

## SECRETARIA DE ECONOMIA

### **NORMA Oficial Mexicana NOM-173-SCFI-2009, Jugos de frutas preenvasados-Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba.**

Al margen un sello con el Escudo Nacional, que dice: Estados Unidos Mexicanos.- Secretaría de Economía.

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-173-SCFI-2009, "JUGOS DE FRUTAS PREENVASADOS-DENOMINACIONES, ESPECIFICACIONES FISICOQUIMICAS, INFORMACION COMERCIAL Y METODOS DE PRUEBA".

FRANCISCO RAMOS GOMEZ, Presidente del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Seguridad al Usuario, Información Comercial y Prácticas de Comercio, con fundamento en los artículos 34 fracciones XIII y XXXI de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; 39 fracción V, 40 fracciones I y XII, 46, 47 fracción IV de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización y 19 fracciones I, XIV y XV del Reglamento Interior de esta Secretaría, y

#### CONSIDERANDO

Que es responsabilidad del Gobierno Federal procurar las medidas que sean necesarias para garantizar que los productos que se comercialicen en territorio nacional cumplan con especificaciones mínimas, con el fin de garantizar una efectiva protección del consumidor;

Que con fecha 15 de julio de 2008, el Comité Consultivo Nacional de Normalización de Seguridad al Usuario, Información Comercial y Prácticas de Comercio, aprobó la publicación del Proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-173-SCFI-2008 "Jugos de frutas preenvasados-Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba", la cual se realizó en el Diario Oficial de la Federación el 3 de diciembre de 2008, con objeto de que los interesados presentaran sus comentarios;

Qué la manifestación de impacto regulatorio a que hace referencia el artículo 45 de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización, fue sometida a la consideración de la Comisión Federal de Mejora Regulatoria, emitiéndose el dictamen final aprobatorio por parte de dicha Comisión el 12 de noviembre de 2008.

Que durante el plazo de 60 días naturales contados a partir de la fecha de publicación de dicho proyecto de norma oficial mexicana, los interesados presentaron comentarios sobre el contenido del citado proyecto, mismos que fueron analizados por el grupo de trabajo, realizándose las modificaciones conducentes.

Que con fecha 9 de julio de 2009, el Comité Consultivo Nacional de Normalización de Seguridad al Usuario, Información Comercial y Prácticas de Comercio, aprobó por unanimidad la norma referida;

Que la Ley Federal sobre Metrología y Normalización establece que las normas oficiales mexicanas se constituyen como el instrumento idóneo para la protección de los intereses del consumidor, expide la siguiente: Norma oficial mexicana NOM-173-SCFI-2009, "Jugos de frutas preenvasados-Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba".

México, D.F., a 9 de julio de 2009.- El Director General de Normas y Presidente del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Seguridad al Usuario, Información Comercial y Prácticas de Comercio, **Francisco Ramos Gómez**.- Rúbrica.

#### **NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-173-SCFI-2009 JUGOS DE FRUTAS PREENVASADOS-DENOMINACIONES, ESPECIFICACIONES FISICOQUIMICAS, INFORMACION COMERCIAL Y METODOS DE PRUEBA**

#### PREFACIO

En la elaboración de la presente Norma Oficial Mexicana participaron las siguientes empresas e instituciones:

ALMACENADORA ACCEL, S. A. DE C. V.

ASOCIACION NACIONAL DE PROCESADORES DE CITRICOS, A.C. (ANAPROCI)

ASOCIACION NACIONAL DE VITIVINICULTORES, A. C.

CAMARA NACIONAL DE LA INDUSTRIA DE CONSERVAS ALIMENTICIAS

CENTRO DE CONTROL TOTAL DE CALIDADES, S.A. DE C.V.

COCA-COLA DE MEXICO, S.A. DE C.V.

CONFEDERACION DE CAMARAS INDUSTRIALES DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS

CONSEJO CITRICOLA MEXICANO

CONSEJO MEXICANO DE LA INDUSTRIA DE PRODUCTOS DE CONSUMO, A. C .

GERBER, S.A. DE C.V.

GRUPO JUMEX

HECA, S. A.

HERDEZ, S. A. DE C. V.

JUGOS DEL VALLE, S. A. DE C. V.

LEFIX Y ASOCIADOS

PROCONSUMIDORES, A. C .

PROCURADURIA FEDERAL DEL CONSUMIDOR

Laboratorio Nacional de Pruebas

Dirección General de Verificación y Vigilancia

SABRITAS, S. DE R. L. DE C. V.

SECRETARIA DE SALUD

Comisión Federal de Protección contra Riesgos Sanitarios

SECRETARIA DE AGRICULTURA, GANADERIA, DESARROLLO RURAL, PESCA Y ALIMENTACION

Dirección General de Fomento a la Agricultura

SECRETARIA DE HACIENDA Y CREDITO PUBLICO

Servicio de Administración Tributaria

SIGMA ALIMENTOS, S. A. DE C.V.

SOCIEDAD COOPERATIVA TRABAJADORES PASCUAL, S. A.

SOCIEDAD MEXICANA DE NORMALIZACION Y CERTIFICACION, S. C.

UNILEVER DE MEXICO, S. A. DE C.V.

UNIVERSIDAD DE LAS AMERICAS DE PUEBLA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Instituto de Química

Instituto de Geología

VALLE REDONDO, S. A. DE C. V.

## INDICE

Capítulo

Objetivo y campo de aplicación

Referencias

Definiciones

Símbolos y abreviaturas

Clasificación y denominación comercial

Especificaciones del producto

Muestreo

Métodos de prueba

Información comercial

Vigilancia

Bibliografía

Concordancia con normas internacionales

Transitorio

## 1. Objetivo y campo de aplicación

Esta Norma Oficial Mexicana establece las características y especificaciones mínimas que los productos, procesados y preenvasados, objeto de la misma deben cumplir para denominarse jugos de fruta, así como la información comercial que deben cumplir.

Esta norma es aplicable para los productos que se denominen jugo de fruta que se comercialicen en territorio nacional.

## 2. Referencias

Esta Norma Mexicana se complementa con las siguientes normas oficiales mexicanas y normas mexicanas vigentes:

NOM-002-SCFI-1993	Productos preenvasados. Contenido Neto, Tolerancias y Métodos de verificación, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 13 de octubre de 1993.
NOM-030-SCFI- 2006	Información comercial-Declaración de cantidad en la etiqueta-Especificaciones, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 6 de noviembre de 2006.
NOM-051-SCFI-1994	Especificaciones. Generales de etiquetado para alimentos y bebidas no alcohólicas preenvasados, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 24 de enero de 1996.
NOM-086-SSAI-1994	Bienes y Servicios. Alimentos y bebidas no alcohólicas con modificaciones en su composición. Especificaciones nutrimentales, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 26 de junio de 1996.
NOM-130-SSA1- 1995	Bienes y servicios. Alimentos envasados en recipientes de cierre hermético y sometidos a tratamiento térmico. Disposiciones y especificaciones sanitarias, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 21 de noviembre de 1997.
NMX-F-103-1982	Alimentos-Frutas y Derivados- Determinación de grados brix. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 14 de octubre de 1982.
NMX-F-309-NORMEX-2001	Determinación de benzoatos, salicilatos y sorbatos en alimentos. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 26 de julio de 2001.

## 3. Definiciones

Para los efectos de esta Norma se establecen las siguientes definiciones:

### 3.1 Adulteración

Producto cuya naturaleza no corresponda a aquella con que se etiquete, anuncie, expendan suministre o por no cumplir con las especificaciones respectivas, aun cuando haya sufrido un tratamiento que disimule dichas circunstancias o bien, que encubra defectos en su proceso o en la calidad sanitaria de las materias primas utilizadas en él.

### 3.2 Frutas cítricas

Son frutas de la familia *Rutaceae* que se dañan con bajas temperaturas, que se caracterizan porque tienen aceites y pigmentos en su cáscara,

### 3.3 Fruta sana

Fruta libre de enfermedades, heridas, pudriciones, daños producidos por insectos u otras plagas, libre de insectos vivos o muertos o sus larvas.

### 3.4 Fruta Madura

Fruta que está en su punto de sazón o madurez.

**3.5 Grados Brix**

Es el por ciento de sólidos disueltos en un producto derivado de las frutas o de un líquido azucarado.

**3.6 Jugo de fruta**

Es el producto líquido sin fermentar, pero fermentable obtenido al exprimir frutas en buen estado, debidamente maduras y frescas o frutas que se han mantenido en buen estado por procedimientos adecuados, inclusive por tratamientos de superficie aplicados después de la cosecha, clarificado o no, y sometido al tratamiento adecuado que asegura su conservación en el envase. No debe contener corteza y semillas, ni materia extraña objetable.

El jugo debe prepararse mediante procedimientos que mantengan las características físicas, químicas, organolépticas y nutricionales esenciales de la fruta de que procede. Podrán añadirse pulpa y células (en el caso de las frutas cítricas, la pulpa y las células son las envolturas del jugo obtenido del endocarpio) obtenidas por procedimientos físicos adecuados del mismo tipo de fruta.

Este producto puede elaborarse a partir de jugo de fruta congelado, y/o de jugo de fruta concentrado reconstituido, siempre que cumpla con las especificaciones citadas en la presente norma.

**3.7 Jugo de fruta concentrado**

Es el jugo de fruta al cual se ha eliminado físicamente el agua en una cantidad suficiente para elevar el nivel de grados Brix al menos en un 50% más que el valor Brix establecido para el producto líquido obtenido al exprimir frutas sanas y maduras, que ha sido sometido al tratamiento físico o a las condiciones de almacenamiento adecuadas que aseguren su conservación en el envase. No debe contener corteza y semillas, ni materia extraña objetable.

**3.8 Jugo de frutas múltiple (mixto)**

Es la mezcla de dos o más productos líquidos obtenidos al exprimir frutas sanas y maduras de la variedad correspondiente, clarificado o no, no fermentado y sometido al tratamiento adecuado que asegura su conservación en el envase. No debe contener corteza y semillas, ni materia extraña objetable.

Este producto puede elaborarse a partir de la mezcla de dos o más jugos y/o purés congelados, y/o de jugos y/o purés concentrados reconstituidos de diferentes tipos de frutas.

El jugo debe prepararse mediante procedimientos que mantengan las características físicas, químicas, organolépticas y nutricionales esenciales de la fruta de que procede. Podrán añadirse pulpa y células (en el caso de las frutas cítricas, la pulpa y las células son las envolturas del jugo obtenido del endocarpio) obtenidas por procedimientos físicos adecuados del mismo tipo de fruta.

**3.9 Jugo congelado**

Es el jugo de fruta que ha sido sometido mediante un equipo apropiado a un proceso térmico, hasta que el producto alcance una temperatura de -15 °C en el centro térmico y se haya mantenido a temperatura de congelación durante el almacenamiento.

**3.10 Productos Preenvasados**

Son los alimentos y bebida no alcohólica, que cuando son colocados en un envase de cualquier naturaleza, no se encuentra presente el consumidor, y la cantidad de producto contenido en él no puede ser alterada, a menos que el envase sea abierto o modificado perceptiblemente.

**3.11 Pulpa de fruta**

Es la masa carnosa y a menudo jugosa de la fruta (sólidos insolubles). En el caso de las frutas cítricas la pulpa está formada por un considerable número de gajos llenos de jugo.

**3.12 Puré de fruta**

Es el producto sin fermentar, pero fermentable, obtenido mediante procedimientos idóneos, por ejemplo tamizando, triturando o desmenuzando la parte comestible de la fruta entera o pelada sin eliminar el jugo. La fruta deberá estar en buen estado, debidamente madura y fresca, o conservada por procedimientos físicos o por tratamientos aplicados de conformidad con las disposiciones pertinentes de la autoridad competente.

**3.13 Puré concentrado de fruta**

Es el producto obtenido mediante la eliminación física de agua del puré de fruta en una cantidad suficiente para elevar al menos el nivel de grados Brix en 50% más que el valor Brix establecido para el jugo reconstituido de la misma fruta.

**3.14 Sólidos disueltos de fruta**

Son los sólidos solubles provenientes de fruta y que son cuantificados como grados Brix.

**4. Símbolos y abreviaturas**

°Bx	grado Brix
%	por ciento
g	gramo
mg	miligramo
µg	microgramo
kg	kilogramo
L o l	litro
mL o ml	mililitro
µL o µl	microlitro
mm	milímetro
cm	centímetro
m <sup>3</sup>	metro cúbico
B.P.F.	Buenas prácticas de fabricación
pH	Potencial de hidrógeno
m/v	Sólidos/Volumen Total
m/m	masa/masa
<sup>13</sup> C	Número total de átomos de carbono 13
<sup>12</sup> C	Número total de átomos de carbono 12
δ <sup>13</sup> C	Delta de carbono 13
VPDB	Vienna Pee dee Beelemnite
‰	Partes por mil
g	aceleración de la gravedad
mol	mol
rpm	revoluciones por minuto
h	hora
min	minuto
s	segundo
°C	grados Celsius
K	Kelvin
Pa	pascal
kPa	kilopascal
mbar	milibar

uma unidad de masa atómica

$\sigma$  desviación estándar

## 5. Clasificación y denominación comercial

### 5.1 Jugos

Los jugos objeto de esta norma deben denominarse con el mismo tamaño de letra de acuerdo a lo siguiente.

**5.1.1** Los jugos de fruta definidos en 3.6 se denominan de la siguiente forma:

JUGO DE \_\_\_\_\_

El nombre de la fruta correspondiente se colocará en el espacio en blanco

**5.1.2** Los jugos de fruta concentrados definidos en 3.7 se denominan de la siguiente forma:

JUGO DE \_\_\_\_\_ CONCENTRADO

El nombre de la fruta correspondiente se colocará en el espacio en blanco.

**5.1.3.** "Los jugos de frutas definidos en el inciso 3.8, la denominación debe ser:

JUGO DE \_\_\_\_\_

Colocando en el espacio en blanco los nombres de los jugos de fruta que componen la mezcla en orden descendente del peso (m/m) o de las palabras "mezcla de jugos de frutas", "jugo de frutas mixto/mezclado" o un texto similar.

## 6. Especificaciones del producto

### 6.1 Jugos

#### 6.1.1 Características Sensoriales

Color: Característico semejante a la variedad empleada.

Olor: Característico del jugo que se trate.

Sabor: Característico del jugo de que se trate, sin sabores extraños.

No debe contener corteza y semillas, ni materia extraña objetable.

#### 6.1.2 Físicoquímicas

Los jugos objeto de esta norma deben cumplir con las especificaciones físicas y químicas que se muestran en la siguiente Tabla 1.

**Tabla 1**

**Especificaciones para Jugos y Jugos de Concentrados una vez Reconstituidos**

Parámetro	Naranja	Mandarina	Manzana	Toronja	Piña	Uva	De frutas Múltiples	Métodos de Prueba
* Sólidos disueltos mínimos de la fruta correspondiente ( $^{\circ}$ Brix)	11,2	11,8	11,5	10	12,8	16	10	Ref. punto 8.1 y NMX-F-103-1982
Relación Isotópica de Carbono ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ), expresada en $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ (‰).	<-24 a -28	-24 a -28	-24 a -28	-24 a -28	N.A.	-24 a -28		Ref. punto 8.1

\* Esta especificación debe cumplirse aunque el producto sea modificado en su composición, conforme a lo dispuesto en la NOM-086-SSA1-1994.

N.A.: No aplicable

Se prohíbe la adición de azúcares y acidulantes al mismo jugo de fruta, toda vez que se considera adulteración de la composición del producto, de conformidad con lo establecido en el Codex Alimentarius.

**Nota** - Cuando un jugo proceda de una fruta no mencionada en esta tabla, el nivel mínimo de grados Brix de la fruta será el normado internacionalmente por el Codex Alimentarius.

## 7. Muestreo

Para efectos oficiales, el muestreo estará sujeto a las disposiciones legales y reglamentarias aplicables.

## 8. Método de Prueba

Determinación de la adición de azúcar de caña o jarabe de maíz empleando la relación Isotópica de Carbono ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) en azúcares provenientes de jugos de fruta de plantas  $\text{C}_3$  empleando la Espectrometría de Masas de Isótopos Estables.

### 8.1 Objetivo y campo de aplicación.

Esta metodología tiene como objeto cuantificar la adición de edulcorantes industriales exógenos como los detallados en la Norma de CODEX para los Azúcares CODEX STAN 212-1999 enmienda 1-2) a las diferentes clasificaciones de jugos de fruta industrializados provenientes de plantas  $\text{C}_3$ , elaborados a partir de frutas sanas y maduras o preparados a partir de concentrados de fruta obtenidos por un proceso industrial de eliminación del agua contenida en los jugos. Este método no es aplicable para el caso de jugo de piña.

Los azúcares exógenos que se pueden considerar están: El azúcar de caña, jarabes de maíz con alto contenido de fructosa o glucosa

### 8.2 Fundamento

El fundamento del método está en la determinación de las relaciones isotópicas de Carbono ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) por Espectrometría de Masas de Isótopos Estables, la cual se expresa por los cocientes de las abundancias de los átomos estables de carbono 12 y 13 como ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) mediante el empleo de unidades  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  (‰), los cuales están referidos a un patrón internacional que es físicamente un carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ) de origen marino proveniente de la formación cretácica Pee dee de Carolina del Sur, conocido como PDB (Pee Dee Belemnite Limestone). La unidad de reporte es  $\delta$  expresada en partes por mil (‰). De acuerdo a la siguiente ecuación (Craig, 1957):

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}} = \left[ \frac{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{Muestra}}}{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{VPDB}}} - 1 \right] \cdot 10^3 \text{ E c. 1}$$

Los responsables de establecer, mantener y desarrollar la metrología de los isótopos estables internacionalmente es la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC, International Union of Pure and Applied Chemistry), la Comisión de Pesos Atómicos y Abundancias Isotópicas (CIAAW Commission on Isotopic Abundances and Atomic Weights), la IUPAC ha designado como los responsables operativos de la metrología de los isótopos estables al Subcomité de Medidas en Abundancia Isotópica (Subcommittee on Isotope Abundance Measurements, SIAM) el cual está formado por un grupo de expertos quienes publican reportes y emiten las recomendaciones metrológicas sobre las Abundancias Isotópicas y Pesos Atómicos. Recientemente en la reunión realizada en su 43a. Asamblea General de IUPAC que se llevó a cabo en agosto de 2005 en Beijing China. Emitió las recomendaciones siguientes: a) Que los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  de todos los materiales que contienen carbono en su composición deben ser medidos y los resultados expresados relativos a VPDB (Vienna Pee dee Belemnite), b) Normalizar la escala VPDB se emplean los materiales de referencia NBS-19 y L-SVEC usando los valores asignados por consenso de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}} = -46,6\text{‰}$  para el carbonato de litio L-SVEC y  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}} = +1,95\text{‰}$  para el carbonato de calcio NBS-19. c) Además que las personas que analizan estos materiales que contienen carbono lo deben expresar claramente en sus reportes. (Coplen, T et al 2006).

### 8.3 Principio del Método.

Todos los compuestos orgánicos que forman a los seres vivos contienen el elemento químico llamado carbono. En la naturaleza existen dos átomos de carbono estables cuya única diferencia entre ellos es su masa atómica, todas las demás propiedades químicas en su mayoría son idénticas. A estos átomos se les conoce con el nombre de isótopos y se representan como carbono-13 ( $^{13}\text{C}$ ) y carbono-12 ( $^{12}\text{C}$ ).

La proporción de isótopos estables ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) contenidos en los alimentos, son típicos y fijados principalmente por su origen o su procedencia y en mucha menor escala de los posteriores procesos

industriales que sufren. En general la proporción isotópica de origen se mantiene, por lo cual nos permite identificar su fuente.

La base del método consiste en relacionar la cantidad de isótopos estables expresada en unidades delta de un producto determinado con el correspondiente ciclo fotosintético de la planta origen de la materia prima. Lo anterior es debido a que los mecanismos fotosintéticos de la fijación del CO<sub>2</sub> atmosférico por las plantas se realizan a través de tres procesos.

Los diferentes tipos de origen de las plantas se establecen en función de la fotosíntesis, los cuales se clasifican en tres grandes grupos dependiendo del proceso fotosintético que utilizan para fijar el CO<sub>2</sub> atmosférico, estos son: las plantas tipo C<sub>3</sub> utilizan el ciclo de Calvin; las plantas tipo C<sub>4</sub> siguen el ciclo de Hatch Slack y las plantas denominadas CAM (Crasulacean Acid Metabolism).

En la naturaleza, el ciclo de Calvin es empleado por plantas tipo C<sub>3</sub>; a este ciclo pertenecen, árboles, arbustos y algunas frutas de este ciclo fotosintético como son: manzana, pera, durazno, plátano, uva, mango, guayaba, ciruela, chabacano, cereza, arándano, naranja, toronja, mandarina, limón, jitomate, etc. De estas frutas es de donde se extraen la gran mayoría jugos y néctares industrializados.

En la naturaleza, el ciclo de Hatch Slack es empleado por plantas C<sub>4</sub>, a este ciclo pertenecen plantas como: caña de azúcar y maíz. Es a partir de este tipo de plantas de donde se derivan edulcorantes industriales como son entre otros el azúcar de caña y el jarabe de maíz con alto contenido en fructosa o glucosa, este tipo de edulcorantes son los más empleados como azúcares exógenos que se adicionan a los jugos y néctares.

El tercer grupo de plantas es denominado CAM (Crasulacean Acid Metabolism). A este grupo pertenecen los agaves, la vainilla, y plantas como la piña.

Entre los grupos de plantas C<sub>3</sub> y C<sub>4</sub> existe una diferencia considerable y medible en la proporción de isótopos estables (<sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C) contenidos en las plantas. Por lo que midiendo la δ<sup>13</sup>C en jugos o jugos concentrados es posible reconocer el proceso fotosintético de la planta que les dio origen y en su caso cuantificar su mezcla.

El grado de mezcla entre azúcares provenientes de las plantas C<sub>3</sub> con las plantas C<sub>4</sub> (azúcares exógenos caña de azúcar o jarabe de maíz), se puede cuantificar mediante una proporción lineal construida tomando como extremos, por un lado la composición isotópica de δ<sup>13</sup>C de los edulcorantes exógenos y por el otro la composición isotópica de δ<sup>13</sup>C de los sólidos solubles contenidos en el jugo de frutas.

#### 8.4 Descripción del método de prueba.

La δ<sup>13</sup>C<sub>VPDB</sub> se determina en un Espectrómetro de Masas de Isótopos Estables utilizando el CO<sub>2</sub> obtenido de la combustión del material orgánico mayoritario contenido en una muestra de jugo como son los sólidos disueltos y la pulpa. Los resultados obtenidos de ambos se reportan como δ<sup>13</sup>C<sub>VPDB</sub> expresado en ‰ evaluados de acuerdo a la ecuación 1.

Para realizar el análisis, se toma una alícuota de jugo al cual por métodos físicos (centrifugación) se separan la pulpa de los sólidos disueltos, una vez separado el material orgánico, se oxida mediante una combustión cuantitativa para formar principalmente CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O. El CO<sub>2</sub> obtenido de la reacción de oxidación es purificado mediante un proceso de separación criogénica y empleando sistemas de vacío inciso 8.7.2.1.1) o mediante un proceso de separación utilizando una columna cromatográfica como es el caso del analizador elemental al separar el N<sub>2</sub> del CO<sub>2</sub>.

En la literatura internacional se reportan básicamente tres métodos de combustión cuantitativa. El primero que utiliza una combustión dinámica. El segundo método, es el más preciso de los tres, el cual realiza la combustión a alta temperatura en tubo de cuarzo sellado; los productos de combustión se llevan a una línea de vacío donde el CO<sub>2</sub> se separa y se purifica cuantitativamente; la línea de vacío fue diseñada ex profeso para esta metodología; la determinación de la δ<sup>13</sup>C<sub>VPDB</sub> se realiza empleando el CO<sub>2</sub>, purificado criogénicamente utilizando el sistema de introducción dual de gases del espectrómetro. El tercer método, es un método rápido de combustión y purificación cuantitativa que emplea un Analizador Elemental y mediante la técnica de flujo continuo con helio y el empleo de una-interfase-que conduce el CO<sub>2</sub> de la muestra al espectrómetro de masas de isótopos estables para la determinación de la δ<sup>13</sup>C<sub>VPDB</sub>

### 8.5 Instrumentación.

El equipo indispensable para la implementación de este método es un Espectrómetro de masas para la determinación de relaciones de isótopos estables con la capacidad analítica para determinar la  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  en el intervalo de abundancias naturales en  $\text{CO}_2$  con una precisión interna del orden de 0,02 ‰ (es definida aquí como la diferencia entre dos medidas de relaciones isotópicas consecutivas de una muestra de  $\text{CO}_2$ ) y es y la precisión externa de 0,05 ‰ (expresada en valores delta eq 1). La linealidad debe ser < 0,05 ‰ por nanoamper de corriente de iones. Durante la operación del espectrómetro, las mesetas de los picos para colector universal CNOS debe ser  $m/\Delta m = 95$  (10% valle).

El espectrómetro de masas deberá ser capaz de realizar las determinaciones isotópicas mediante lecturas simultáneas de las masas moleculares 44, 45 y 46 uma. El espectrómetro debe tener un sistema de introducción de muestras dual para determinaciones simultáneas entre el gas muestra y el gas de un patrón de trabajo. El método de introducción dual es intrínsecamente más preciso. Sin embargo, recientemente se ha desarrollado una instrumentación específica para acoplar un Analizador Elemental (AE) y para ello se ha desarrollado un método analítico, que emplea el flujo continuo de helio para mover e introducir el  $\text{CO}_2$  producto de la combustión al Espectrómetro de Masas de Relaciones Isotópicas. Los resultados obtenidos mediante esta última técnica son igualmente confiables, pero para ello, es necesario analizar en serie con las muestras un conjunto de alícuotas de materiales de referencia.

En caso de emplear el AE en línea con el espectrómetro de masas de isótopos estables el AE debe ser acoplado directamente al espectrómetro mediante una interfase especial diseñada para esta metodología. El AE deberá ser capaz de manejar los gases provenientes de la combustión de muestra o de los materiales de referencia y manejar simultáneamente el gas utilizado como patrón de trabajo. Además el AE debe tener la capacidad de convertir cuantitativamente todo el carbono de la muestra en dióxido de carbono y debe ser capaz de eliminar los demás productos de la combustión de la muestra principalmente los óxidos de nitrógeno, óxidos de azufre y agua.

### 8.6 Otros Equipos para la realización de la metodología

Centrífuga para realizar la separación física de los sólidos disueltos de la fruta y la pulpa se debe emplear una centrífuga con rotor de 45° para seis tubos de centrífuga con una capacidad volumétrica en cada brazo de al menos 50 ml. con una fuerza de al menos 1400 g.

Parrilla eléctrica con agitador magnético: con control de temperatura y control de agitación.

Horno para secado con una temperatura entre 50 °C a 60 °C

Refractómetro de mano para determinación de °Brix.

La preparación de las muestras que se describe en el inciso 8.7 es aplicable a todos los tipos de jugos tanto en forma de jugo fresco natural como en sus presentaciones comerciales. En el caso de jugos concentrados, éstos se deben diluir al 50% con agua destilada. El procedimiento que se debe seguir es el siguiente.

### 8.7 Procedimientos

#### 8.7.1 Preparación de la muestra

##### 8.7.1.1 Reactivos y Materiales

Para la preparación de la muestra se deben emplear exclusivamente los reactivos de grado analítico siguientes:

- Hidróxido de Calcio  $\{\text{Ca}(\text{OH})_2\}$  grado analítico. Se prepara una solución al 25% con agua grado III.
- Acido Sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 95-97% grado analítico. Concentración 1M
- Agua al menos grado III de acuerdo con EN ISO 3696:1995
- Papel pH
- Tubos para centrífuga de 40 ml o 50 ml.
- Pipetas graduadas de 10 ml

- Propipeta.
- Vasos de precipitados de 100 ml
- Vaso de precipitados de 1 L
- Mortero con pistilo de ágata

**8.7.1.2** Procedimiento para la separación y preparación de los sólidos solubles (azúcares) y sólidos no solubles (pulpa) para análisis isotópico.

Para separar físicamente los constituyentes de un jugo, en sólidos disueltos y pulpa, se toman 50 ml de jugo de cualquier especificación y se coloca en tubo para centrifuga y se somete a centrifugación a 1400 g por 10 minutos.

**a)** Preparación de los sólidos solubles (azúcares) para análisis isotópico.

- Los sólidos solubles después de la centrifugación anterior están contenidos en el sobrenadante, por lo que se decanta este sobrenadante y se colocan 10 ml de sobrenadante en un vaso de precipitados de 100 ml.
- Adicionar una solución de hidróxido de calcio al 25% hasta ajustar el pH entre 8,5 y 9. Calentar la mezcla en un baño a 90 °C por 10 min., con agitación.
- Los ácidos orgánicos, aminoácidos y otros componentes se precipitan en este paso y para separarlos, se centrifuga por 10 min la solución a 1400 g.
- Decantar el sobrenadante y colocarlo en un vaso de precipitados de 100 ml, acidificar con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M hasta pH 5 esto es aproximadamente cuando la solución cambie de color y verificar el pH colocando una gota de la solución en papel pH, cuidar de no introducir el papel en la muestra.
- Guardar en un refrigerador a 4 °C durante 12 horas y decantar el sobrenadante líquido.
- Tomar una alícuota del sobrenadante para el análisis isotópico de  $\delta^{13}\text{C}$ . La concentración aproximada en °Brix de los sólidos disueltos que contiene principalmente los azúcares del jugo puede medirse con un refractómetro de mano.

**b)** Preparación para sólidos no solubles (pulpa)

Los sólidos no solubles (pulpa) obtenidos de la primera centrifugación están precipitados en el fondo del tubo de centrifugación, se separan y se preparan de la siguiente forma:

- La pulpa se lava con agua destilada caliente a 90 °C en el tubo de centrifuga, y se vuelve a centrifugar por otros 10 min. a 1400 g. Se decanta el sobrenadante y se desecha; este paso se debe repetir cinco veces.
- Se realiza un segundo lavado de la pulpa, con 40 ml de acetona, se centrifuga por 10 min a 1400 g se decanta el sobrenadante y se desecha (este paso se debe repetir al menos dos veces). Una vez lavada la pulpa con agua y acetona, ésta se liofiliza o se puede secar en un horno entre 60 °C – 80 °C durante toda la noche.
- La pulpa seca se homogeneiza, pulverizándola en un mortero de ágata.
- Pesar una alícuota de la pulpa para determinar la  $\delta^{13}\text{C}$ .

**8.7.2** Técnicas para la combustión de las muestras sólidos disueltos o de pulpa provenientes de las muestras de jugo para su posterior determinación la  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  en el Espectrómetro de Masas de Isótopos Estables.

**8.7.2.1** Objetivo de la combustión.

El objetivo de las diferentes técnicas de combustión es transformar cuantitativamente el carbono proveniente de la materia orgánica (sólidos disueltos o pulpa) preparados de acuerdo 8.7.1.2 a) y 8.7.1.2 b) de las muestras de los jugos a bióxido de carbono CO<sub>2</sub>. Mediante una combustión y posteriormente separar los otros productos de la combustión y purificar el bióxido de carbono CO<sub>2</sub>, para medir su  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  en el Espectrómetro de Masas de Isótopos Estables.

Para realizar la combustión cuantitativa de la materia orgánica se pueden emplear dos métodos, el primer método de combustión, utiliza un tubo de cuarzo sellado, realizando la combustión a una temperatura de 950 °C, de los gases formados se separa y purifica el CO<sub>2</sub> realizando la introducción del CO<sub>2</sub> puro al sistema de dual de introducción de gases del Espectrómetro de Masas de Isótopos Estables. El segundo método de combustión y purificación utiliza un Analizador Elemental acoplado en línea al espectrómetro de masas.

A continuación se hace la descripción detallada de cada uno de los métodos

#### **8.7.2.1.1 Método de combustión en tubo de cuarzo**

Reactivos y Materiales para la combustión en tubo de cuarzo.

- Materiales de referencia ver Tabla 2.
- Tanque de CO<sub>2</sub> de 99,995 % mínimo de pureza en un cilindro de 7 L, contenido en un tanque metálico a una presión máxima de 5860 kPa a 294 K (21 °C) con un regulador de dos pasos con una presión de entrega de 5,0 ml/min, para trabajar con cilindros con una presión máxima de 100 kPa. Para ser utilizado como patrón de trabajo en el espectrómetro de masas de relaciones isotópicas.
- Óxido cúprico en alambre grado reactivo analítico. El óxido cúprico es pasado por una malla del No. 40 para retirar el polvo. Posteriormente es quemado en una mufla a 850 °C durante tres horas para oxidar toda la materia orgánica que contenga.
- Plata 99,9994 % de pureza. Es laminada con un grosor entre 0,1 y 0,4 mm y cortada en secciones de 1 mm de ancho por 7 mm de largo. Las cuales son limpiadas con una solución de ácido nítrico al 1 %, posteriormente son lavadas con agua destilada y son calentadas en una mufla a 400 °C durante una hora. La plata es usada como catalizador en el tubo de combustión.
- Cobre metálico activado (granalla) grado reactivo analítico.
- Un soplete (antorcha) de gas - oxígeno capaz de alcanzar la temperatura de fusión del cuarzo, para sellar los tubos de cuarzo.
- Tanque de oxígeno industrial, con regulador y mangueras para operación del soplete.
- Gas butano para uso doméstico entubado para la operación del soplete.
- Hielo seco.
- Etanol absoluto industrial al 95% alcohol volumen.
- Nitrógeno líquido.
- Grasa para alto vacío tipo Apiezon N o M.
- Pinzas de punta y espátula de acero inoxidable para el manejo de muestras de 10 mg.
- Secadora de aire caliente tipo industrial con capacidad de alcanzar 500 °C con ventilador tipo jaula de ardilla de 1500 rpm.
- Gatos mecánicos de laboratorio de diferentes tamaños.
- Generador tesla para detección de fugas en sistemas al vacío de vidrio.
- Tubo de cuarzo de 9 mm de diámetro externo, 7 mm de diámetro interno y 20 cm de largo, sellado por un lado con soplete. El cual se utiliza como tubo de combustión.
- Tubo de cuarzo de 6 mm de diámetro externo, 4 mm de diámetro interno y aproximadamente 2 cm de largo, sellado por un lado con soplete. El cual se utiliza para mantener separado el óxido cúprico del cobre metálico y como contenedor para muestras orgánicas sólidas.
- Tubo de cuarzo de 4 mm de diámetro externo, 2 mm de diámetro interno y aproximadamente 2 cm de largo terminado en punta para ser utilizado como tubo capilar como contenedor de muestras orgánicas líquidas.
- Tubo de cuarzo de 4 mm de diámetro externo, 2 mm de diámetro interno y aproximadamente 2 cm de largo se coloca un filamento de plata de 1 mm x 7 mm de largo y se sella por ambos lados dejando un pequeño orificio para sostener el filamento de plata.

- A todo el material de cuarzo empleado en esta técnica, se elimina la materia orgánica en una mufla a 600 °C durante 1 h para eliminar cualquier partícula de materia orgánica, una vez purificado se guarda en recipientes que deben ser mantenidos en un horno de secado entre 40 °C - 60 °C para evitar humedad.
  - Frascos contenedores de vidrio pyrex con válvula para alto vacío con pistón de teflón o de vidrio. Estos frascos se utilizan para transportar el CO<sub>2</sub> de la línea de preparación de muestras al sistema de introducción del espectrómetro de masas de relaciones isotópicas.
  - Termos de vidrio pyrex de diferentes tamaños (1, 1/2 y 1/4 L) para nitrógeno líquido.
  - Termo de 50 litros de acero inoxidable para guardar nitrógeno líquido.
  - Uniones cajón ultra torr de 3/8 No. SS-6-UT-6 y filtro para gases SS4VCR25M.
  - Se requiere un sistema para romper el tubo de cuarzo que contiene el gas CO<sub>2</sub> proveniente de la muestra, este sistema se encuentra formado por las siguientes partes: a) una unión reductora cajón de ½ a ¼ ultra torr, No. SS-8-UT-6-4, b) tubo flexible cajón de ½, No. 321-8X-1, c) dos conos de acero inoxidable 304-8-XOA d) una unión reductora cajón ultra torr de ½ a 3/8 y un filtro para gases SS4VCR25M. El material de este inciso es para un solo rompedor. (Uniones Cajón. Swagelok Companies). Descrito en el artículo DesMaris y Hayes 1976.
  - Micropipetas de volumen variable de: 0 a 200 µl; 0 a 50 µl y de 0 a 10 µl con puntas de plástico desechables.
- Equipos necesarios para realizar la combustión en tubo de cuarzo.
- Mufla. La combustión de la materia orgánica en tubo de cuarzo sellado se realiza en una mufla que puede operar a una temperatura máxima de 1100,0 °C equipada con control digital de temperatura con un error no mayor de ± 5 °C y un control de tiempo con una resolución de 1 min.
  - Línea de Vacío 1. Para la des-gasificación de las muestras. Equipada con dos bombas de vacío con una capacidad de bombeo de 4 m<sup>3</sup>/h y una bomba difusora con trampa para nitrógeno líquido con una velocidad de bombeo de 100 l/s capaz de alcanzar una presión de 0,1 Pa o 10<sup>-4</sup> mbar
  - Línea de Vacío 2. Para la purificación criogénica de las muestras. Equipada con dos bombas de vacío con una capacidad de bombeo de 4 m<sup>3</sup>/h y una bomba difusora con trampa para nitrógeno líquido con una velocidad de bombeo de 100 l/s, capaz de alcanzar una presión de 0,1 Pa o 10<sup>-4</sup> mbar
  - Balanza analítica: con capacidad de 200 g y una precisión de 0,1 mg.
  - Horno de secado. Que mantenga una temperatura constante. Con variación máxima de ± 0,1 grados Celsius mediante un sistema de medición y control que emplee un termopar en un intervalo de temperaturas entre 50 °C-60 °C.

Preparación y Acondicionamiento del Material y de la Muestra para la combustión en tubo de cuarzo sellado.

- a) Preparación del tubo de combustión. Al tubo de cuarzo quemado previamente a 600 °C, se le adicionan 3 g de óxido cúprico y un pequeño capilar con filamento de plata. El conjunto es calentado una (1) hora a 600 °C en una mufla para eliminar cualquier resto de materia orgánica. Los tubos así preparados son almacenados en un recipiente de vidrio con tapa en un horno entre 40 °C - 60 °C. Que mantenga una temperatura constante con variación máxima de ± 1,0 grados Celsius.
- b) Preparación de muestras de azúcares disueltos o pulpa proveniente de jugos, néctares y concentrados de jugos para análisis isotópico. Se realiza la preparación siguiendo 8.7.1.2 a) y 8.7.1.2 b)
- c) Se toman entre 40 a 90 µl de los sólidos disueltos o de 8 a 10 mg de pulpa seca y se coloca un tubo pequeño de 6 mm de diámetro externo de cuarzo y se deposita invertido dentro del tubo de combustión de cuarzo de 9 mm de diámetro externo que contiene CuO, el filamento de plata y la muestra, finalmente se colocan 3 g de cobre metálico con un embudo. La combustión de la muestra se realiza utilizando el oxígeno liberado por el óxido cúprico, siendo la plata el catalizador de la reacción y el cobre metálico sirve para poder convertir los óxidos de nitrógeno en N<sub>2</sub> a una temperatura de 650 °C.

- d) Los tubos de combustión preparados como en el inciso anterior, se colocan en la línea de vacío mediante una unión ultra torr de 3/8". Las muestras se liofilizan a una presión de 1,33 Pa y finalmente se evacuan hasta alcanzar una presión de 0,133 Pa, una vez alcanzada esta presión, el tubo de cuarzo es sellado con soplete de alta temperatura.
- e) Cada vez que se prepara un conjunto de muestras para análisis isotópico de  $\delta^{13}\text{C}$ , simultáneamente se preparan al menos dos materiales de referencia de distribución internacional como ejemplo: NBS-22 (5 $\mu\text{l}$ ), IAEA-CH-7 (4 mg) o IAEA-CH6 (8 mg). Para calibrar el espectrómetro de masas.

#### **Combustión.**

Las muestras en sus correspondientes tubos de cuarzo sellados son calentadas hasta alcanzar una temperatura de 900 °C la cual se mantiene durante dos horas en una mufla, al término de este periodo se baja la temperatura a 650 °C y se mantienen ahí durante 1 h. A partir de esto los tubos se dejan enfriar lentamente hasta alcanzar la temperatura ambiente.

Purificación criogénica de  $\text{CO}_2$ .

El  $\text{CO}_2$  producto de la combustión de la muestra es separado y purificado criogénicamente, iniciando con la separación del agua mediante una mezcla frigorífica (mezcla de hielo seco con alcohol o acetona a -80 °C), para la purificación se utiliza otra trampa enfriada con nitrógeno líquido (-190 °C) que captura el  $\text{CO}_2$  y se eliminan los gases no condensables a través de una línea de vacío.

Los frascos con el  $\text{CO}_2$  purificado se colocan en el sistema automático de introducción dual de gases del espectrómetro de masas de isótopos estables para determinar la  $\delta^{13}\text{C}$  de las muestras.

**8.7.2.1.2** Método de Combustión de las muestras de sólidos disueltos o pulpa utilizando un analizador elemental acoplado a un espectrómetro de masas de isótopos estables.

#### Reactivos y Materiales

- Cápsulas de estaño de 5 mm X 9mm
- Microespátula
- Pinzas
- Micropipeta de volumen variable de 0 a 10  $\mu\text{l}$ . con puntas de plástico desechables.
- Materiales de referencia
- Los materiales empleados para la operación correcta del analizador elemental se describen en los manuales de los respectivos fabricantes de estos equipos.
- Helio 99,999 % pureza o Helio 99,995 % pureza con trampas de purificación para agua e hidrocarburos.
- Oxígeno 99,996 % pureza
- $\text{CO}_2$  99,995 % pureza
- $\text{N}_2$  99,999 % pureza

#### Equipo.

- Microbalanza con capacidad de 5 g sensibilidad de 1,0  $\mu\text{g}$
- Analizador elemental e interfase ver inciso 8.5 instrumentación
- Espectrómetro de Masas de Isótopos Estables ver inciso 8.5 instrumentación

**8.7.3** Obtención de resultados de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  para el  $\text{CO}_2$  obtenido por cualquiera de los métodos de combustión.

El  $\text{CO}_2$  producto de la combustión de las muestras de sólidos disueltos y/o pulpa descritos en los numerales 8.7.1.2 a) y b), es empleado para la determinación de las relaciones isotópicas de  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  mediante un espectrómetro de masas con características definidas en el inciso 8.5

La determinación de las relaciones isotópicas se realiza con las especies isotópicas  $^{13}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}/^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$  proveniente de las correspondientes intensidades de los haces de iones moleculares masa 44 y 45 una corregidas por contenido de  $^{17}\text{O}$  según Santrock et al 1985.

**8.7.4** Obtención de los resultados de  $\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$  para el  $\text{N}_2$  proveniente de materia orgánica obtenido por cualquiera de los métodos de combustión y reducción con cobre metálico.

Empleando el analizador elemental, los óxidos del nitrógeno obtenidos en la combustión de la pulpa, se convierten a  $\text{N}_2$  mediante una reducción con cobre metálico. Se deben programar las condiciones del espectrómetro para obtener el análisis isotópico de  $\text{N}_2$  producto de la pulpa empleado para la determinación de las relaciones isotópicas de  $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$  mediante un espectrómetro de masas con características definidas en el inciso 8.5

La determinación de las relaciones isotópicas se realiza con las especies isotópicas  $^{14}\text{N}^{14}\text{N}/^{14}\text{N}^{15}\text{N}$  proveniente de las correspondientes intensidades de los haces de iones moleculares masa 28 y 29 uma.

### 8.7.5 Cálculos

La unidad de reporte  $\delta$  es el sistema de unidades más empleado para indicar el contenido isotópico. Los valores  $\delta$  son usados para indicar las variaciones en la abundancia isotópica.

La  $\delta^{13}\text{C}$  de un compuesto está expresada mediante las relaciones isotópicas de la muestra con la relación isotópica del patrón de acuerdo a la ecuación 1 en partes por mil (‰).

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}} = \left[ \frac{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{Muestra}}}{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{VPDB}}} - 1 \right] \cdot 10^3 \quad (\text{Ec 1})$$

Donde la  $\delta^{13}\text{C}$  está expresada por los cocientes de los isótopos estables ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) de la muestra contra el patrón internacional VPDB el cual es un carbonato de origen marino de la formación cretácica Peedee en Carolina del Sur (Craig, 1957). Cuya relación isotópica absoluta de  $(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{PDB}} = 0,0112372$ . Este valor es el punto de referencia en la escala de PDB de  $\delta$  que se calculan con la ecuación 1 (Ec 1).

El espectrómetro de masas de isótopos estables da el resultado de cada análisis, directamente en unidades de  $\delta^{13}\text{C}$  incluyendo en el resultado, varias correcciones entre ellas están las correcciones por efecto: de presión, de masas parásitas, efecto de memoria, gas residual, mezcla de gases por cambio de válvulas y por abundancia isotópica, (Mook, W.G. y Groots P.M. 1973).

Como se mencionó anteriormente el resultado que entrega el espectrómetro estará en la escala VPDB, si y solo si, el  $\text{CO}_2$  utilizado como patrón interno está calibrado previamente con respecto a VPDB. Sin embargo para cumplir con la recomendación de la IUPAC del 2005 el resultado del análisis de  $\delta^{13}\text{C}$ , posteriormente se normaliza utilizando la escala L-SVEC y NBS 19, y se verifica la normalización utilizando al menos tres de los materiales de referencia de la tabla 2, con el único requisito de que cubran la escala de medición de las muestras problema.

Para el caso de jugos de fruta, los materiales de referencia pueden ser el IAEA-CH7 (polietileno), NBS-22 (aceite) y el IAEA-CH6 (Sacarosa). Tanto para la normalización como para la verificación se realiza empleando una regresión por mínimos cuadrados, en la cual en el eje de las "x" se colocan los resultados experimentales obtenidos del espectrómetro de masas de relaciones isotópicas y en el eje de las "y" se colocan los valores de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  asignados para cada uno de los materiales de referencia mostrados en la Tabla 2. El coeficiente de correlación lineal  $R^2$  no debe ser menor a 0,9999. Por ejemplo una ecuación de calibración resultante de esta normalización podría ser:  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}} = 1,004 \cdot \delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}(\text{experimental})} + 0,06$ . A partir de esta calibración verificada se calcula el resultado final del valor de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  normalizada de acuerdo a la recomendación de la IUPAC de 2005.

Al igual que el carbono, la IUPAC recomendó que la relación isotópica de cualquier material que contenga nitrógeno se debe medir y expresar en  $\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$  la cual se calcula por los cocientes de los isótopos estables ( $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ) de la muestra relativa al patrón internacional, que es aire, de acuerdo a la ecuación 2, las unidades de reporte están en partes por mil (‰). Al igual que el carbono, la normalización se realiza empleando USGS 24, USGS 25 para la verificación de la escala de la  $\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$  se realiza al igual que en el ejemplo anterior utilizando para ello los materiales de referencia de la tabla 2.

$$\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}} = \left[ \frac{(^{15}\text{N}/^{14}\text{N})_{\text{Muestra}}}{(^{15}\text{N}/^{14}\text{N})_{\text{AIR}}} - 1 \right] \cdot 10^3 \quad (\text{Ec 2})$$

### 8.7.6 Materiales de Referencia

Los materiales de referencia de la Tabla 2, han sido aprobados por el Subcomité de Medidas en Abundancia Isotópica (Subcommittee on Isotope Abundance Measurements, SIAM) de la IUPAC y se adquieren en el Organismo Internacional de Energía Atómica (IAEA International Atomic Energy Agency) o a través del National Institute of Standards and Technology NIST.

Los materiales de referencia para calibrar el CO<sub>2</sub> que se utilizará como patrón de trabajo y determinar  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  y la  $\delta^{18}\text{O}_{\text{VPDB}}$  son el NBS-19, L-SVEC y el NBS-18 que se preparan utilizando la técnica de J. M. McCrea (1950) y normalizados de acuerdo a Tyler Coplen, 1988 y 2006. O puede utilizarse un tanque de CO<sub>2</sub> o N<sub>2</sub> calibrado, como por ejemplo los fabricados por Oztech Trading Corporation.

Tabla 2		
Materiales de Referencia	$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ . (‰) $\pm \sigma$	$\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$ (‰) $\pm \sigma$
NBS-19 carbonato de calcio	+1,95	
L-SVEC carbonato de litio	-46,6	
NBS-18 carbonato de calcio	-5,01 $\pm$ 0,06	
IAEA-CO-1 carbonato de calcio	+2,49 $\pm$ 0,06	
IAEA-CO-8 carbonato de calcio	-5,76 $\pm$ 0,06	
IAEA-CO-9 carbonato de bario	-47,32 $\pm$ 0,06	
NBS-22 aceite	-30,03 $\pm$ 0,09	
IAEA CH7 poliuretano	-32,15 $\pm$ 0,1	
USGS24 grafito	-16,05 $\pm$ 0,07	
IAEA CH6 Sacarosa	-10,45 $\pm$ 0,09	
USGS40 ácido-L glutámico	-26,39 $\pm$ 0,08	-4,52 $\pm$ 0,12
USGS41 ácido-L glutámico	+37,63 $\pm$ 0,1	+47,57 $\pm$ 0,22
IAEA-CH3 celulosa	-24,72 $\pm$ 0,08	
IAEA-600 cafeína	-27,77 $\pm$ 0,09	+1 $\pm$ 0,2
IAEA-601 ácido benzoico	-28,81 $\pm$ 0,09	
IAEA-602 ácido benzoico	-28,85 $\pm$ 0,09	
IAEA-N1 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		+0,43 $\pm$ 0,07
IAEA-N2 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		+20,32 $\pm$ 0,09
IAEA-NO-3 KNO <sub>3</sub>		+4,69 $\pm$ 0,09
USGS32 KNO <sub>3</sub>		+180
USGS34 KNO <sub>3</sub>		-1,8 $\pm$ 0,2
USGS35 KNO <sub>3</sub>		+2,7 $\pm$ 0,2
USGS 25 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		-30,25 $\pm$ 0,38
USGS 26 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		+53,62 $\pm$ 0,25

#### Precisión

La precisión del método para un jugo en particular se puede derivar de los resultados obtenidos a través de un estudio de validación del método que se llevó a cabo entre varios laboratorios. Los resultados de la validación se encuentran en la norma europea ENV 12140 y ENV 13070.

#### Repetibilidad (de los resultados de mediciones).

Se expresa como la proximidad de la concordancia entre los resultados de las mediciones sucesivas del mismo mesurando, con las mediciones realizadas con la aplicación de la totalidad de las siguientes condiciones, esto es en dos análisis para la misma muestra, el mismo instrumento de medición utilizado en las mismas condiciones; el mismo lugar; la repetición dentro de un periodo corto de tiempo.

El análisis isotópico de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  en materia orgánica tiene una repetibilidad de:

Para sólidos disueltos el límite de la repetibilidad es 0,21‰

Para pulpa el límite de la repetibilidad es 0,38‰

Esto significa que si una muestra fuese enviada nuevamente al laboratorio para un análisis de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ , existe una probabilidad del 95% que el nuevo resultado de la muestra sometida estaría en un intervalo de  $\pm 0,21\text{‰}$  para sólidos disueltos y  $\pm 0,38\text{‰}$  para pulpa.

Reproducibilidad (de los resultados de las mediciones).

Se expresa como la proximidad de la concordancia entre los resultados de las mediciones del mismo mesurando, con las mediciones realizadas haciendo variar las condiciones de medición por diferentes laboratorios.

Para el análisis isotópico de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  en materia orgánica se debe alcanzar una reproducibilidad menor de:

Para sólidos disueltos el límite de la reproducibilidad es  $\pm 0,25\text{‰}$

Para pulpa el límite de la reproducibilidad es  $\pm 0,68\text{‰}$

Reporte de resultados

Para el reporte de resultados se empleará el formato sugerido en la NMX-EC-17025-IMNC-20006 "Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración"

inciso 8.16.5.10.

Expresión de Resultados

Las plantas  $\text{C}_3$  (naranja, manzana, toronja, uva, mandarina, mango, pera, ciruela, durazno, chabacano, guayaba, papaya, guanábana, fresa, tamarindo) tienen un intervalo de sólidos disueltos de  $-24\text{‰}$  a  $-28\text{‰}$ , en pulpa de  $-24\text{‰}$  a  $-28\text{‰}$  y en etanol derivado de la fermentación de los correspondientes sólidos disueltos de  $-25,5\text{‰}$  a  $-28\text{‰}$ . Estos intervalos de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  no aplican para el caso de la piña por ser una planta CAM, razón por la que se tratará aparte.

Para estimar con mayor precisión el por ciento de fruta contenida en un jugo, se debe recordar que para esto se requiere determinar en la misma muestra, la  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  en los sólidos disueltos, así como, la  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  en pulpa, donde la inclusión de este último parámetro, es con el fin emplearlo como patrón interno. Esto tiene como objeto corregir los resultados de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  en los sólidos disueltos por diferentes factores como son: la variación en el tipo de fruta y/o por la variación de las diferentes condiciones ambientales en las que crecieron las frutas. El fundamento de este hecho radica en que, en las frutas tanto los carbohidratos solubles contenidos en el jugo como otras moléculas orgánicas más complejas que forman la pulpa se generan simultáneamente durante el proceso del crecimiento de un tipo de fruta dada y por lo tanto tienen un valor de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  casi idéntico, por lo que podemos definir la siguiente ecuación.

$$\%Fruta = \frac{\delta^{13}\text{C}_{\text{Sólidos Disueltos Jugo}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{Promedio (Azúcar Caña / Maíz)}}}{(\delta^{13}\text{C}_{\text{Pulpa}} + 0,24) - \delta^{13}\text{C}_{\text{Promedio (Azúcar Caña / Maíz)}}} * 100 \quad \text{Ec 3}$$

A través de una gran cantidad de análisis reportados en la literatura internacional, así como de muestras analizadas en el laboratorio, se encontró que el valor numérico de  $-11,45\text{‰}$  es un buen estimador para el promedio de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{promedio (Azúcar Caña / Maíz)}}$  para ser empleado en las ecuaciones 3 y 4. Las cuales, representan al promedio histórico de varios tipos de carbohidratos provenientes de plantas  $\text{C}_4$  (caña de azúcar y/o edulcorantes provenientes de maíz) que son empleados como edulcorantes exógenos que comúnmente se adicionan a los jugos.

La  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  de sólidos disueltos de la fruta se denota como la  $\delta^{13}\text{C}_{\text{sólidos disueltos Jugo}}$ . Finalmente la  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  de la pulpa se representa como  $\delta^{13}\text{C}_{\text{Pulpa jugo}}$ . Por último, el valor de  $+0,24$  en el denominador de las ecuaciones 3 y 4 es una constante que ha sido obtenida experimentalmente a partir de resultados analíticos realizados en diferentes tipos de fruta, que está relacionada con el valor promedio de la  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  de los

sólidos disueltos de la fruta con la  $\delta^{13}C_{VPDB}$  de la pulpa que tiene una correlación cercana a 1. Esta constante se utiliza en la ecuación 3 de la siguiente manera:

$$\%Fruta = \frac{\delta^{13}C_{\text{Sólidos Disueltos Jugo}} - (-11,45)}{(\delta^{13}C_{\text{pulpa}} + 0,24) - (-11,45)} * 100 \quad \text{Ec 4}$$

En la aplicación de la ecuación 4 con la metodología descrita, estudios de validación han mostrado que se tiene un error probable máximo hasta de 5% en la determinación del % Fruta.

Para el caso especial de los Jugos clarificados y que por elaboración no contienen pulpa como son el jugo de manzana y el jugo de uva, el por ciento de sólidos disueltos fruta se puede calcular por medio de la ecuación 4:

$$\%Fruta = \frac{\delta^{13}C_{\text{Sólidos Disueltos Jugo}} + 11,45}{-14,55} * 100 \quad \text{Ec 5}$$

En la aplicación de la ecuación 5 con la metodología descrita, estudios de validación han mostrado que se tiene un error probable máximo hasta de 10% en la determinación del % sólidos disueltos en Fruta.

Criterios para interpretar los resultados de  $\delta^{13}C_{VPDB}$  en fruta

Los criterios para interpretar los resultados al aplicar las ecuaciones 3 y 4 de % sólidos disueltos fruta son los siguientes:

La aplicación de la ecuación 4 para jugos que contienen pulpa, se requiere de la calificación de la pulpa como un patrón interno para lo cual se aplican las siguientes condiciones:

- La  $\delta^{13}C_{VPDB}$  en pulpa se debe encontrar en el intervalo de plantas  $C_3$  (-28,5‰ a -24‰)
- El análisis de la  $\delta^{15}N_{AIRE}$  en pulpa debe ser detectable y tener un valor mayor a cero.

Una vez que se acepta a la pulpa como patrón interno, se deben tener las siguientes consideraciones:

- Si la diferencia numérica ( $\delta^{13}C_{VPDB}$  en pulpa -  $\delta^{13}C_{VPDB}$  en los sólidos disueltos) es menor que 1, y los valores de la  $\delta^{13}C_{VPDB}$  en sólidos disueltos y la pulpa se encuentran en los intervalos de las plantas  $C_3$  se puede considerar como un producto en el cual los sólidos disueltos provienen 100% de la fruta y se puede asumir como auténtico. En este caso, al aplicar la ecuación 4 resulte un valor de 98% o inclusive un poco mayor a 100%.
- Si la diferencia numérica de  $\delta^{13}C_{VPDB}$  en pulpa -  $\delta^{13}C_{VPDB}$  en sólidos disueltos es mayor que 1, se aplica la ecuación 4 para determinar el % sólidos disueltos de la fruta el cual podrá tener un error del 5%.
- Si la  $\delta^{13}C_{VPDB}$  en pulpa no se encuentra en el intervalo de plantas  $C_3$  y/o no hay el valor  $\delta^{15}N_{AIRE}$  de la presencia de nitrógeno entonces la pulpa no se puede utilizar como patrón interno y no se podrá emplear la ecuación 3. Sin embargo, es posible emplear la ecuación 5 para determinar el % sólidos disueltos de la fruta el cual podrá tener un error del 10 %. En este caso implica adición de espesantes o celulosa, que en principio de acuerdo al numeral 6.1.2 Estabilizantes y espesantes de la presente norma no se deben de agregar.

Para el cálculo del contenido de °Brix de sólidos disueltos en la fruta se puede aplicar la ecuación 6:

$$^{\circ}Brix_{\text{Fruta}} = ^{\circ}Brix_{\text{Producto}} * \frac{\%Fruta}{100} \quad \text{Ec 6}$$

$^{\circ}Brix_{\text{Producto}}$  son determinados mediante una medición directa de los °Brix del producto que se está analizando.

## 9. Información comercial

Las etiquetas de los productos objeto de esta norma deben cumplir con las disposiciones de etiquetado establecidas en la NOM-051-SCFI-1994, indicada en el apartado de referencias.

La letra de la denominación comercial deber ser del mismo tipo y tamaño.

## **10. Vigilancia**

Esta Norma Oficial Mexicana no es certificable, y su cumplimiento será vigilado por la Secretaría de Economía y la Procuraduría Federal del Consumidor, conforme a sus respectivas atribuciones.

## **11. Bibliografía**

**11.1** Cienfuegos Edith, Casar Isabel y Morales Pedro, (1998). "Carbon isotopic composition of mexican honey". *Journal of Apicultural Reseach* 36(3/4): 169 - 179

**11.2** Craig Harmon. (1953). The geochemistry of stable carbon isotopes. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 3: 53-92.

**11.3** Craig Harmon (1957). Isotopic standards for carbon and oxygen and correction factors for mass-spectrometric analysis of carbon dioxide. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 12:133-149.

**11.4** DesMaris, D.J. and Hayes J.M. (1976). Tube cracker for opening glass Sealed ampoules under vacuum. *Analytical Chem.* 48: 1651-1652.

**11.5** Mook, W.G. and Grootes P.M. (1973). The measuring procedure and corrections for the high precision mass-spectrometric analysis of isotopic abundance ratios, especially referring to carbon, oxygen and nitrogen. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics*. Vol 12, 273-298.

**11.6** A.O.A.C. Official Method 981.09 Corn Syrup in Apple Juice Carbon Ratio Mass Spectrometric Method. Chapter 37, P. 19, Fruit and Fruit Products. A.O.A.C. 16th Edition, Vol. II. 1995.

**11.7** A.O.A.C. Official Method 982.21 Corn Syrup in Orange Juice Carbon Ratio Mass Spectrometric Method. Chapter 37, P. 20, Fruit and Fruit Products. A.O.A.C. 16th Edition, Vol. II. 1995.

**11.8** J. Bricout & J. Koziat (1987). Control of the Authenticity of Orange Juices by Isotopic Analysis. *J. Agric. Food Chem.* 35, 758-780

**11.9** Doner Landis & Bills Donald. (1982). Mass Spectrometric  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  Determinations to detect High Fructose Corn Syrup in Orange Juice: Collaborative Study". *J. Assoc. OFF. Anal. Chem* 65 (3): 608-610.

**11.10** J. Koziat, A. Rossmann, G.J. Martin & P.R. Ashurst (1993). Determination of carbon-13 content of sugar of fruit and vegetable juices. *Analytica Chimica Acta*, 271, 31-38

**11.11** G.G. Martin, V. Hanote, M. Lees, Y.L. Martin (1996) Interpretation of combined  $^2\text{H}$  SNIF/NMR and  $^{13}\text{C}$  SIRA/MS analyses of fruit juices to detec added sugar, *Journal of AOAC International*, Vol. 79, No. 162-72.

**11.12** M. Gensler & H. L. Schmidt. (1994). Isolation of the main organic acid from fruit juices and nectars for carbon isotope ratio measurements. *Analytica Chimica Acta*, 299, 231-237.

**11.13** E. Jamin, J. González, G. Remaud, N. Naulet & G. Martin. (1997). Detection of Exogenous Sugar or Organic Acid Addition in Pineapple Juices and concentrates by  $^{13}\text{C}$  IRMS Analysis. *J. Agric. Food Chem.* 45, 3961-3967.

**11.14** J. Koziat, A. Rossmann, G.J. Martin, P. Johnson. (1995). Determination of the oxygen-18 and deuterium content of fruit and vegetable juice water an European inter-laboratory comparison study, *Analytica Chimica Acta* 302 (1) pp. 29-37. *Anal. Chim. Acta.* (1995), 302, 29-37.

**11.15** UNE-EN-12140:1997 Zumos de frutas y hortalizas. Determinación de la relación de los isótopos estables del carbono ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) en los azúcares de los zumos de fruta. Método por Espectrometría de Masas de Relaciones Isotópicas.

**11.16** PNE-ENV-13070 Zumos de fruta y hortalizas. Determinación de la relación de los isótopos estables de carbono ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) en la pulpa de los zumos de fruta. Método por espectrometría de masas de relaciones isotópicas.

**11.17** Code of Practice publicado por la AINJ Association of the Juice and Nectar producing Industry.

**11.18** Handbook of indices of Food Quality and Authenticity. Woodhead Publishing, 1997

**11.19** Reglamento de Control Sanitario de Productos y Servicios VII.1

## **12. Concordancia con normas internacionales**

Esta Norma Oficial Mexicana concuerda parcialmente con la Norma Internacional CODEX STAN 247-2005, Norma general del Codex para zumos (jugos) y néctares de frutas.

### **TRANSITORIO**

**UNICO.-** La presente Norma Oficial Mexicana entrará en vigor 60 días naturales después de su publicación en el Diario Oficial de la Federación.

México, D.F., a 9 de julio de 2009.- El Director General de Normas y Presidente del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Seguridad al Usuario, Información Comercial y Prácticas de Comercio, **Francisco Ramos Gómez**.- Rúbrica.