volúmenes aproximados de 10 mL de una mezcla de metanol:agua de composición cercana a 25:75 (v/v), 10 mL de residuos acuosos de ligante DDTC no complejado, y 0.5 mL de CCl_4 liberados a la atmosfera. En comparación, los métodos de referencia, generan volúmenes de entre 30 a 40 mL de residuos acuosos de pH menor o igual a 1.0, así como la generación de gases tóxicos provenientes del proceso de digestión (principalmente $\text{NO}_{2(g)}$).

En la en la tabla 18, se resume la comparación de las características descritas entre los métodos de referencia y el método desarrollado.

En general, la metodología presentada en este trabajo posee buenas perspectivas para ser considerada como una propuesta metodológica alterna más rápida y ecológica para la cuantificación de cobre en muestras de mezcal, pese a que el método debe validarse para realizar la comparación de resultados experimentales respecto a los métodos de referencia vigentes.

Tabla 18. Comparación de las características descritas en métodos de referencia nacional e internacional con respecto al método desarrollado en el presente trabajo para la cuantificación de Cu en mezcal.

Metodología	Cantidad de muestra	Preparación de muestra/ Técnica de análisis.	Reactivos Necesarios/ Cantidad	Infraestructura necesaria	Duración del análisis	Residuos mayoritarios generados
NOM-117-SSA1-1994	40 g	- Digestión - EAA-LL ▫ CC-D ▫ CC-AP	HNO ₃ concentrado (≥ 10 mL) HCl 1N (5 mL) H ₂ O (~50 mL)	<ul style="list-style-type: none"> • Matraz Kjeldhal • Dispositivo calentador (Gas o eléctrico) • Campana de extracción • Mufla 	<p>3-12 h (Vía húmeda)</p> <p>~35 h (Vía Seca)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Residuos acuosos ácidos (pH≤1.0) • Gases tóxicos (NO₂)
<i>Codex alimentarius</i> CXS 234-1999/ AOAC 999.11	10-20 g	- Digestión - EAA-LL ▫ CC-D	HCl 6N (5 mL) HNO ₃ 0.1M (10-30 mL) H ₂ O (3 mL)	<ul style="list-style-type: none"> • Dispositivo calentador (Gas o eléctrico) • Campana de extracción • Mufla 	~12 h	<ul style="list-style-type: none"> • Residuos acuosos ácidos (pH≤1.0)
Presente trabajo	7 mL (7.5-9.0 g, aprox.)	- MELLD - EAA-LL ▫ CC-D*	DDTC 1.5 % (m/v) (1 mL) MeOH (2.3 mL) CCl ₄ (0.7 mL) H ₂ O (10 mL) 1-Octanol (150 µL) MEK (500 µL)	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Vortex</i> • Centrifuga • Campana de extracción 	15-20 min	<ul style="list-style-type: none"> • Mezcla MeOH: H₂O • Residuos acuosos DDTC no complejado

MEK: Metil-etilcetona; EAA-LL: *Espectrofotometría de Absorción Atómica de Llama*; CC-D: *Curva de Calibración Directa (medición de absorbancia por integración)*; CC-AP: *Curva de Calibración por Adiciones Patrón (medición de absorbancia por integración)*; MELLD: *microextracción líquido-líquido dispersiva*; CC-D*: *Curva de calibración directa (medición de área de pico de absorbancia)*.

6.6. Análisis de muestras de mezcal.

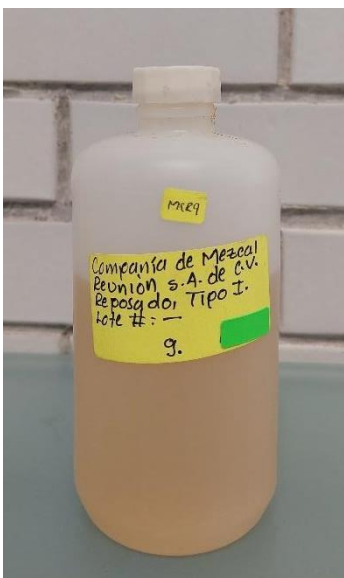
Los métodos desarrollados fueron utilizados en la cuantificación de Cu en 10 muestras de mezcal procedentes de dos diferentes estados de la República Mexicana. Las muestras analizadas se muestran en la figura 11 y se clasificaron conforme a la normatividad mexicana aplicable (NOM-070-SCFI-2016) y su marbete de venta.

Las concentraciones de Cu en las muestras analizadas se encontraron a concentraciones traza, en 8 de ellas se encuentran por debajo del límite máximo permitido (2.0 µg/mL) establecido en la normatividad nacional aplicable (NOM-117-SSA1-1994). De igual forma, con base a la normatividad internacional aplicable (*FDA's Toxic Elements in Food and Foodware and Radionuclides in Food*, 2021) todas las muestras analizadas se encuentran dentro de especificación con concentraciones menores a 3.5 µg/mL. Los resultados de concentración de Cu en muestras de mezcal se resumen en la tabla 19 y se muestran de forma gráfica en el Anexo I, Gráfico 5.

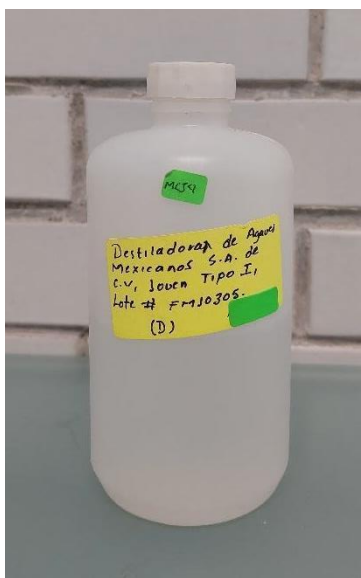
Tabla 19. Aplicación del método desarrollado de microextracción líquido-líquido dispersiva en diferentes muestras de mezcal.		
Muestra	Origen (Estado de la República Mexicana)	Concentración de Cu (µg mL ⁻¹ ± IC _{95%})
M1	Oaxaca	<0.014
M2	Oaxaca	0.332 ± 0.036
M3	Guerrero	0.264 ± 0.009
M4	Oaxaca	<0.014
M5	Oaxaca	<0.014
MCR9	Oaxaca	1.166 ± 0.052
MCJ4	Oaxaca	1.964 ± 0.275
MCR2	Oaxaca	1.356 ± 0.146
MJ2	Oaxaca	0.827 ± 0.164
MCJ1	Oaxaca	2.805 ± 0.310



Fig 11. Muestras extraídas con el método de microextracción líquido-líquido dispersiva y analizadas por espectrofotometría de absorción atómica de llama. (a) Muestra 1 (M1): Mezcal joven comercial, Oaxaca; (b) Muestra 2 (M2): Mezcal artesanal destilado con pechuga de agave, Oaxaca; (c) Muestra 3 (M3): Mezcal artesanal, Guerrero; (d) Muestra 4 (M4): Mezcal artesanal destilado con gusano de maguey, Oaxaca; (e) Muestra 4 (M4): Mezcal abocado comercial, Oaxaca.



(f)



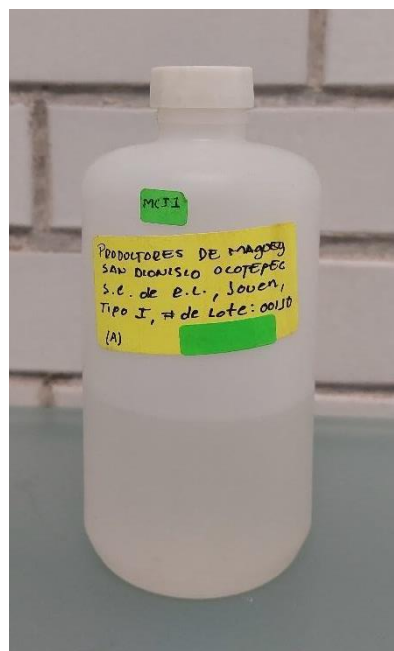
(g)



(h)



(i)



(j)

Fig 11 (Continuación). Muestras extraídas con el método de microextracción líquido-líquido dispersiva y analizadas por espectrofotometría de absorción atómica de llama. (f) Muestra 6 (MCR9): Mezcal reposado, Oaxaca; (g) Muestra 7 (MCJ4): Mezcal joven, Oaxaca; (h) Muestra 8 (MCR2): Mezcal reposado, Oaxaca; (i) Muestra 9 (MJ2): Mezcal artesanal joven, Oaxaca; (j) Muestra 10 (MCJ1): Mezcal joven, Oaxaca.

7. CONCLUSIONES

- Se desarrolló un método miniaturizado por MELLD seguida de EAA-LL que permite la cuantificación de Cu en muestras de mezcal que resulta ser una alternativa más ecológica y rápida respecto al método oficial de análisis.
- Se determinaron como volúmenes óptimos 1.0 mL de DDTC 1.5% (m/v), 7.0 mL de muestra, 3.0 mL de una mezcla CCl₄:MeOH 23:77 (v/v) y una alícuota de fase orgánica con el complejo neutro extraído a volatilizar de 0.5 mL.
- Se fijaron como condiciones de introducción de la fase orgánica de la muestra extraída por microextracción líquido-líquido dispersiva en el análisis de cobre al instrumento de espectrofotometría de absorción atómica de llama un volumen de 200 µL de una mezcla 1-octanol:metil-etilcetona 75:25 (v/v).
- El método desarrollado presentó buena linealidad ($r^2 > 0.9900$) y precisión (%RSD < 3.0%, n=3), límites de detección de 0.14 µg mL⁻¹ y límite de cuantificación de 0.45 µg mL⁻¹.
- El recobro observado fue de 106.14% para el método miniaturizado y no se presentó efecto matriz en la cuantificación de Cu en mezcal bajo las condiciones de microextracción líquido-líquido dispersiva propuestas.
- No hubo diferencia en emplear cualquiera de las dos variantes del método de extracción descritas, ELLD y MELLD, siendo este último el más eficiente porque disminuye el gasto de insumos y la generación de residuos.
- El método desarrollado fue aplicado a 10 muestras de mezcal procedentes de los estados de Oaxaca y Guerrero, encontrando que 8 de ellas cumplieron con la especificación nacional y todas cumplen con la normatividad internacional.

8. PERSPECTIVAS

Como perspectivas del presente trabajo, se validará el método de cuantificación/extracción, además de efectuar estudios de robustez del método (pH, temperatura, cantidad de ligante, ciclo de lavado, ciclo de centrifugado, etc.), la aplicación de hacia otros analitos extraíbles presentes en la muestra, así como realizar el comparativo con los métodos de referencia establecidos en la normatividad nacional e internacional respecto al desarrollado en esta tesis.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agilent Technologies, Moffett, J. (ed.) (1991) Guidelines for Using Non-Aqueous Solvents in Atomic Absorption Spectrometry. Recuperado el 10 de febrero del 2022 de: <https://cutt.ly/dA2Mngv>

Agilent Technologies, McKenzie, T. (ed.) (1980) Safety Practices Using Organic Solvents in Flame Atomic Absorption Spectroscopy. Recuperado el 10 de febrero del 2022 de: <https://cutt.ly/CA2MoAO>

Agilent Technologies. (2017). Flame Atomic Absorption Spectrometry Analytical Methods. Recuperado el 10 de enero del 2022 de: <http://www.agilent.com>

Ajtony, Z., Laczai, N., Dravec, G., Szoboszlai, N., Marosi, Á., Marlok, B., Strel, C., Bencs, L. (2016). Fast and direct screening of copper in micro-volumes of distilled alcoholic beverages by high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Food Chemistry*. 213:799–805.

Allan, JE. (1961) The use of organic solvents in atomic absorption spectrophotometry. *Spectrochimica Acta*.17(4):467-473.

Association of Official Analytical Chemists, AOAC (2002) Official Method 999.11 Determination of Lead, Cadmium, Copper, Iron and Zinc in Foods. Atomic Absorption Spectrophotometry after Dry Ashing. Recuperado el 16 de enero del 2021 de: <https://cutt.ly/cIRONX5>

Bautista, J. & Ramírez, J. (2008). Agricultura y pluriactividad de los pequeños productores de agave en la región del mezcal, Oaxaca, México. *Agricultura Técnica en México*. 34(4): 443-451.

Bonic, M., Tesevic, V., Nikicevic, N., Cvejic, J., Milosavljevic, S., Vajs, V., Mandic, B., Urosevic, I., Velickovic, M., Jovanic, S. (2013). Heavy metals content in Serbian old plum brandies. *Journal of the Serbian Chemical Society*. 78(7):933–945.

Cantle, JE. (1982) Atomic Absorption Spectrometry. Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry. Vol 5. Elsevier.

Careón-Álvarez, A., Castañeda Valderrama, R., Ávalos Martínez, J., Estrada-Vargas, A., Gómez-Salazar, S., Barcena-Soto, M., Casillas, N. (2012) Corrosion of Aluminium, Copper, Brass and Stainless Steel 304 in Tequila. *Int J. Electrochem Sci*. 7:7877-7887.

Ceballos-Magaña, SG., Jurado, JM., Martín, MJ., Pablos, F. (2009). Quantitation of Twelve Metals in Tequila and Mezcal Spirits as Authenticity Parameters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57(4): 1372–1376.

Coppel, E. (13 de mayo del 2018) Del campo a la mesa: 14 imágenes de cómo el maguey se convierte en mezcal. El País. Recuperado el 07 de febrero del 2021 de: <https://cutt.ly/mA2gZrM>

da Silva Burato, JS., Vargas Medina, DA., de Toffoli, AL., Vasconcelos Soares Maciel, E., Lanças, FM. (2019). Recent advances and trends in miniaturized sample preparation techniques. *J Separation Science*. 43: 202-225

De León-Rodríguez, A., González-Hernández, HL., Barba-De la Rosa, AP., Escalante-Minakata, P., López, MG. (2006). Characterization of volatile compounds of Mezcal, an ethnic alcoholic beverage obtained from *Agave salmiana*. *J. Agric. Food Chem.* 54:1337-1341.

De los Ríos- Deras, GC., Rutiaga-Quñones, OM., López -Miranda, JB., Páez-Lerma, M., Soto-Cruz, NO. (2015) Improving *Agave duranguensis* must for enhanced fermentation. C/N Ratio effects on mezcal composition and sensory properties. *Rev. Mex de Ingeniería Química*. 14(2): 363-371.

Destiladoresdecobre.com.mx (2020) Destiladores de Cobre -Galería de productos. Recuperado el 07 de febrero del 2022 de: <https://cutt.ly/GA2gDdI>

Doner, G. & Ege, A. (2005). Determination of copper, cadmium and lead in seawater and mineral water by flame atomic absorption spectrometry after coprecipitation with aluminum hydroxide. *Analytica Chimica Acta*. 547(1):14–17.

Fonseca Varela, M. & Chalita Tovar, LE. (2021) Evaluación financiera de producción de agave y mezcal: caso de estudio Caltepec, Puebla. *Rev Mex Ciencias Agrícolas*. 12(2):263-273.

Froes-Silva, R., Neto, WB., Nascente, CC., da Silva, JBB. (2015). Determination of Metals in Brazilian Ready-to-Drink Beverages (Ice Drinks) by Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry. *Atomic Spectroscopy*. 36(1):1-6.

Garvin, AJ. (2021). Use of Copper as Food Contact Surfaces for Alcoholic Beverages within Retail Food Establishments. International Food Protection Training Institute's Fellowship in Food Protection (IFPTI), Cohort IX. Recuperado el 15 de enero del 2021 de: <https://cutt.ly/8Iukj7Y>.

Gobierno de México- Secretaría de Gobernación, SEGOB- Diario Oficial de la Federación, DOF. (18 de agosto del 2016) Norma Oficial Mexicana NOM-070-SCFI-2016, “Bebidas Alcohólicas-Mezcal-Especificaciones”. Recuperado el 12 de enero del 2022 de: <https://cutt.ly/8U2CFyP>

Gobierno de México- Secretaría de Gobernación, SEGOB- Diario Oficial de la Federación, DOF. (30 de noviembre de 1995) Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994, “Salud Ambiental, Agua para Uso y Consumo Humano-Límites Permisibles de Calidad y Tratamiento a que debe someterse el Agua para su Potabilización”. Recuperado el 15 de enero del 2022 de: <https://cutt.ly/LIyBuIi>

Gobierno de México- Secretaría de Gobernación, SEGOB- Diario Oficial de la Federación, DOF- Secretaría de Salud, Ssa. (29 de junio de 1995) Norma Oficial Mexicana NOM-117-SSA1-1994, “Bienes y servicios. Método de prueba para la determinación de cadmio, arsénico, plomo, estaño, cobre, fierro, zinc y mercurio en alimentos, agua potable y agua purificada por espectrometría de absorción atómica”. Recuperado el 16 de enero del 2022 de: <https://cutt.ly/nIRV1xH>

Gobierno de México- Secretaría de Gobernación, SEGOB- Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial, IMPI. (08 de agosto del 2018). Conoce las modificaciones a la Declaración General de Protección a la Denominación de Origen “Mezcal”. Recuperado el 12 de enero del 2022 de: <https://cutt.ly/DU2VD4f>

Gobierno de México- Secretaría de Gobernación, SEGOB- Instituto Nacional de los Pueblos Indígenas, INPI- Comisión Nacional para el Desarrollo de Pueblos Indígenas, CDI. Patrón Esquivel, CA. (ed.) (2015). Mezcal. Alimentos y Bebidas de los Pueblos Indígenas de México. 2. Recuperado el 13 de enero del 2022 de: <https://cutt.ly/UU4z7R4>

Gobierno de México- Secretaría de Gobernación, SEGOB- Secretaría de Salud, Ssa - Diario Oficial de la Federación, DOF. (17 de julio del 2006) Acuerdo por el que se determinan los aditivos y coadyuvantes en alimentos, bebidas y suplementos alimenticios, su uso y disposiciones sanitarias. Recuperado el 12 de enero del 2022 de: <https://cutt.ly/3U2BfDm>

Gobierno de México- Secretaría de Gobernación, SEGOB- Secretaría de Economía, SE. (07 de diciembre del 2015). Se amplía la zona de denominación de origen del Mezcal. Recuperado el 12 de enero del 2022 de: <https://cutt.ly/tU2VzWa>

Gobierno de México- Secretaría de Gobernación, SEGOB- Secretaría de Relaciones Exteriores, SRE, Dirección General Adjunta de Planeación Estratégica y Análisis Sectorial, Dirección Ejecutiva de Análisis Sectorial (marzo del 2015). Monografía del Mezcal. Recuperado el 12 de enero del 2022 de: <https://cutt.ly/hU2NvIv>

Gobierno de México- Secretaría de Gobernación, SEGOB- Secretaría de Relaciones Exteriores, SER (06 de diciembre del 2016). Mezcal con M de México. Recuperado el 12 de enero del 2022 de: <https://cutt.ly/QU2N2ci>

Gobierno de México- Secretaría de Gobernación, SEGOB- Secretaría de Relaciones Exteriores, SER (2015). Denominación de Origen del Mezcal. Recuperado el 12 de enero del 2022 de: <https://cutt.ly/5U2Mbj2>

Gobierno de México- Secretaría de Gobernación, SEGOB- Secretaría de Salud, Ssa-Diario Oficial de la Federación, DOF. (10 de octubre del 2008) Norma Oficial Mexicana NOM-251-SSA1-2009, “Prácticas de Higiene para el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios”. Recuperado el 13 de enero del 2022 de: <https://cutt.ly/rU2M3p1>

Gobierno de México- Secretaría de Gobernación, SEGOB. (09 de agosto del 2018). Modificación a la Declaración General de Protección de la Denominación de Origen “Mezcal”. Recuperado el 12 de enero del 2022 de: <https://cutt.ly/YG3JELU>

Gobierno de México- Secretaría de Gobernación, SEGOB. (28 de noviembre de 1994). Declaración General de Protección de la Denominación de Origen “Mezcal”. Recuperado el 12 de enero del 2022 de: <https://cutt.ly/eU2BO9X>

Gobierno de México-Secretaría de Gobernación, SEGOB- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, SAGARPA (2017). Agave Tequilero y Mezcalero Mexicano- Planeación Agrícola Nacional 2017-2030. Recuperado el 09 de febrero del 2022 de: <https://cutt.ly/KA2beDQ>

Gobierno de México-Secretaría de Gobernación, SEGOB Secretaría de Economía, SE (15 de julio del 2021). ¿Sabes cómo te benefician las Normas Oficiales Mexicanas? Recuperado el 15 de enero del 2022 de: <https://cutt.ly/rIeOIIt>

Gobierno de México-Secretaría de Gobernación, SEGOB Secretaría de Economía, SE (28 de julio del 2021). La Secretaría de Economía reconoce al nuevo presidente del Consejo Mexicano Regulador de la Calidad del Mezcal. Recuperado el 15 de enero del 2022 de: <https://cutt.ly/JIeOXpO>

González Vizuet, JA. (2017) El mezcal: una revisión química, tecnológica, e histórica. Trabajo Monográfico de Actualización. Nivel Licenciatura- Química de Alimentos. Facultad de Química- Universidad Nacional Autónoma de México.

Gorman, LS. & Boosalis, MG. (2019) Capítulo 33 “Evaluación nutricional. En: Bishop, ML., Fody, EP., Schoeff, LE. (2019). Química Clínica. Principios, técnicas y correlaciones. 8ª ed. Wolters Klower.

Gschaedler Mathis, AC., Gallardo Valdez, J., Villanueva Rodríguez, S. (2020). El proceso de elaboración del mezcal en el estado de Michoacán. En: Gallardo Valdez, J. (ed.) (2020) La Producción de Mezcal en el estado de Michoacán. 2ª ed. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C., CIATEJ.

Gürkan, R. & Altunay, N. (2013) A reliable method of quantification of trace copper in beverages with and without alcohol by spectrophotometry after cloud point extraction. *Química Nova*. 36(8): 1146-1154.

Hernández López, JJ. (2017). El mezcal como patrimonio social: de indicadores geográficos genéricos a denominaciones de origen regionales. *Em Questão*. 24(4): 404-433

Ibañez, JG., Carreon-Alvarez, A., Barcena-Soto, M., Casillas, N. (2008) Metals in alcoholic beverages: A review of suruses, effects, concentrationm removal, speciation, and analysis. *J Food Composition and Analysis*. 21(8):672-683.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía, INEGI (junio 2019) Conociendo la Industria del Tequila y Mezcal. Colección de estudios sectoriales y regionales. Recuperado el 09 de febrero del 2021 de: <https://cutt.ly/bA2vBC4>

Ivanova-Petropulos, V., Balabanova, B., Bogeva, E., Frentiu, T., Ponta, M., Senila, M., Gulaboski, R., Irimie, FD. (2017). Rapid Determination of Trace Elements in Macedonian Grape Brandies for Their Characterization and Safety Evaluation. *Food Anal Methods*. 10:459-468.

Iwegbue, CMA., Overah, LC., Basse, FI., Martincigh, BS. (2014). Trace metals concentration in distilled alcoholic beverages and liquors in Nigeria. *J Inst Brew*. 120:521-528.

Kokosa, JM. (2020) Capitulo 16 “Dispersive Liquid-Liquid Microextraction”. En: Poole, CF. (ed). (2020). Liquid-Phase Extraction. Handbooks in Separation Science. Elsevier Inc.

Lab-training.com (11 de agosto de 2015) Organic Solvents in Atomic Absorption Spectroscopy. Recuperado el 10 de febrero del 2022 de: <https://cutt.ly/1A2N1Gz>

Landner, L., Lindstrom, L. (1999). Copper in society and in the environment. Environmental Research Group

Lewis, J. (2019). *Codex* nutrient reference values. Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO – World Health Organization, WHO. Recuperado el 14 de enero de 2022 de: <https://cutt.ly/GU5fjEP>

Li, P. & Hardy, JK. (1999) Characterization and classification of Ohio wines using multivariate data analysis. *J Wine Research*. 10(3):197-206.

Mendigucgía, C., Moreno, García-Vargas, M. (2002) Determination of copper in seawater based on a liquid membrane preconcentration system. *Anal Chimica Acta*. 460(1):35-40.

Mezcal.org- Mezcal, Normas y Leyes (27 de enero del 2021) Modificación a la Denominación de Origen Mezcal. Inclusión de Tamaulipas. Recuperado el 12 de enero del 2022 de: <https://cutt.ly/jU2MF7F>

Mohammed, AS., Ramadan, GA., Abdelkader, AI., Gadalla, SA., Ayoub, MM., Alabdulmalik, NA., AL Baker, WA. (2020) Evaluation of method performance and matrix effect for 57 commonly used herbicides in some vegetable families using LC-MS/MS determination. *Cogent Food & Agriculture*, 6(1):1815287

Molina-Guerrero, JA., Botello-Álvarez, JE., Estrada-Baltazar, A., Navarrete-Bolaños JL., Jiménez-Islas, H. (2007). Volatile Components in Mezcal. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 6: 41-50.

Morrison, GH & Freiser, H. (1957) *Solvent Extraction in Analytical Chemistry*. Wiley. 157-181.

National Center for Biotechnology Information, NCBI -PubChem (2022a). Element Summary for AtomicNumber 29, Copper. Recuperado el 13 de enero del 2022 de: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/element/Copper>.

National Center for Biotechnology Information, NCBI- PubChem (2022). Compound Summary for CID 23978, Copper. Recuperado el 13 de enero del 2022 de: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Copper>.

Nazario, CED., Fumes, BH., da Silva, MR., Lanças, FM. (2017) New materials for sample preparation techniques in bioanalysis. *J. Chromatogr.* 1043: 81–95.

Pal, A. (2013). Copper toxicity induced hepatocerebral and neurodegenerative diseases: An urgent need for prognostic biomarkers. *NeuroToxicology*. 40:97–10.

Pang, XN., Li, ZJ., Chen, JY., Gao, LJ., Han, BZ. (2017). A Comprehensive Review of Spirit Drink Safety Standards and Regulations from an International Perspective. *Journal of Food Protection*. 80(3):431–442.

Pérez Hernández, E., Chávez Praga, MC., González Hernández, JC. (2016). Revisión del agave y el mezcal. *Rev Colomb Biotecno*. 18(1): 148-164.

Quigley, A., Cummins, W., Connolly, D. (2016). Dispersive Liquid-Liquid Microextraction in the Analysis of Milk and Dairy Products: A review. *J Chem*. 1-12.

Reilly, C. (2002) *Metal Contamination of Food Its Significance for Food Quality an Human Health*. 3a ed. Blackwell Science.

- Robinson, JW. (1960) Atomic Absorption Spectroscopy. *Analytical Chemistry*. 32(8): 17A-29A.
- Rodrigues, SM., Otero, M., Alves, AA., Coimbra, J., Coimbra, MA., Pereira, E., Duarte AC. (2011) Elemental analysis for categorization of wines and authentication of their certified Brand of origin. *J Food Composition and Analysis*. 24(4): 549-562.
- Rosa, FC., Duarte, FA., Paniz, JNG., Heidrich, GM., Nunes, MAG., Flores, EMM, Dressler, VL. (2015). Dispersive liquid-liquid microextraction: An efficient approach for the extraction of Cd and Pb from honey and determination by flame atomic absorption spectrometry. *Microchemical Journal*. 123: 211-217.
- Royer A., Sharman T. (29 de junio del 2021). Copper Toxicity. StatPearls. Treasure Island. Recuperado el 14 de enero del 2022 de: <https://cutt.ly/WU5QEzX>
- Sachdev, SL. & West, PW. (1970) Concentration of Trace Metals by Solvents Extraction and Their Determination by Atomic Absorption Spectrophotometry. *Environmental Science & Technology*. 4(9):749-751.
- Sajid, M., Płotka-Wasyłka, J. (2018) Combined extraction and microextraction techniques: recent trends and future perspectives. *Trends Anal. Chem.* 103: 74-86.
- Sandell, EB. (1959) *Colorimetric Metal Analysis*. Interscience. 162.
- Saraji, M. & Boroujeni, MK. (2014) Recent developments in dispersive liquid-liquid microextraction. *Anal Bioanal Chem*. 406:2027-2066.
- Scheiber, I., Dringen, R., Mercer JF. (2013) Copper: effects of deficiency and overload. *Met Ions Life Sci*. 13:359-387.
- Scheinvar Gottdiener, E. (2019) Agave, mezcal tradicional, cultura y diversidad. OIKOS-UNAM. 23. Recuperado el 07 de febrero del 2022 de: <https://cutt.ly/pA2sVFd>
- Seeger, TS., Rosa, FC., Bizzi, CA., Dressler, VL., Flores, EMM., Duarte, FA. (2015). Feasibility of dispersive liquid-liquid microextraction for extraction and preconcentration of Cu and Fe in red and white wine and determination by flame atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 105: 136-140.
- Shachdev, SL., Robinson, JW., West, PW. (1967) Effect of mixed organic solvents on atomic absorption spectrophotometry of refractory metals. *Analytica Chimica Acta*. 337: 156-163.

Soufleros, EH., Mygdalia, SA., Natskoulis, P. (2005). Production process and characterization of the traditional Greek fruit distillate “Koumaro” by aromatic and mineral composition. *Journal of Food Composition And Analysis*. 18:699-716.

Szivós, K. (1980) The application of organic solvents in atomic absorption spectrophotometry. *Period Polytech Chem Eng*. 25:121-132.

Terol, A., Paredes, E., Maestre, SE., Prats, S., Todolí, JL. (2011). Alcohol and metal determination in alcoholic beverages through high-temperature liquid-chromatography coupled to an inductively coupled plasma atomic emission spectrometer. *Journal of Chromatography A*. 1218(22):3439–3446.

trasxco.es- Traxco Componentes para sistemas de riego Pivot (11 de julio de 2016) Cultivo de agave. Recuperado el 08 de enero del 2021 de: <https://cutt.ly/kA2aDIc>

Uddin, MN., Abdus Salam, M., Hossain, MA. (2013). Spectrophotometric measurement of Cu(DDTC)₂ for the simultaneous determination of zinc and copper. *Chemosphere*. 90(2): 366–373.

United States Government- Department of Health and Human Services, HHS -Food and Drugs Administration,FDA (2017) Food Code. Recuperado el 15 de enero del 2021 de: <https://cutt.ly/zIeGGhi>

United States Government- Environment Protection Agency, EPA (1991) Maximum contaminant level goals and national primary drinking water regulations for lead and copper. Recuperado el 15 de enero del 2021 de: <https://cutt.ly/6IyCOBq>

United States Government- Food and Drugs Administration,FDA (08 de abril del 2021) Metals and your Food. Recuperado el 15 de enero del 2021 de: <https://cutt.ly/UIeGhYm>

United States Government- Food and Drugs Administration,FDA (28 de marzo del 2018) What We Do. Recuperado el 15 de enero del 2021 de: <https://cutt.ly/XIeP2w7>

US- Department of Health and Human Services, HHS- Agency for Toxic Substances and Disease Registry, ATSDR. (septiembre de 2004) *Toxicological profile for copper*. Recuperado el 14 de enero del 2022 de: <https://cutt.ly/jU5slAH>

US -Food and Drugs Administration, FDA (1994) Code of Federal Regulations. Título 21 “Food and Drugs” Capítulo 1 Food and Drugs Administration. Recuperado el 14 de enero del 2022 de: <https://cutt.ly/2U5dXPC>

US -Food and Drugs Administration, FDA- Gray, PJ., Mindak, WR, Cheng, J. (febrero del 2020) Elemental Analysis Manual. Capítulo 4.7 “Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometric Determination of Arsenic,

Cadmium, Chromium, Lead, Mercury, and Other Elements in Foods Using Microwave Assisted Digestion. Recuperado el 16 de enero del 2022 de: <https://cutt.ly/OITeYiC>

Vera Guzmán, AM., López, MG., Chávez-Servia, JL. (2012) Chemical composition and volatile compounds in the artesanal fermentation of mezcal in Oaxaca, México. *African J Biotechnol.* 11(78):14334-14353.

World Health Organization, WHO (2017) Guidelines for drinking-water quality. 4^a ed. Recuperado el 15 de enero del 2021 de: <https://cutt.ly/iIyVvVr>

World Health Organization, WHO- Evaluation of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, JECFA. (1982) Copper. Recuperado el 15 de enero del 2021 de: <https://cutt.ly/DIeUedd>

World Health Organization, WHO- Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO- *Codex Alimentarius* (2019) General Standard for Contaminants and Toxins in Food and Feed (GSCTFF), CXS 193-1995. Recuperado el 15 de enero del 2021 de: <https://cutt.ly/1IeUYZG>

World Health Organization, WHO- Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO- *Codex Alimentarius* – Joint FAO/WHO Food Standards Programme (2001) Report of the 33rd Session of the Codex Committee on Food Additives and Contaminants. Recuperado el 15 de enero del 2021 de: <https://cutt.ly/NIePmsN>

World Health Organization, WHO- Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO- *Codex Alimentarius* (1999) Recommended Methods of Analysis and Sampling, CXS 234-1999. Recuperado el 16 de enero del 2021 de: <https://cutt.ly/JIR2IID>

World Health Organization, WHO. (2004) Copper in Drinking-water. Background for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. Recuperado el 14 de enero del 2022 de: <https://cutt.ly/dU5f23i>

Zgoła-Grześkowiak, A. & Grześkowiak, T. (2011). Dispersive liquid-liquid microextraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* 30(9): 1382-1399.

Zuloaga, O., Olivares, M., Navarro, P., Vallejo, A., Prieto, A. (2015) Dispersive liquid-liquid microextraction: trends in the analysis of biological samples. *Bioanalysis.* 7(17):2211-2225.

ANEXOS

Anexo I. Gráficos obtenidos.

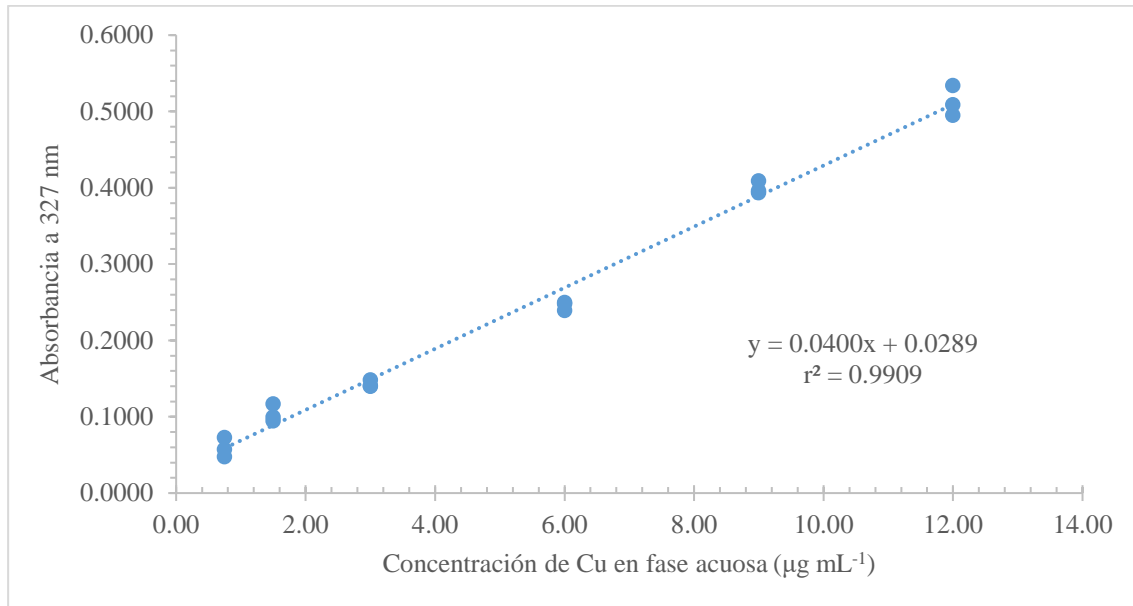


Gráfico 1. Curva de calibración realizada en la evaluación de linealidad del sistema espectrofotométrico.

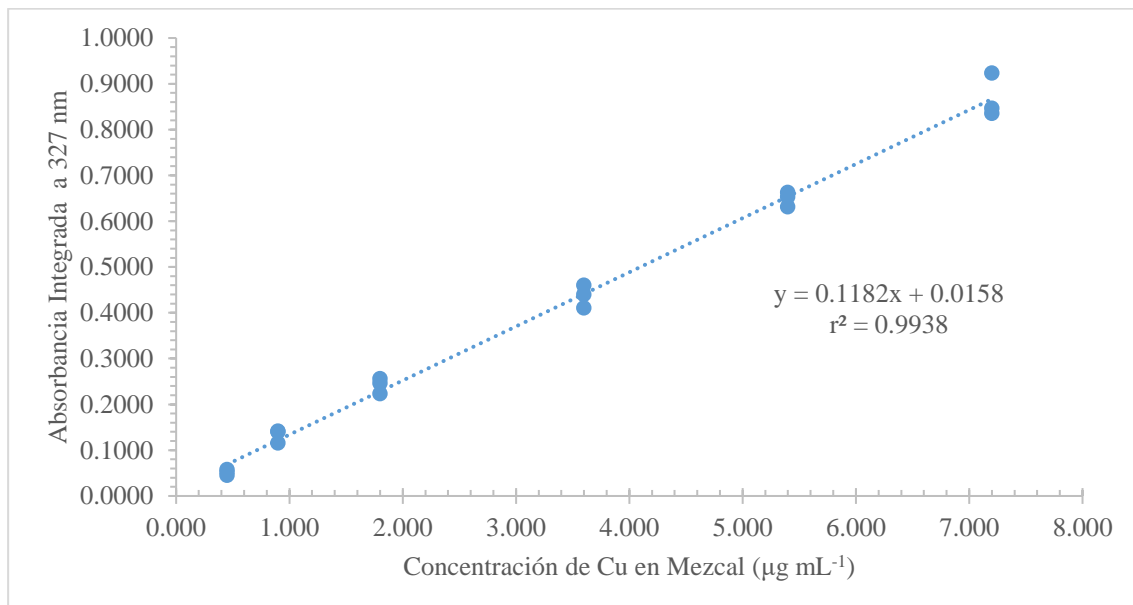


Gráfico 2. Curva de calibración realizada con soluciones estándar en la evaluación de linealidad en el desempeño del método de cuantificación de Cu por microextracción líquido-líquido dispersiva y espectrofotometría de absorción atómica de llama.

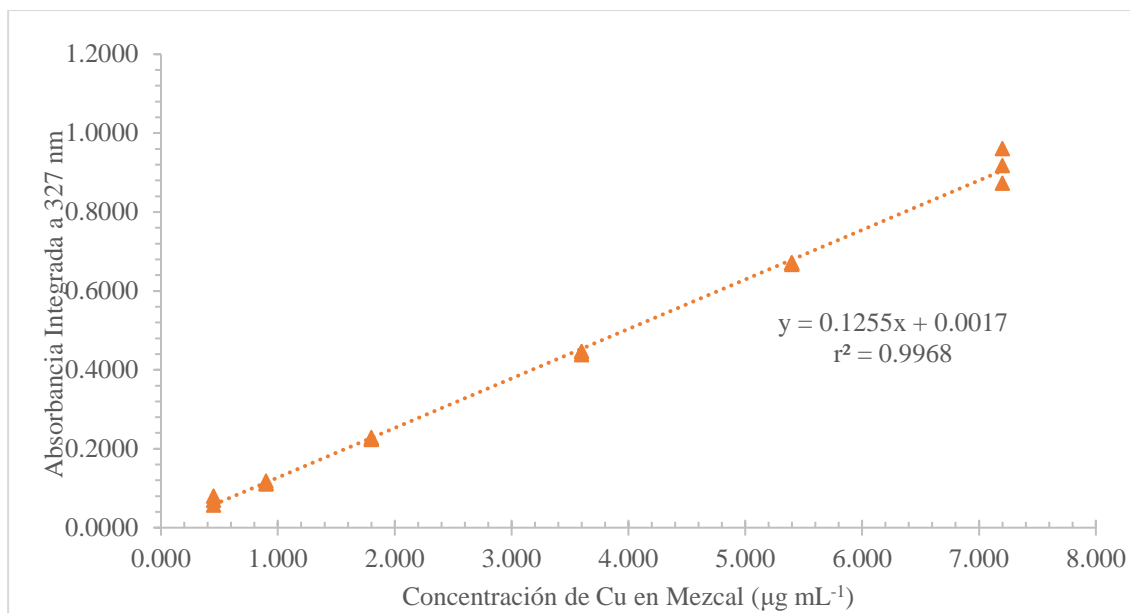


Gráfico 3. Curva de calibración realizada con muestra fortificada en la evaluación de linealidad en el desempeño del método de cuantificación de Cu por microextracción líquido-líquido dispersiva y espectrofotometría de absorción atómica de llama.

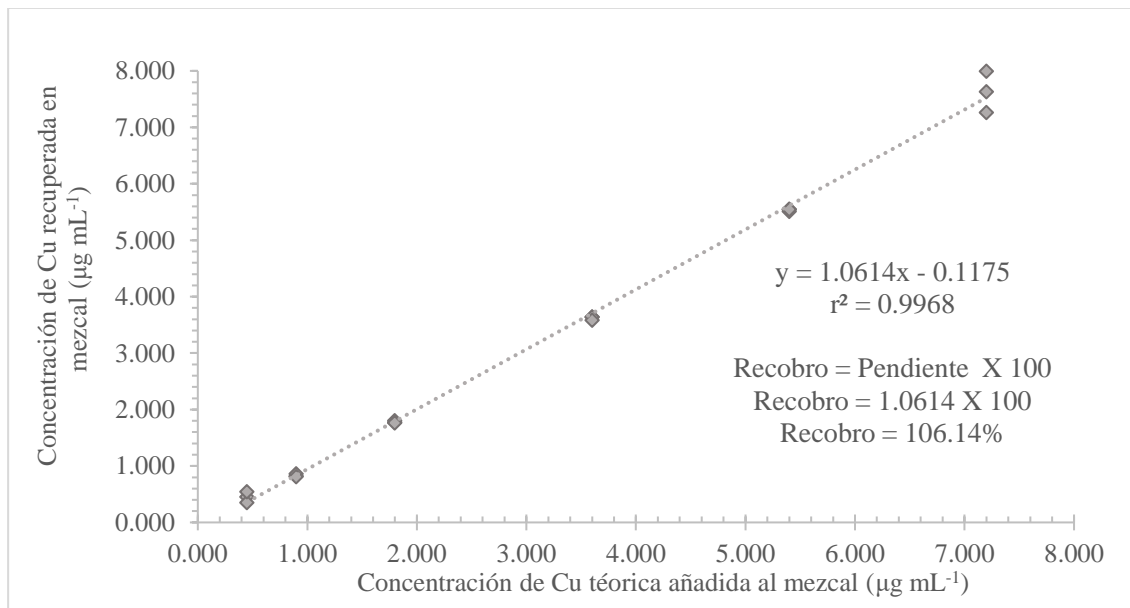


Gráfico 4. Recobro a 6 niveles de concentración del método de cuantificación de Cu en mezcal por microextracción líquido-líquido dispersiva y espectrofotometría de absorción atómica de llama.

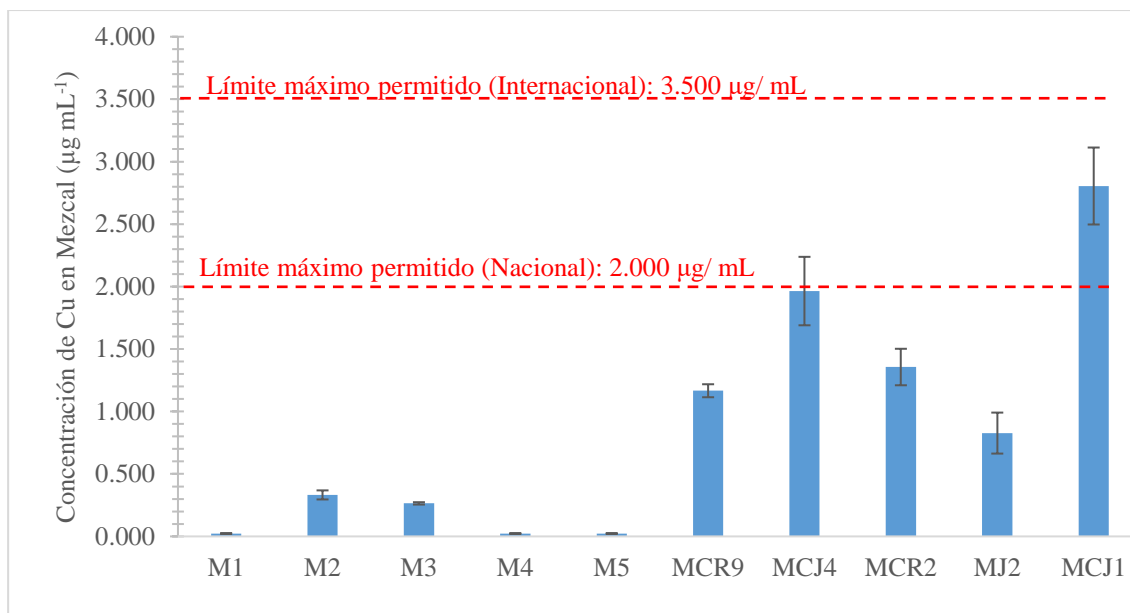


Gráfico 5. Aplicación del método de extracción líquido-líquido dispersiva y su miniaturización para la cuantificación de Cu en diferentes muestras de mezcal.

Anexo II. Comparación de parámetros de desempeño de los métodos de extracción desarrollados.

Parámetro	Método ELLD	Método MELLD
Coefficiente de determinación (r^2)	0.9918	0.9938
Intervalo de lectura	1.50- 24.00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ _{oct:MEK 75:25 v/v}	1.50- 24.00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ _{oct:MEK 75:25 v/v}
Intervalo de concentración en muestra	0.045 – 0.720 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0.045 – 0.720 $\mu\text{g mL}^{-1}$
Pendiente	1.0516 ± 0.0507	1.1818 ± 0.0492
Ordenada	0.0078 ± 0.0210	0.0158 ± 0.0200
%RSD (n=3)	1.62%	1.49%
Límite de Detección (LD)	0.014 $\mu\text{g mL}^{-1}$ _{mezcal}	0.014 $\mu\text{g mL}^{-1}$ _{mezcal}
Límite de Cuantificación (LC)	0.045 $\mu\text{g mL}^{-1}$ _{mezcal}	0.045 $\mu\text{g mL}^{-1}$ _{mezcal}

Anexo III. Ejemplos de cálculo de concentración de Cu en mezcal por el método desarrollado.

Ejemplo A. Cálculo de concentración de Cu en muestras de mezcal

Con el resultado obtenido de absorbancia de una de las réplicas del análisis de la muestra 10 de mezcal joven proveniente del estado de Oaxaca (MCJ1), se ejemplifica los cálculos realizados para cuantificar Cu en mezcal por microextracción líquido-líquido dispersiva y espectrofotometría de absorción atómica de llama.

$A_{327} = 0.3639$	Resultado de absorbancia integrada obtenido
$y = 0.1182x + 0.0158$	Ecuación de la curva de calibración obtenida por el método de mínimos cuadrados
$A_{327} = 0.1182 \cdot [Cu]_{mezcal} + 0.0158$	Sustitución de variables en la ecuación A_{327} : Absorbancia integrada a 327.5 nm [Cu] _{mezcal} : Concentración de Cu en mezcal
$[Cu]_{mezcal} = \frac{A_{327} - 0.0158}{0.1182}$	Despejando la variable independiente, [Cu] _{mezcal}
$[Cu]_{mezcal} = \frac{0.3639 - 0.0158}{0.1182}$	Sustituyendo el valor de la absorbancia obtenido
$[Cu]_{mezcal} = 2.945 \mu g/mL$	Concentración de Cu en la muestra de mezcal

Con base al resultado de concentración obtenido, se establece el factor de preconcentración del método para la cuantificación de Cu en mezcal.

Factor de preconcentración del método de microextracción líquido-líquido dispersiva y espectrofotometría de absorción atómica.

<i>Concentración en muestra (fase acuosa)</i>	<i>Factor de concentración por MELLD</i>	<i>Cambio de disolvente</i>	<i>Factor de concentración por composición de mezcla de aspirado</i>	<i>Concentración del analito aspirada en el instrumento</i>
	14		0.25	Factor: (14)(0.25) = 3.5
2.945 µg Cu	7 mL muestra	0.5 mL F. orgánica volatilizada	0.05 mL MEK para resuspensión	10.31 µg Cu
1 mL muestra	0.5 mL F. orgánica recuperada	0.5 mL MEK para resuspensión	0.2 mL en oct:MEK 75:25 v/v	1 mL oct:MEK

Ejemplo B. Cálculo de concentraciones en cantidades traza de Cu en muestras de Cu.

Con el resultado obtenido de absorbancia de una de las réplicas del análisis de la muestra 2 de mezcal artesanal destilado con pechuga de agave proveniente del estado de Oaxaca (M2), se ejemplifica los cálculos realizados para cuantificar Cu en mezcal en cantidades traza por microextracción líquido-líquido dispersiva y espectrofotometría de absorción atómica de llama.

$A_{327} = 0.3998$	Resultado de absorbancia integrada obtenido
$y = 0.1182x + 0.0158$	Ecuación de la curva de calibración obtenida por el método de mínimos cuadrados
$y = 1.1818x + 0.0158$	Modificación de la ecuación de la curva de calibración obtenida por el método de mínimos cuadrados en factor de 10 por el cambio de disolvente
$A_{327} = 1.1818 \cdot [Cu]_{mezcal} + 0.0158$	Sustitución de variables en la ecuación A_{327} : Absorbancia integrada a 327.5 nm $[Cu]_{mezcal}$: Concentración de Cu en mezcal
$[Cu]_{mezcal} = \frac{A_{327} - 0.0158}{1.1818}$	Despejando la variable independiente, $[Cu]_{mezcal}$
$[Cu]_{mezcal} = \frac{0.3998 - 0.0158}{1.1818}$	Sustituyendo el valor de la absorbancia obtenido
$[Cu]_{mezcal} = 0.325 \mu g/mL$	Concentración de Cu en la muestra de mezcal

Con base al resultado de concentración obtenido, se establece el factor de preconcentración del método para la cuantificación de Cu en cantidades traza en mezcal.


Factor de preconcentración del método de microextracción líquido-líquido dispersiva y espectrofotometría de absorción atómica.

<i>Concentración en muestra (fase acuosa)</i>	<i>Factor de concentración por MELLD</i>	<i>Cambio de disolvente</i>	<i>Factor de concentración por composición de mezcla de aspirado</i>	<i>Concentración del analito aspirada en el instrumento</i>
	14	10	0.25	Factor: (14)(10)(0.25) = 35
0.325 μg Cu	7 mL muestra	0.5 mL F. orgánica volatilizada	0.05 mL MEK para resuspensión	11.38 μg Cu
1 mL muestra	0.5 mL F. orgánica recuperada	0.05 mL MEK para resuspensión	0.2 mL en oct:MEK 75:25 v/v	1 mL oct:MEK

11
ER

CONGRESO IBEROAMERICANO DE CIENCIA, EDUCACIÓN Y TECNOLOGÍA
(durante 6 años consecutivos Congreso de Ciencia, Educación y Tecnología)

3 ENCUENTRO DE BUENAS PRÁCTICAS DOCENTES
en ciencia, humanidades y tecnología



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Otorga la presente

CONSTANCIA a:

Héctor Uriel Rosas Santiago, Ilse María Luisa Miranda Salgado, José de Jesús Olmos

Por su participación con el trabajo titulado: **Optimización de la extracción de Cu en mezal por microextracción líquido-líquido dispersiva y su análisis espectrofotométrico**, en modalidad de cartel y que fue presentado el 8 de diciembre de 2021



Alma L. Revilla V.

Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez
Jefa de la División de Ciencias Químico-Biológicas
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

**MENCIÓN
HONORÍFICA**

C O N C U R S O D E C A R T E L E S



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

Otorga el presente

RECONOCIMIENTO a:

**Héctor Uriel Rosas Santiago, Ilse María Luisa Miranda Salgado,
José de Jesús Olmos Espejel**

Por la presentación de su trabajo en modalidad CARTEL CIENTÍFICO en el área de **CIENCIAS QUÍMICAS:**
**"OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DE CU EN MEZCAL POR MICROEXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA
Y SU ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICO"** presentado en el
1er Congreso Iberoamericano de Ciencia, Educación y Tecnología en el marco del 3er Encuentro de Buenas Prácticas Docentes
Cuaautitlán Izcalli, Estado de México a 10 de diciembre de 2021

Alma L. Revilla V.
Dra. Alma Luisa Revilla Yáñez

Jefa de la División de Ciencias Químico-Biológicas
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

