

42  
ze



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



**" DETERMINACIÓN DEL ORIGEN DEL BRANDY MEDIANTE EL  
ANÁLISIS ISOTÓPICO DE  $\delta^{13}C_{POB}$  MEDIANTE ESPECTROMETRÍA  
DE MASAS DE ISÓTOPOS ESTABLES "**

**FALLA DE ORIGEN**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA :**

**FRANCISCO JAVIER OTERO TRUJANO**

**ASESORES :**

**M. en C. PEDRO MORALES PUENTE**

**M. en C. EDITH CIENFUEGOS ALVARADO**



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 está 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  
SISTEMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de  
Exámenes Profesionales

DR. JAIME KELLER TORRES  
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN  
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el trabajo de tesis: "Determinación del Origen del Brandy mediante el Análisis

Isotópico de  $\delta^{13}C_{PDB}$  mediante Espectrometría de Masas de Isótopos Estables."

que presenta el pasante: Francisco Javier Otero Trujano  
con número de cuenta: 7630847-5 para obtener el TÍTULO de:  
Químico Farmacéutico Biólogo

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

A T E N T A M E N T E .

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuatitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 9 de Marzo de 1995

PRESIDENTE	M. en C. Guadalupe Pérez Caballero	
VOCAL	Q.F.B. José de Jesús Pérez Saavedra	
SECRETARIO	M. en C. Pedro A. Morales Puente	
1er. SUPLENTE	M. en C. Guillermo Penieres Carrillo	
2do. SUPLENTE	Q.F.B. Virginia Benitez Solís	

**Agradezco al M. en C. Pedro Morales Punte, M. en C. Edith Cienfuegos Alvarado y M. en C. Isabel Casar Aldrete la dirección, indicaciones, análisis isotópicos y correcciones durante el desarrollo de esta Tesis.**

**Por tu comprensión, amor y dedicación, gracias esposa:**

**EDITH CIENFUEGOS ALVARADO**

**A mis Padres:**

**Victoria Trujano de Otero y Nicolás Otero Suárez.**

**A mis Hijos:**

**Claudia Irenne y Francisco Israel.**

**A mis Hermanos:**

**Judith y Antonio, Olga y Jesús, Armando y Martha.**

**A mis suegros:**

**María Teresa Alvarado y Tomás Cienfuegos.**

**A toda mi familia:**

**Verónica, Angélica, Karla, Alejandro, Rodrigo, Isabel,  
Ricardo, Julio, Carolina, Teresa, Ronald, Carlos, Gloria,  
Ana, Rosa y Julio.**

## Agradecimientos

Al M. en C. Pedro Morales Puente, M. en C. Edith Cienfuegos Alvarado, M. en C. Isabel Casar Aldrete del Laboratorio de Isótopos Estables del Instituto de Física de la Universidad Nacional Autónoma de México en donde se realizó el presente trabajo.

A la Licenciada Gilda Legarreta Ito, Directora de Verificación y Calibración de SECOFI. Por su interés y apoyo en utilizar métodos modernos para determinar la calidad de los productos.

Al Ing. Félix Pezet Sandoval, Subdirector de Verificación de la Calidad de SECOFI y a la QFB Verónica García Malo, Jefe del Departamento de Certificación y Verificación de Normas Obligatorias de SECOFI, por su interés en apoyar los muestreos del mercado nacional de Brandy.

Al Lic. Rafael Almada y a la Asociación Nacional de Vitivinicultores A. C. por su apoyo e interés en el establecimiento de la Norma Oficial Mexicana NOM-V-25-1985 y de los muestreos en el mercado nacional de Brandy.

Al Ing. Eustaquio Ibarra C. y a la Ing. Aurora Galicia de Industrias Vinícolas Pedro Domecq S.A. de C.V., por su interés y apoyo económico brindado al IFUNAM de algunos muestreos del estudio y proporcionarnos las muestras de brandy inalteradas.

Al grupo de Electrónica del IFUNAM: Físico Francisco Javier Pena Blanco, Físico Ricardo César Arzate Trujillo, Físico Jesús Manuel Ortega Rueda de León, Sra. Martha Gabriela González Alvarez y en especial al coordinador del grupo Físico Francisco Fernández Escobar por su apoyo técnico y colaboración en el mantenimiento preventivo y correctivo del espectrómetro Finnigan Mat 250.

Al Sr. Francisco Javier Jaimes Beristain por las labores de mantenimiento correctivo del Laboratorio de Isótopos Estables del IFUNAM.

Al grupo del Taller Mecánico del IFUNAM y en especial al Ing. Marco Antonio Veytia, al Sr. René Presa y al Sr. Rafael Puente por su apoyo técnico.

A la M. en C. Guadalupe Pérez Caballero, al QFB José de Jesús Pérez Saavedra, al M. en C. José Guillermo Penieres Carrillo y a la QFB Virginia Benitez Solis, por revisar el presente trabajo.

A mis Profesores de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

A los Profesores que laboran en el Departamento de Química Orgánica de la F.E.S. Cuautitlán, por su apoyo y amistad, durante el tiempo que laboré con ellos; en especial al M. en C. J. Guillermo Penieres; al Q. Ismael Salas; al Q. Jaime Mondragón; a la M. en C. Olivia García; al Dr. René Miranda; al Dr. Francisco Delgado; al M. en C. Enrique Angeles; al M. en C. Carlos Cano y al M. en C. José Luis Arias.

**TITULO. "Determinación del origen del Brandy mediante el análisis isotópico de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$  mediante Espectrometría de Masas de Isótopos Estables"**

**INDICE.**

1.1 ANTECEDENTES.	2
2.1 OBJETIVOS.	6
3.1 ANALISIS ISOTOPICO.	7
4.1 FRACCIONAMIENTO ISOTOPICO.	11
5.1 FRACCIONAMIENTO ISOTOPICO DEL CARBONO EN LAS PLANTAS.	13
6.1 ANALISIS DE BRANDIES.	18
7.1 RESULTADOS Y DISCUSION.	22
8.1 CONCLUSIONES.	52
9.1 BIBLIOGRAFIA.	53

**APENDICE I.**

I.1 ESPECTROMETRO DE MASAS PARA ANALISIS DE ISOTOPOS ESTABLES.	56
I.2 DESCRIPCION DEL ESPECTROMETRO DE MASAS.	56
I.2.1 SISTEMA DE VACIO.	56
I.2.2 SISTEMA DE INTRODUCCION DE GASES.	59
I.2.3 FUENTE DE IONES.	61
I.2.4 ANALIZADOR MAGNETICO.	64
I.2.5 DETECTOR DE IONES.	68
I.3 CORRECCIONES A LOS ANALISIS OBTENIDOS.	70
I.3.1 CORRECCION POR EFECTOS DE PRESION.	70
I.3.2 CORRECCION POR IMPUREZAS EN LAS MUESTRAS, GAS RESIDUAL Y POR EFECTO DE MEMORIA.	71
I.3.3 CORRECCION POR USO DE UN PATRON INTERNO DE TRABAJO EN LUGAR DE UN PATRON INTERNACIONAL.	72
I.3.4 CORRECCION POR ABUNDANCIA ISOTOPICA.	73
I.4 PATRONES DE REFERENCIA INTERNACIONALES.	76

**APENDICE II.**

II.1 MATERIAL Y METODOS.	79
II.2 METODO DE DESTILACION.	79
II.3 METODO PARA DETERMINAR EL PORCENTAJE DE ALCOHOL EN VOLUMEN DE LAS MUESTRAS.	81
II.4 METODO PARA DETERMINAR LA $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ EN MUESTRAS ORGANICAS. (IFUNAM.C13.ORG).	83
II.5 METODO PARA DETERMINAR LA $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ EN MUESTRAS DE CARBONATOS (IFUNAM.C13.CA).	92
II.6 DIAGRAMAS DE FLUJO DE LOS METODOS UTILIZADOS.	95
II.7 TABLA ALCOHOLMETRICA.	104



## 1.1 ANTECEDENTES.

Los primeros sarmientos de vid llegaron a México hace aproximadamente 500 años de España, por los misioneros católicos que acompañaron a Hernán Cortés. El propósito de lo anterior, fue enseñarles a los indígenas un cultivo que no se conocía en América y que pudiera servirles, en todas sus facetas (fruto, pasa y vino de uva). Sin embargo, a pesar de haberse cultivado la uva en diversas partes del país, hasta este siglo nace en forma organizada la industria vitivinícola.

Vid se denomina al arbusto trepador de la familia de las vitáceas (*Vitis vinifera*) de Europa, Asia y Africa, del que derivaron las variedades cultivadas para uva de vino y de mesa. Tiene tronco leñoso del que salen ramas (Sarmientos) con nudos; hojas pecioladas y pentalobuladas, flores pequeñas amarillo verduzcas y frutos en baya reunidos en racimos compuestos.

Uva se denomina al fruto de la vid, baya comestible jugosa de diversos colores, con 1-4 semillas ovoides o carentes de semillas.

Vino se denomina a la bebida alcohólica obtenida de la fermentación del mosto de uva; químicamente es una mezcla de agua (85-90%), alcohol etílico (5-15%) y otras sustancias (ácidos tartárico y láctico, glicerina, taninos, etc.) que le confieren sus características organolépticas.

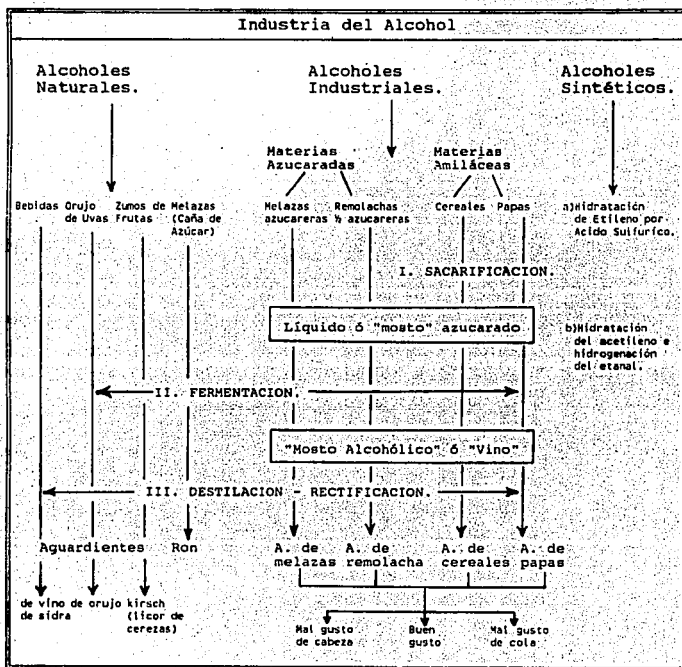
El vino se obtiene de la uva mediante el proceso de vinificación, el cual consiste en: Estrujado (pisado) que transforma la uva en mosto; Fermentación en los lagares (producida por la enzima del *Sacharomyces ellipsoideus*); Separación del hollejo (bombeo del vino de los lagares a las cubas); Pasteurización (evita la fermentación posterior del vino a ácido acético); Almacenado y/o Embotellamiento. Según sus características se distinguen varios tipos de vinos: de mezcla (ricos en alcohol y no aptos para el consumo directo), de mesa (comunes y finos) y especiales (agradables, dulces, aperitivos y espumosos).

Aguardiente se denomina a la bebida de alto contenido alcohólico obtenido mediante la destilación de otro líquido que contiene alcohol en menores proporciones. Por ejemplo del vino de uva se obtienen bebidas como el Brandy y el Cognac (38-55 %/V. de alcohol). Para conseguirlo, se calienta el vino moderadamente, de modo que la parte alcohólica se evapore; se recoge y se enfría. Los más prestigiosos licores de este tipo deben sus sabor particular a la calidad del vino del cual han sido destilados y a las cubas de madera aromática (roble) en las que se ha almacenado el vino antes de la destilación.

Brandy se denomina al aguardiente obtenido por la destilación de vinos 100% de uva fresca, el cual debe ser añejado solamente en barricas de roble blanco o encino, entendiéndose por añejamiento a la

transformación del producto que le permite adquirir las características organolépticas deseadas, por procesos físicos y químicos que en forma natural tienen lugar, durante su permanencia en las barricas. Siendo sus propiedades organolépticas las siguientes: Color: Ambarino; Olor: Característico y Sabor: Característico.

La industria de los alcoholes, los clasifica de la siguiente manera: Alcoholes Naturales; Alcoholes Industriales y Alcoholes Sintéticos como se describe a continuación:



En base a datos proporcionados por la Asociación Nacional de Vitivinicultores (ANV), se muestra la superficie plantada con vid en México (Hectáreas), desde la década de 1930 hasta el año de 1993, la cual nos indica que hubo un aumento representativo en la década de 1960 (Tabla 1, Figura 1), debido a un fenómeno de consumo, único en el mundo, consistente en que el brandy se consume mezclado a diferencia de todos los otros países del mundo, en los cuales se consume solo o con agua mineral en forma separada. Lo anterior ha sido determinante para el desarrollo de la industria vitivinícola en nuestro país, ya que en México se consume aproximadamente el 15% de vinos de mesa y vinos generosos, contra el 85% de consumo de brandy, situación exactamente inversa en todos los otros países con tradición vitivinícola.

La Ley de Impuestos a las Industrias del Azúcar, Alcohol, Aguardiente y Envasamiento de Bebidas Alcohólicas (extinta) permitía la adición de 5 Kg. de azúcar de caña por cada hectolitro de mosto, para efectos de **chaptalización** del producto; lamentablemente algunas marcas de brandy utilizaron aguardiente de caña (por su bajo costo) mezclado con aguardiente de uva hasta en un 58%, con lo que se desvirtuaba y adulteraba el brandy.

En 1983 se publicó la Norma Oficial Mexicana NOM-V-18-1983 en la cual se realizaban las siguientes determinaciones: Organolépticas (color, olor y sabor); Físicas (grado alcohólico %V, extracto seco y cenizas); Químicas (acidez fija, acidez volátil, acidez total, aldehídos, ésteres, metanol y furfural); Aditivos (colorantes y edulcorantes) y Contaminantes Químicos (Plomo, Arsénico, Cobre y Zinc).

A partir de 1985 la calidad y pureza del Brandy mejoraron, gracias al análisis de  $\delta^{13}C_{PDB}$  mediante Espectrometría de Masas que se desarrolló en el Instituto de Física de la UNAM y que se constituyó en la Norma Oficial Mexicana NOM-V-25-1985 de calidad para el brandy mexicano.

En 1991 y 1992, la industria vitivinícola mexicana, tuvo una producción aproximada de 95,600,000 litros de aguardiente de uva al 38%/Volumen (datos proporcionados por la Asociación Nacional de Vitivinicultores (ANV)), estos datos fueron calculados en base a la venta de cajas por año (10,000,000), estimando un volumen promedio envasado de 9.56 litros por caja.

El análisis de isótopos estables ( $\delta^{13}C_{PDB}$ ) ha llegado a ser una herramienta de gran utilidad para la detección de adulteración en alimentos, jugos y bebidas alcohólicas. El mercado de productos terminados es muy competitivo y ahora en el comercio internacional es necesario probar analíticamente el origen de los alimentos para fijarles precio y calidad. La proporción de isótopos estables  $^{13}C/^{12}C$ , contenidos en los compuestos tanto inorgánicos ( $CO_2$ , Carbonatos, etc.) como en orgánicos (azúcares, proteínas, enzimas, etc.) son típicos de los procesos que siguen en la naturaleza,

porque dejan la huella de su procedencia, al intervenir en ciclos biológicos o sintéticos.

**TABLA I. Superficie Plantada con Vid en México.**

Año	Superficie (Hectáreas)
1930	1,500
1940	1,900
1945	5,200
1948	6,400
1955	9,100
1958	10,700
1960	12,200
1965	19,100
1969	27,000
1975	40,000
1978	52,000
1980	62,000
1984	70,250
1985	68,000
1986	64,500
1987	61,300
1988	56,200
1990	48,000
1991	43,600
1992	41,560
1993	40,855

Superficie Plantada con Vid en México

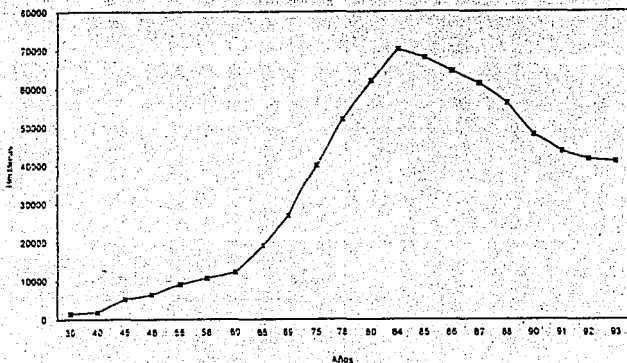


Figura 1

## 2.1 OBJETIVOS.

El presente trabajo tiene como objetivo el estudio de la factibilidad de la medida de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{POB}}$  como prueba analítica para la determinación del origen del Brandy.

De lo anterior, pueden definirse como objetivos específicos del estudio:

a) Estudio retrospectivo del impacto en la industria vitivinícola mexicana por la aplicación de la Norma Oficial Mexicana NOM-V-25-1985, desde 1985 a la fecha.

b) Revisión de las diferentes publicaciones referentes al uso de la  $\delta^{13}\text{C}_{\text{POB}}$  que se utilizan en el mundo, como métodos de control de calidad para los productos derivados de la uva.

c) Identificación de las diferentes zonas vitivinícolas de la República Mexicana.

d) Determinar el fraccionamiento isotópico durante la rectificación del etanol proveniente de muestras de brandies nacionales.

### 2.1.1 SINTESIS.

El contenido de la presente tesis se expresa de la siguiente manera:

En la sección 3.1 se describe la teoría atómica.

En la sección 4.1 se define el fraccionamiento isotópico.

En la sección 5.1 se describe el efecto de la fotosíntesis en la composición isotópica de  $^{13}\text{C}$ .

En la sección 6.1 se menciona lo que se ha realizado mediante el análisis isotópico en muestras de aguardientes.

En la sección 7.1 se analizan los resultados obtenidos con muestras de brandies de 1985 a 1994.

En la sección 8.1 se presentan las conclusiones de este trabajo.

En la sección 9.1 se encuentra la bibliografía utilizada.

En el apéndice I, se indica el funcionamiento del espectrómetro de masas para medir las abundancias isotópicas de carbono, las correcciones a los análisis obtenidos y los patrones de referencia internacional utilizados para la parte experimental.

En el apéndice II se indican el material y los métodos utilizados en la determinación de las muestras de brandies, así como los diagramas de flujo de los métodos utilizados.

### 3.1 ANALISIS ISOTOPICO.

**Teoría atómica.** Las investigaciones sobre sustancias radioactivas llevaron a demostrar que existían elementos cuyos átomos tenían el mismo número atómico pero diferían en peso atómico. A estos átomos los llamó Frederick Soddy, en 1910, "isótopos" (en griego significa mismo lugar). Dos descubrimientos significantes dieron origen a los estudios en la espectrometría de masas, en 1914 J.J. Thomson descubrió los primeros isótopos al separar en el primer espectrógrafo al Neón 22 del Neón 20 y en 1919 F.W. Aston observa que las masas de todos los isótopos no son simples múltiplos de la unidad atómica fundamental.

La estructura atómica se pudo explicar en 1932 cuando Chadwick descubrió a los neutrones, ya que la presencia de éstos dentro del núcleo eran los responsables de la existencia de los isótopos.

A la fecha se han descubierto aproximadamente 300 isótopos que son estables en el tiempo y aproximadamente 1000 isótopos radioactivos.

De 1915 a 1920, la espectrometría de masas siguió dos caminos: uno concierne a la determinación precisa de las masas atómicas y la otra a medir la abundancia relativa de las diferentes especies isotópicas.

En 1918 A.J. Dempster diseñó un espectrómetro magnético de 180° para estudiar partículas positivas y determinar su relación de carga-masa. Los iones positivos eran producidos por bombardeo de electrones. (Kiser, 1965).

Las medidas de variaciones isotópicas comenzaron con el trabajo de Nier y Gulbransen, en 1938, con isótopos de carbono.

A.O. Nier en 1948, desarrolló un espectrómetro de masas con sector magnético, con el cual logró medir masas atómicas entre 12 y 500 amu, en 1950, analizó las relaciones de abundancia isotópica relativa de los elementos ligeros tales como; carbono, oxígeno, nitrógeno, argón y potasio en sustancias naturales. (Nier, A.O., 1950). Los espectrómetros de masas que actualmente se utilizan para este tipo de análisis están basados en los diseños del espectrómetro de Nier.

La espectrometría de masas es sin duda el método más adecuado para la determinación del contenido isotópico en diversos materiales y por ello se ha convertido en una técnica invaluable en muy diversos campos.

El Instituto de Física de la Universidad Nacional Autónoma de México (IFUNAM), cuenta con un espectrómetro de masas Finnigan Mat 250 (Figura 2), el cual es uno de los cuatro instrumentos de este

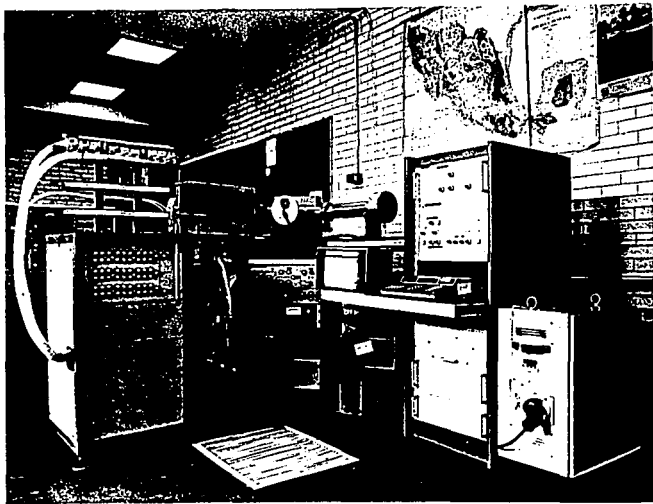


Figura 2

tipo en el país. En este instrumento se pueden analizar con alta precisión las abundancias relativas de los isótopos estables del carbono, oxígeno, nitrógeno, azufre e hidrógeno. La posibilidad de aplicaciones interdisciplinarias incluyen, entre otros: estudios hidrológicos, geológicos, ecológicos, fisiológicos (de plantas y animales), etc. En particular el análisis de isótopos estables ha llegado a ser una herramienta de gran utilidad para la detección de la adulteración en alimentos, jugos y bebidas alcohólicas. El mercado de productos terminados es muy competitivo y ahora en el comercio internacional es necesario probar analíticamente el origen de las bebidas alcohólicas para fijarles precio y calidad.

La proporción de isótopos estables  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ,  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  y D/H contenidos en los compuestos tanto inorgánicos ( $\text{H}_2\text{O}$ , el  $\text{CO}_2$ , los carbonatos, etc.) como orgánicos (los azúcares, proteínas, enzimas, etc.) son típicos de los procesos que siguen en la naturaleza, porque dejan la huella de su procedencia, al intervenir en ciclos biológicos ó sintéticos.

La técnica de mayor precisión empleada para esta determinación es la medida del contenido natural de  $^{13}\text{C}$ , por Espectrometría de Masas de Isótopos Estables. Esta determinación se expresa por los cocientes de las abundancias de los átomos estables de carbono 13 y 12, ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) los cuales están referidos a un patrón internacional y la unidad de reporte es  $\delta$  (‰), (Craig, 1953):

$$\delta^{13}\text{C} = \left[ \frac{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{muestra}}}{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{PDB}}} - 1 \right] 1000 \quad (1)$$

El patrón isotópico internacional para reportar la medida de abundancia isotópica de carbono es un carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ) de origen marino proveniente de la formación cretácica Peedee en Carolina del Sur, conocido como PDB (Pee Dee Belemnite Limestone).

En particular, para el caso del reino vegetal, las plantas durante la fotorrespiración fijan el carbono inorgánico ( $\text{CO}_2$ ) de la atmósfera por medio de ciclos biológicos, integrando éste en las sustancias orgánicas que las constituyen. Esta fijación de  $\text{CO}_2$  se puede realizar mediante 3 rutas metabólicas diferentes llamadas  $\text{C}_3$ ,  $\text{C}_4$  o CAM, en cada una de ellas se produce un efecto isotópico diferente de tal manera que las moléculas formadas tienen un contenido isotópico de carbono-13 distinto, como se puede observar en la Figura 3. (Troughton, 1972).



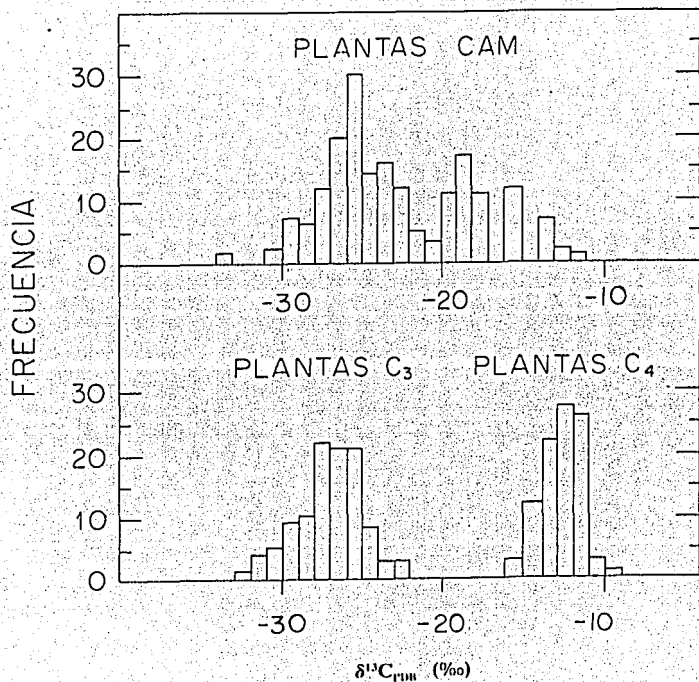


Figura 3

#### 4.1 FRACCIONAMIENTO ISOTOPICO. Definición.

Al ocurrir los diferentes procesos fisicoquímicos en la naturaleza, los isótopos se redistribuyen en los diferentes componentes por efecto de sus masas causando fraccionamiento isotópico. El fraccionamiento isotópico es causado por un fenómeno físico llamado efecto isotópico (Figura 4).

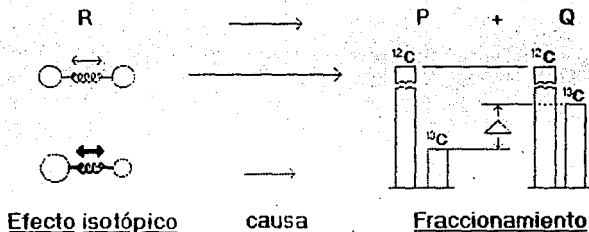
Este fraccionamiento isotópico se observa en términos de enriquecimiento o empobrecimiento del isótopo pesado. Utilizando el término de cociente de abundancia isotópica decimos: si una substancia se encuentra enriquecida en el isótopo pesado, es pesada; por ejemplo para el caso de los carbonatos la  $\delta^{13}\text{C}_{\text{POB}} \approx 6 \%$ . Cuando se encuentra empobrecida, es ligera; por ejemplo, para el caso de las plantas  $\text{C}_3$  la  $\delta^{13}\text{C}_{\text{POB}} \approx -27 \%$ . Un efecto isotópico (Figura 5), puede efectuarse en un sistema en equilibrio o durante una reacción química (cinético).

Cuando ocurre un efecto isotópico en el equilibrio el isótopo pesado se acumula en particular en un componente de un sistema. Termodinámicamente, el isótopo pesado se encuentra preferencialmente en el compuesto químico en el cual el elemento se encuentra con el enlace más fuerte. La magnitud de este efecto isotópico en el equilibrio, puede ser representada por una constante de equilibrio. Por lo cual, un factor de fraccionamiento puede ser reportado con respecto a la constante de equilibrio del sistema involucrado.

Un efecto isotópico cinético ocurre cuando la velocidad en una reacción química depende de la masa atómica de un elemento que se encuentre en una posición particular de una de las especies reactantes. Un efecto isotópico cinético primario se describe cuando la sustitución isotópica se realiza en la posición en la cual hay cambios en los enlaces químicos. Un efecto isotópico cinético secundario ocurre cuando la sustitución isotópica se realiza en una posición que no se encuentra involucrada con la reacción química. La magnitud de un efecto isotópico cinético puede ser representado en términos del cociente de constantes de velocidad. En el ejemplo de la Figura 5, para un efecto isotópico cinético las especies que contienen  $^{12}\text{C}$  en la posición 2 reaccionan 1.0232 veces más rápido que las especies que contienen  $^{13}\text{C}$  en la misma posición. (Hayes, 1982).

Cuando en una reacción hay un efecto isotópico y la formación de productos no es cuantitativa, siempre se observa un fraccionamiento isotópico.

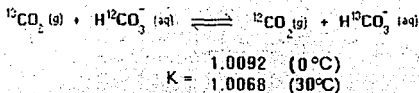
En general, los efectos isotópicos en el equilibrio se encuentran en la naturaleza en material inorgánico y los efectos isotópicos cinéticos en material orgánico.



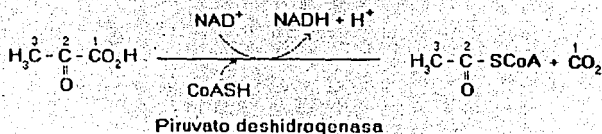
**Figura 4.** Representación esquemática de la relación entre efecto isotópico (fenómeno físico) y el fraccionamiento isotópico (en cantidad observable).

### Efectos Isotópicos

#### a) Equilibrio.



#### b) Cinética.



$$\left(\frac{^{13}\text{k}}{^{12}\text{k}}\right)_{\text{C-2}} = 1.0232$$

**Figura 5.** Ejemplos de efectos isotópicos.

## 5.1 FRACCIONAMIENTO ISOTOPICO DEL CARBONO EN LAS PLANTAS.

Durante la fotosíntesis, las plantas fijan el bióxido de carbono de manera que asimilan preferentemente al isótopo ligero del carbono ( $^{12}\text{C}$ ), por lo que el contenido relativo del isótopo  $^{13}\text{C}$  en la materia orgánica es menor que el contenido en el  $\text{CO}_2$  atmosférico. Por lo tanto, se dice que están empobrecidas en  $^{13}\text{C}$ . Los principales mecanismos fotosintéticos para la fijación del carbono en las hojas de las plantas, son conocidos como  $\text{C}_3$ ,  $\text{C}_4$  y CAM, y corresponden a diversas características anatómicas, bioquímicas, fisiológicas así como a distinto contenido de la relación de isótopos  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ .

La gran mayoría de las plantas utiliza el mecanismo fotosintético de la glucosa de tipo  $\text{C}_3$ , conocida también como Ciclo de Calvin (Figura 6); en ella, las plantas fijan el  $\text{CO}_2$  por una reacción (oscura) catalizada por la ribulosa-1,5-difosfato (RUDP), formando dos moléculas de 3-fosfoglicerato, de tres carbonos, al cual debe su nombre y esta substancia es posteriormente convertida en glucosa. A este ciclo pertenecen plantas principalmente de las zonas templadas, ejemplo: vid, remolacha azucarera, papa, manzana, arce (maple), naranja, ciruela, cebada, arroz, centeno, trigo, durazno, plátano, tabaco, etc.

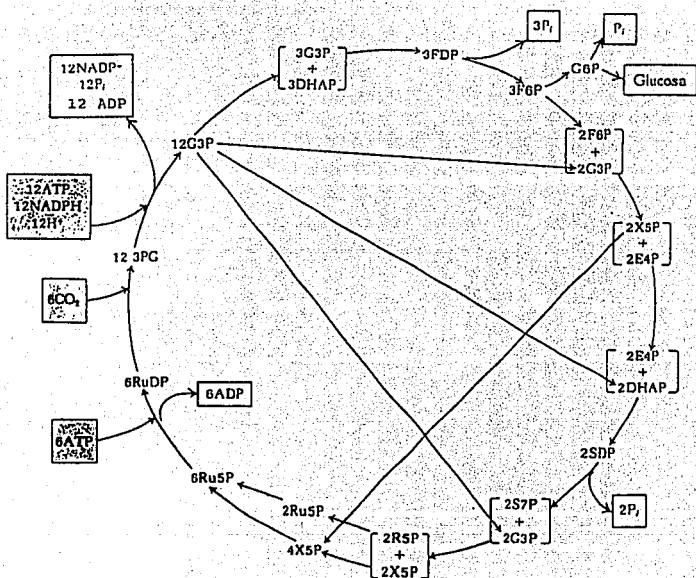
En las plantas que utilizan el ciclo  $\text{C}_4$  o de Hatch-Slack, de formación de glucosa (Figura 7), las hojas de las plantas contienen dos tipos de células fotosintéticas, que presentan diferente organización bioquímica y estructural: las células túnico-vasculares rodean las venas y las células mesófilas están dispuestas libremente a su alrededor. Los primeros productos de fijación del  $\text{CO}_2$  son ácidos dicarboxílicos de cuatro carbonos (oxalacético, málico y aspártico), por los cuales se le da el nombre de plantas  $\text{C}_4$ . El  $\text{CO}_2$  se fija al inicio por una reacción catalizada por la enzima fosfoenolpiruvato-carboxilasa, dando como resultado que el  $\text{CO}_2$  se fije como oxalacetato en las células mesófilas. En algunas plantas  $\text{C}_4$ , el malato formado por oxidación del oxalacetato es transportado a las células túnico-vasculares, donde es descarboxilado por la enzima málico [malato-deshidrogenasa (descarboxiladora) (NADPH)]. En otras plantas  $\text{C}_4$ , el aspartato formado por la transaminación del oxalacetato es finalmente descarboxilado en las células túnico-vasculares. Después, el  $\text{CO}_2$  liberado en estas dos reacciones reacciona con la ribulosa-1,5-difosfato formando 3-fosfoglicerato, que es convertido en hexosa por el ciclo de Calvin en las células túnico-vasculares.

El ciclo de Hatch Slack se completa por el transporte del piruvato a las células mesófilas, donde se transforma en oxalacetato vía fosfoenolpiruvato. Se ha establecido que la fosfoenolpiruvato-carboxilasa del ciclo  $\text{C}_4$  de las células mesófilas, posee una elevadísima afinidad por el  $\text{CO}_2$ , mientras que la ribulosa-difosfato-carboxilasa del ciclo de Calvin muestra una baja afinidad por el  $\text{CO}_2$ , por lo cual las células mesófilas sirven para coleccionar

**Figura 6** Formación Fotosintética de la glucosa a partir de  $\text{CO}_2$ , por el ciclo de Calvin.

Clave:

- 3PG = ácido 3-fosfoglicérico.
- G3P = gliceraldehído-3-fosfato.
- DHAP = fosfato de dihidroxiacetona.
- FDP = Fructosa-1-difosfato.
- F6P = Fructosa-6-fosfato.
- G6P = glucosa-6-fosfato.
- E4P = eritrosa-4-fosfato.
- X5P = xilulosa-5-fosfato.
- SDP = sedoheptulosa-1,7-difosfato.
- S7P = sedoheptulosa-7-fosfato.
- R5P = ribulosa-5-fosfato.
- Ru5P = ribulosa-5-fosfato.
- RuDP = ribulosa-1,5-difosfato.



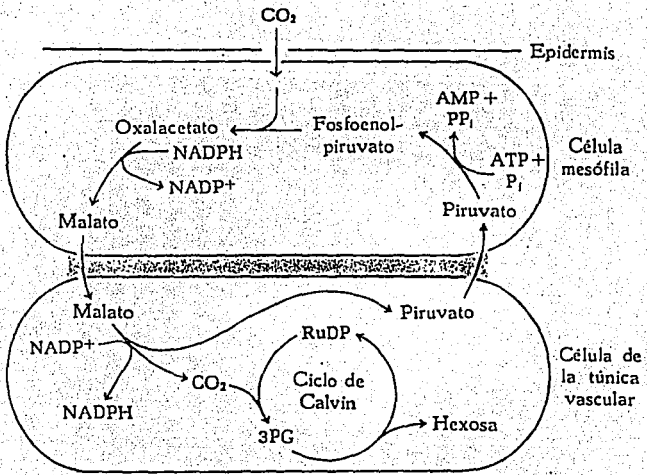
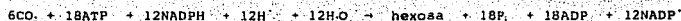


Figura 7 ciclo de Hatch Slack de fijación del CO<sub>2</sub> en las plantas C<sub>4</sub>.

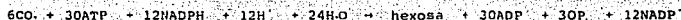
CO<sub>2</sub> con gran eficacia y después transferirlo a las células túncico-vasculares, para producir una elevada concentración de CO<sub>2</sub>, capacitando de esta forma a la ribulosa-difosfato-carboxilasa de las células túncico-vasculares para que fijen el CO<sub>2</sub> de un modo muy efectivo. A este ciclo pertenecen principalmente plantas tropicales, ejemplo: caña de azúcar, maíz, sorgo, amaranto, algodón, pastos, etc. (Hatch, Slack, Johnson, 1967 y Lenhinger, 1979).

Ecuaciones globales de la producción de hexosa por las plantas C<sub>3</sub> y C<sub>4</sub>:

Plantas C<sub>3</sub>:



Plantas C<sub>4</sub>:



Las plantas C<sub>4</sub> requieren, para sintetizar una unidad de hexosa, mucho más ATP que las plantas C<sub>3</sub>. A pesar del exceso de ATP que consumen, las plantas C<sub>4</sub> pueden sintetizar hexosa mucho más rápido por unidad de superficie de hoja y son más eficientes con las intensidades lumínicas. Las plantas C<sub>3</sub> muestran una fotorrespiración considerable por la oxidación del ácido glicólico que procede de una reacción con oxígeno (en vez de CO<sub>2</sub>) con la ribulosa-difosfato. Sin embargo, a pesar de que las plantas C<sub>4</sub> son mucho menos activas en fotorrespiración, son mucho más eficientes en actividad fotosintética neta que las plantas C<sub>3</sub>. (Lenhinger, 1979).

El grupo de plantas Crasulacean Acid Metabolism (CAM), tienen un camino fotosintético similar a ambos grupos. En ausencia de luz se comportan como plantas C<sub>3</sub>, esto indica que durante la noche abren sus estomas y fijan el CO<sub>2</sub>, con ayuda de la enzima ribulosa-1,5-difosfato (RUDP) y en presencia de luz cierran sus estomas y se comportan como plantas C<sub>4</sub>, utilizando la enzima fosfoenolpiruvato-carboxilasa (PEP). En general, son las plantas crasuláceas y cactáceas de las zonas desérticas: agave azul, nopal, piña, orquídeas, etc. (Somerville y colaboradores, 1984).

Las moléculas de bióxido de carbono atmosférico tiene diferentes variedades isotópicas <sup>12</sup>C<sup>16</sup>O<sub>2</sub> (98.46%), <sup>13</sup>C<sup>16</sup>O<sub>2</sub> (1.095%), <sup>12</sup>C<sup>16</sup>O<sup>18</sup>O (0.195%), <sup>12</sup>C<sup>16</sup>O<sup>17</sup>O (0.079%). Sin embargo, la relación de δ<sup>13</sup>C<sub>PDB</sub> ≈ -7.6 ‰ y en los últimos 22 años, casi no ha cambiado en ninguno de los dos hemisferios. Este valor se ha observado en aire marítimo lejos de influencias continentales y está corregido para eliminar el efecto de la presencia del N<sub>2</sub>O que es un componente natural de la atmósfera. Es obvio que existan variaciones en el cociente de N<sub>2</sub>O/CO<sub>2</sub> (0.89 ± 0.01 X 10<sup>-3</sup> en 1978) que excedan un 5%, debido a cambios en la estación, latitud ó temporales en los cuales es necesario hacer correcciones significantes por el contenido de N<sub>2</sub>O.

(más de un 0.01 ‰). Valores más negativos de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{pob}}$  han sido observados en aire continental, siempre y cuando se está lejos de zonas industriales. (Keeling, et al 1979, Mook y Jongsma 1987).

En todas las plantas, independientemente de la ruta fotosintética que utilicen, existe un fraccionamiento durante la fijación fotosintética del  $\text{CO}_2$  en favor del isótopo ligero del carbono ( $^{12}\text{C}$ ), por lo que tienen un bajo contenido de carbono-13 ( $^{13}\text{C}$ ) con respecto al  $\text{CO}_2$  atmosférico.

Este fraccionamiento isotópico se debe a las enzimas que catalizan los procesos primarios de carboxilación. Para las plantas  $\text{C}_3$ , la enzima RUDP-carboxilasa produce un fraccionamiento en el isótopo  $^{13}\text{C}$  del orden de 17 ‰ y para las plantas  $\text{C}_4$ , la enzima PEP-carboxilasa el fraccionamiento es menor, del orden de 2 a 5 ‰ en la fijación de  $\text{CO}_2$  atmosférico. Los estudios realizados en plantas han ofrecido valores de la  $\delta^{13}\text{C}_{\text{pob}}$  con un intervalo de -22 hasta -33 ‰, para las plantas  $\text{C}_3$ , y para las plantas  $\text{C}_4$  se han encontrado valores en  $\delta^{13}\text{C}_{\text{pob}}$  con un intervalo de -10 a -20 ‰. (Bender, Margaret, 1971).  
Figura 3.



### 6.1 ANALISIS DE BRANDIES.

Los brandies y vinos varían en sus características y calidad dependiendo de donde (regiones particulares de cultivo) y cuando han sido producidos (año de cosecha), así como de la variedad de uvas de las que proceden.

El análisis de  $^{13}\text{C}$  de los alcoholes provenientes de la fermentación de los carbohidratos, permiten determinar el origen de las plantas utilizadas en su elaboración, ya sea plantas  $\text{C}_3$ ,  $\text{C}_4$  ó CAM.

En 1975, Bricout y colaboradores obtuvieron la  $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$  para alcohol sintético, alcohol de caña (ron), alcohol de remolacha azucarera (betabel), alcohol de uva (vino), alcohol de manzana y alcohol de maíz los cuales se encuentran en la Tabla 2:

Tabla 2.  $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$  en Alcohol proveniente de diferentes fuentes.

Origen	$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ (‰)
Sintético	
Francia	-28.0
Estados Unidos.	-34.0
Ron	
No. 1	-11.0
No. 2	-10.1
Betabel	-28.1
Vino	-24.9
Manzana	-25.9
Maíz	-11.5

En 1979, Rauschenbach y colaboradores obtuvieron un intervalo de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$  para 10 muestras de alcohol sintético de -25 a -32 ‰; para 22 muestras de alcohol de papa, de -25.3 a -27.8 ‰; para 3 muestras de vino (2 Húngaros y 1 Rumano), de -24.9 a -26.5 ‰; para 2 muestras de alcohol de maíz (1 Italiano y 1 Estadounidense), de -10.3 ‰ y -10.8 ‰, respectivamente; y para una muestra de alcohol de trigo, de -23.9 ‰, corroborando las diferencias de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$  entre plantas  $\text{C}_3$  y  $\text{C}_4$ .

En 1982, Simpkins y Rigby (en Australia) midieron la  $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$  de diferentes mostos, así como la  $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$  de diferentes bebidas alcohólicas. Descritos en las Tablas 3 y 4:

**Tabla 3. Análisis de  $\delta^{13}C_{PDB}$  de diferentes mostos.**

Sustrato fermentable	$\delta^{13}C_{PDB}$ (‰)	Ruta fotosintética
Uva	-26.0	C <sub>3</sub>
Arroz	-25.9	C <sub>3</sub>
Trigo	-25.3	C <sub>3</sub>
Papa	-24.9	C <sub>3</sub>
Cebada	-24.0	C <sub>3</sub>
Avena	-23.4	C <sub>3</sub>
Caña de azúcar	-11.8	C <sub>4</sub>
Sorgo	-11.4	C <sub>4</sub>
Maíz	-10.3	C <sub>4</sub>

**Tabla 4. Análisis de  $\delta^{13}C_{PDB}$  de diferentes bebidas alcohólicas.**

Tipo de aguardiente	Sustrato fermentado	Número de muestras	Intervalo de $\delta^{13}C_{PDB}$ (‰)	$\delta^{13}C_{PDB}$ (‰)
Whisky escosés	Maíz, Cebada	51	-17.8 a -12.0	-15.4
Whisky escosés	Cebada.	2	-24.2 a -22.9	-23.6
Whisky australiano	Cebada, Maíz	3	-24.2 a -14.6	-17.8
Ginebra	Sorgo, Trigo	3	-10.9 a -10.5	-10.7
Bourbon	Maíz, Centeno, Cebada.	6	-13.8 a -12.3	-12.7
Tequila	Agave.	4	-12.2 a -10.8	-11.5
Aguardientes blancos y Vodka	Melazas (caña de azúcar).	10	-13.0 a -10.4	-12.2
Brandy australiano	Uva.	20	-27.1 a -24.5	-25.9
Brandy importado	Principalmente uva.	10	-26.0 a -20.2	-24.0
Brandy de ciruela	Ciruela.	4	-23.9 a -21.8	-22.7
Sake	Arroz.	2	-20.9 a -20.3	-20.6
Starka	Centeno.	1		-23.2

En este estudio, de acuerdo a los valores obtenidos de  $\delta^{13}C_{PDB}$ , se puede observar que algunos de los brandies importados se encontraban adulterados con alcohol de caña de azúcar ( $\delta^{13}C_{PDB} = -11.8$  ‰); esto es, que los destilados de uva pudieron ser mezclados con aguardientes provenientes de plantas C<sub>4</sub>.

En 1983, Misselhorn y colaboradores, llevaron a cabo un estudio en 100 muestras de alcoholes rectificadas de diferentes partes del mundo (60% alemanas y otros países europeos, 20% de

Norte y Sur América; 10% de Africa y 10% Asiáticas) para determinar el origen de la materia prima; asimismo, utilizando los valores de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ , poder establecer las diferencias de las rutas fotosintéticas de las plantas  $\text{C}_3$  y  $\text{C}_4$ ; como se describe en la Tabla 5:

Tabla 5.  $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$  de Alcohol proveniente de diferentes fuentes.

Sustrato	$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ (‰)	Tipo de planta
Maíz	-10.5	$\text{C}_4$
Caña de azúcar	-12.0	$\text{C}_4$
Madera	-23.2	$\text{C}_3$
Tapioca (Yuca)	-24.3	$\text{C}_3$
Centeno	-24.4	$\text{C}_3$
Trigo	-24.8	$\text{C}_3$
Uva	-26.3	$\text{C}_3$
Papa	-26.4	$\text{C}_3$
Remolacha azucarera	-26.5	$\text{C}_3$
Alcohol sintético	-28.0	-

Este estudio nos indica que las diferencias entre los valores de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$  permiten llevar a cabo un proceso de discriminación efectivo para las diferentes fuentes de procedencia de los alcoholes, ya sea que su origen sea de plantas  $\text{C}_3$  ó de plantas  $\text{C}_4$ .

En 1989, el Dr. Martín de EUROFINS llevó a cabo un estudio de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$  en etanol obtenido a partir de mostos de uva españoles de tres regiones productoras diferentes, proporcionadas por el Dr. Rebuelta del Consejo regulador de la denominación Brandy de Jerez (Tomelloso 23 muestras, Badajoz 15 muestras y Jerez 6 muestras), teniendo los siguientes resultados, Tabla 6:

Tabla 6.  $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$  provenientes de alcohol de diferentes regiones.

Región	$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ (‰)	$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ (‰)		$\sigma$
		inferior	superior	
Tomelloso	-25.85	-27.50	-24.30	0.8
Badajoz	-25.20	-27.20	-23.90	1.0
Jerez	-26.00	-26.90	-25.50	0.5

Este estudio, a diferencia de los anteriores, presenta variaciones naturales significativas de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$  dependiendo de la región geográfica originaria de las muestras; ya que las mismas no presentaban adulteración alguna.

En México, la adulteración en Brandy (aguardiente de uva, planta  $C_3$ ) se lleva a cabo con alcohol proveniente de la caña de azúcar (planta  $C_4$ ), por lo que es fácil determinar el porcentaje de adulterante adicionado al Brandy por medio del análisis de  $\delta^{13}C_{PDB}$ . Sin embargo, en Europa el adulterante utilizado en Brandies y Vinos es el alcohol proveniente de la remolacha azucarera (planta  $C_3$ ), la cual tiene un valor de  $\delta^{13}C_{PDB}$  similar al de la uva. Debido a este problema, de 1986 a 1991 G.J. Martin desarrolló un método de Resonancia Magnética Nuclear (NMR) en el cual determina la relación de deuterio/hidrógeno, ya sea en el metilo, en el metileno y en el total, con lo cual tienen una diferenciación cuantitativa utilizando el análisis de variable múltiple para diferenciar el origen del alcohol (uva ó remolacha azucarera) en la muestra, la cual no se puede obtener por el método de espectrometría de masas ya sea en  $\delta^{13}C$ ,  $\delta^{18}O$ ,  $\delta D$ .

## 7.1 RESULTADOS Y DISCUSION.

## 7.2 REPRODUCIBILIDAD DE PATRONES INTERNACIONALES.

En esta sección se presenta la precisión y exactitud de los análisis isotópicos con un espectrómetro de masas. Para ello, como primer paso se realizaron las determinaciones de patrones internacionales de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{POB}}$  conocidas, cuyos resultados se encuentran en la Tabla 7:

**TABLA 7. Patrones Internacionales.**

PATRONES INTERNACIONALES	$\delta^{13}\text{C}_{\text{POB}}$ ‰ $\pm \sigma$ Valores certificados por el NIST.	$\delta^{13}\text{C}_{\text{POB}}$ ‰ $\pm \sigma$ LAB. IFUNAM Valores Experimentales.	Dif. P.I.	No.
SRM 8539 NBS-22 (Aceite)	-29.73 $\pm$ 0.09	-29.72 $\pm$ 0.02	0.01	20
SRM 8540 PEFI (Polietileno)	-31.77 $\pm$ 0.08	-31.81 $\pm$ 0.02	-0.04	20
SRM 8542 SUCROSE ANU (Sacarosa)	-10.47 $\pm$ 0.13	-10.39 $\pm$ 0.04	0.08	20
NBS-18 (CaCO <sub>3</sub> carbonatita)	- 5.04 $\pm$ 0.06	- 5.06 $\pm$ 0.08	-0.02	08
NBS-19 (CaCO <sub>3</sub> mármol)	+ 1.95 $\pm$ 0.02	+ 1.95 $\pm$ 0.05	0.00	10
NBS-20 (CaCO <sub>3</sub> mármol)	- 1.06 $\pm$ 0.02	- 1.04 $\pm$ 0.01	0.02	06
NBS-21 (Grafito)	-28.10 $\pm$ 0.03	-28.10 $\pm$ 0.02	0.00	05

Dif. P.I.: Es la diferencia de los valores de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{POB}}$  certificados proporcionados por el NIST menos los valores de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{POB}}$  experimentales obtenidos en el laboratorio.

No. Número de muestras analizadas en el laboratorio.

Los patrones internacionales; NBS-22, PEFI, Sacarosa ANU y NBS-21 se prepararon cuidadosamente con la técnica IFUNAM. C13. ORG. de combustión a 900°C para muestras orgánicas, en tubo de cuarzo, descrita en el apéndice II, basada en la técnica descrita por Boutton y colaboradores en 1983.

Los patrones internacionales NBS-18, NBS-19, y NBS-20 al ser muestras de carbonatos, se prepararon con la técnica IFUNAM. C13. CA. la cual se encuentra descrita detalladamente en el apéndice II, basada en la técnica descrita por Craig, 1953.

De la Tabla 7 podemos asegurar que el espectrómetro de masas está calibrado y los métodos de preparación de las muestras se

encuentran bajo control estadístico, ya que los valores son precisos y exactos.

### 7.3 ESTUDIO ESTADÍSTICO DE LOS LÍMITES EXTREMOS DE $\delta^{13}\text{C}_{\text{POB}}$ EN AGUARDIENTES DE UVA DURANTE LA VENDIMIA DE 1984.

La Norma Oficial Mexicana NOM-V-25-1985 publicada en el Diario Oficial de la Federación el 21 de Junio de 1985, establece que el valor promedio de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{POB}}$  para aguardientes destilados de alcoholes provenientes de uva de origen certificado cultivada en México, es de -27.12 ‰; no obstante, no se hace mención al origen geográfico del aguardiente, variedad de uva del que proviene, ni al intervalo de variación natural de la uva, ni a la desviación estándar de los datos utilizados. Los datos no publicados de las muestras de aguardiente de uva de origen certificado de la vendimia de 1984 con los que se generó dicha Norma, se muestran en la Tabla 8 y Figura 8.

Tabla 8.  $\delta^{13}\text{C}_{\text{POB}}$  de aguardientes puros de uva de la vendimia de 1984 con los que se calculó la Norma NOM-V-25-1985.

Muestra	$\delta^{13}\text{C}_{\text{POB}}$ (‰)
S-1	-26.57
S-2	-26.91
S-3	-27.74
V-1	-27.05
V-2	-27.66
V-3	-26.84
V-4	-26.43
V-5	-27.00
V-6	-28.22
V-7	-27.27
V-8	-27.85
V-9	-26.14
V-10	-26.81
V-11	-27.13
V-12	-26.46
V-13	-27.32
V-14	-27.08
V-15	-28.08
V-16	-26.87
V-17	-27.35
V-18	-26.69
V-19	-27.18
n = 22	$\bar{x} = -27.12$ ‰ $\sigma = 0.53$ ‰

El promedio de veintidos muestras fue de  $-27.12$  ‰ con una desviación estándar  $\pm 0.53$  ‰, teniendo un intervalo para  $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$  de  $-26.14$  ‰ a  $-28.22$  ‰.

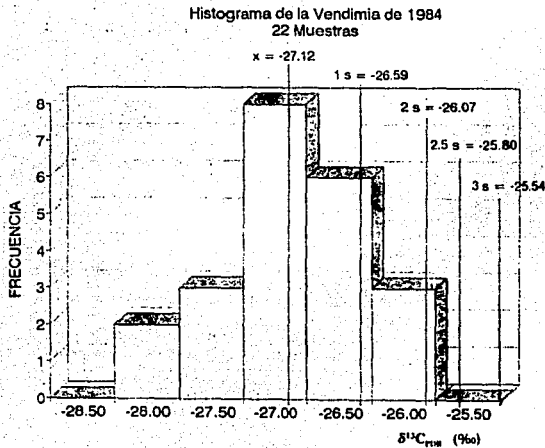


Figura 8

Como primer criterio para determinar el porcentaje de alcohol de uva contenido en el brandy, se hizo una curva de calibración con la cual se obtuvieron las siguientes fórmulas:

- a) % de alcohol de caña añadido =  $6.8120 \cdot \delta^{13}C_{PDB} + 184.72$  y  
 b) % de alcohol de uva =  $-6.8120 \cdot \delta^{13}C_{PDB} - 84.72$

para facilitar la certificación de las muestras por la SECOFI.

Posteriormente, se midió la  $\delta^{13}C_{PDB}$  en muestras de aguardiente de caña de azúcar para observar su variación natural (Tabla 9), ya que la curva de calibración anterior se realizó únicamente con una muestra de alcohol de caña.

**TABLA 9.  $\delta^{13}C_{PDB}$  de Alcohol proveniente de caña de azúcar.**

Muestra No. (Alcohol de caña)	$\delta^{13}C_{PDB}$ (‰)
1 (1985)	-11.62
2 (1985)	-11.96
3 (1985)	-11.98
4 (1985)	-11.85
5 (1986)	-13.12
6 (1986)	-13.47
7 (1986)	-13.14
8 (1986)	-13.16
9 (1993 Jalisco)	-12.30
10 (1993 Veracruz)	-12.12
11 (1993 Morelos)	-12.90
n = 11	$\bar{x} = -12.56$ (‰) $\sigma \pm 0.62$ (‰)

Para realizar una gráfica de correlación lineal (Figura 9) entre el porcentaje de aguardiente de caña de azúcar adicionado al brandy y la  $\delta^{13}C_{PDB}$  de las mezclas, se hicieron cinco series de mezclas, las cuales fueron preparadas a partir de alcohol de uva y alcohol de caña con una  $\delta^{13}C_{PDB}$  conocida; los alcoholes presentaban el mismo grado alcohólico (75°G.L.). Las mezclas fueron preparadas volumétricamente en las siguientes proporciones: 75%-25%, 50%-50% y 25%-75% de alcohol de caña adicionado al alcohol de uva; los valores obtenidos de  $\delta^{13}C_{PDB}$  para las distintas mezclas se muestran en la Tabla 10.



**TABLA 10. Media y Desviación estandar de  $\delta^{13}C_{PDB}$  en diferentes mezclas v/v de alcohol de uva-alcohol de caña.**

100%-0% uva-caña $\delta^{13}C_{PDB}$ (‰)	75%-25% uva-caña $\delta^{13}C_{PDB}$ (‰)	50%-50% uva-caña $\delta^{13}C_{PDB}$ (‰)	25%-75% uva-caña $\delta^{13}C_{PDB}$ (‰)	0%-100% uva-caña $\delta^{13}C_{PDB}$ (‰)
-27.08	-24.11	-20.34	-16.68	-13.12
-27.13	-24.08	-20.35	-16.72	-13.47
-27.12	-24.22	-20.31	-16.75	-13.14
-27.09	-24.13	-20.33	-16.74	-13.16
-27.07	-23.38	-20.02	-16.66	-13.12
$\bar{y} = -27.10$	$\bar{x} = -23.98$	$\bar{x} = -20.27$	$\bar{z} = -16.71$	$\bar{z} = -13.20$
$\sigma \pm 0.02$	$\sigma \pm 0.31$	$\sigma \pm 0.13$	$\sigma \pm 0.03$	$\sigma \pm 0.13$

**TABLA 11. Datos para obtener la ecuación de una línea recta.**

Porcentaje alcohol de uva-caña	$\delta^{13}C_{PDB}$ (‰) % alcohol de uva	Porcentaje alcohol de caña-uva	$\delta^{13}C_{PDB}$ (‰) % alcohol de caña
100%-0%	-27.10	100%-0%	-13.20
75%-25%	-23.98	75%-25%	-16.71
50%-50%	-20.27	50%-50%	-20.27
25%-75%	-16.71	25%-75%	-23.98
0%-100%	-13.20	0%-100%	-27.10
m	-0.14028	m	0.14028
b	-13.238	b	-27.26
r	0.99936	r	0.99936

Utilizando el promedio de los resultados obtenidos, los cuales se ajustan a una línea recta como se observa en la Tabla 11, estas ecuaciones pueden ser utilizadas como curva de calibración (Figura 9) para determinar el porcentaje de alcohol de caña que se adicione al alcohol de uva ó el % de alcohol de uva contenido en la muestra, de la siguiente manera:

- a) % de alcohol de uva:  $y = -13.24 + (-0.14028x)$ , donde:  
% alcohol de uva =  $-7.129 \delta^{13}C - 94.37$ .
- b) % de alcohol de caña:  $y = -27.27 + 0.14028x$ , donde:  
% alcohol de caña =  $7.129 \delta^{13}C + 194.37$ .

Las mezclas anteriores se pueden utilizar como curva de calibración para calcular el porcentaje de adulteración, admitiendo que si la muestra de brandy tiene una  $\delta^{13}C_{PDB} = -26.57$  ‰ es considerado como un brandy puro de uva.

Si el valor de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{POB}}$  es más positivo se considera que el brandy se encuentra adulterado, sin tomar en cuenta que el intervalo de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{POB}}$  para aguardientes puros de uva es de -28.22 a -26.14 ‰, para la NOM-V-25-1985, se utilizó la fórmula anteriormente descrita:

$$\% \text{ de alcohol de uva} = -6.812 \cdot \delta^{13}\text{C}_{\text{POB}} - 84.72;$$

tomando como límite superior para considerar un brandy puro de uva una  $\delta^{13}\text{C}_{\text{POB}} = -26.38 \text{ ‰}$ .

Es por ello que posteriormente se hizo un muestreo más amplio de aguardiente de uva de origen certificado para determinar su intervalo de variación natural, debido a que la fórmula utilizada por la SECOFI, si se tenía un brandy con una  $\delta^{13}\text{C}_{\text{POB}} < -27.12 \text{ ‰}$  el resultado era mayor al 100% en contenido de alcohol de uva (por ejemplo un brandy con una  $\delta^{13}\text{C}_{\text{POB}} = -28.22 \text{ ‰}$  es igual a 107.5% de alcohol de uva).

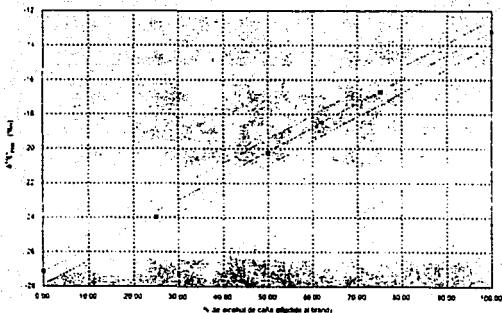


Figura 9

**7.4 ESTUDIO ESTADISTICO DE LOS LIMITES EXTREMOS DE  $\delta^{13}C_{POB}$  EN AGUARDIENTES DE UVA DURANTE LA VENDIMIA DE 1986.**

Con el objeto de establecer los parámetros estadísticos de la producción de aguardiente de uva de origen certificado, se realizó un muestreo de las principales regiones productoras de la República Mexicana. Los resultados y el análisis de  $\delta^{13}C_{POB}$  de la vendimia de 1986 se encuentran en la Tabla 12 y Figura 10; las principales zonas geográficas de producción de aguardiente de uva se observan en la Figura 11.

Cabe hacer notar que la precisión en la determinación de los análisis es de 0.05 ‰ y que cada muestra se analizó por triplicado, por lo que cualquier diferencia mayor de 0.1 ‰ es real y no debida a errores experimentales en la determinación.

**Tabla 12. Valores de  $\delta^{13}C_{POB}$  para aguardientes puros de la vendimia 1986 en distintas regiones.**

**Tabla 12.1**

Aguascalientes	°G.L.	$\delta^{13}C_{POB}$ (‰) $\pm \sigma$
JOB	38°	-26.70 $\pm$ 0.07
CAI	38°	-26.86 $\pm$ 0.05
CAB	38°	-26.51 $\pm$ 0.06
SAA	38°	-26.52 $\pm$ 0.04
Promedio	Regional	-26.65 $\pm$ 0.14

**Tabla 12.2**

Baja California	°G.L.	$\delta^{13}C_{POB}$ (‰) $\pm \sigma$
M-V	38°	-26.25 $\pm$ 0.02
VLC	38°	-26.53 $\pm$ 0.09
EMV	38°	-27.00 $\pm$ 0.01
FID	38°	-26.37 $\pm$ 0.03
GAT	38°	-27.13 $\pm$ 0.12
HOR	38°	-27.14 $\pm$ 0.07
ITT	38°	-26.34 $\pm$ 0.03
VLC	38°	-26.64 $\pm$ 0.01
M-A	38°	-26.58 $\pm$ 0.06
2-A	38°	-26.17 $\pm$ 0.05
M-7	93°	-27.20 $\pm$ 0.10
Promedio	Regional	-26.67 $\pm$ 0.37

**Tabla 12.3**

Caborca	°G.L.	$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}} (\text{‰}) \pm \sigma$
V	38°	-26.88 ± 0.01
VI	38°	-26.96 ± 0.06
VII	38°	-26.58 ± 0.02
VII	38°	-27.10 ± 0.01
M-1	93°	-27.23 ± 0.02
M-5	93°	-26.96 ± 0.01
Promedio	Regional	-26.95 ± 0.20

**Tabla 12.4**

Coahuila	°G.L.	$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}} (\text{‰}) \pm \sigma$
AGT	38°	-27.14 ± 0.01
TIA	38°	-27.21 ± 0.11
M-3	93°	-27.49 ± 0.03
Promedio	Regional	-27.28 ± 0.15

**Tabla 12.5**

Hermosillo	°G.L.	$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}} (\text{‰}) \pm \sigma$
AHP	38°	-27.74 ± 0.01
I-A	38°	-28.08 ± 0.00
M-2	38°	-28.43 ± 0.05
M-2	93°	-27.92 ± 0.01
M-4	93°	-28.33 ± 0.02
M-8	93°	-27.79 ± 0.02
S-F	93°	-27.96 ± 0.01
Promedio	Regional	-28.04 ± 0.24

**Tabla 12.6**

Zacatecas	°G.L.	$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}} (\text{‰}) \pm \sigma$
M-1	38°	-26.67 ± 0.11
M-B	38°	-27.01 ± 0.02
M-A	38°	-26.79 ± 0.05
M-B	38°	-26.94 ± 0.01
RMO	38°	-26.91 ± 0.01
M-G	93°	-26.86 ± 0.01
Promedio	Regional	-26.86 ± 0.11

Tabla 12.7. Promedios de n = 37.

n	Promedio $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ (‰)	Límite Inferior $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ (‰)	Límite Superior $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ (‰)	$\sigma$ (‰)
37	-27.05	-28.43	-26.17	$\pm 0.57$

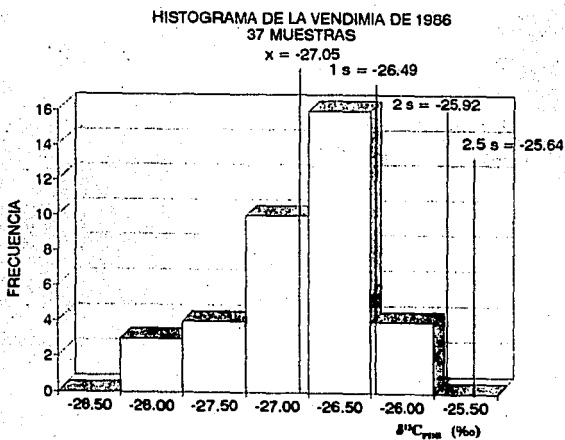
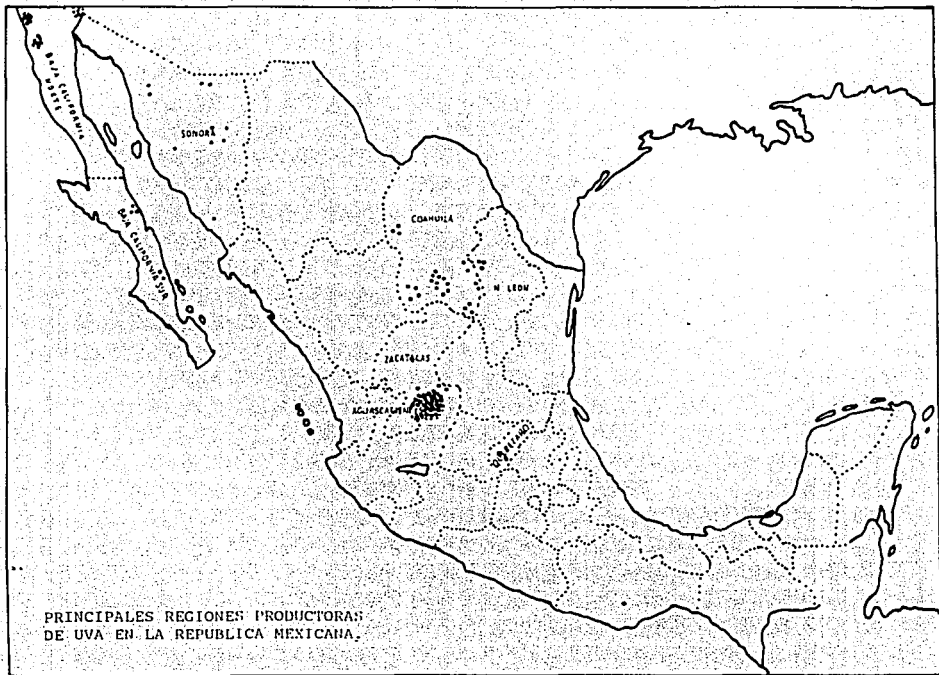


Figura 10



**7.5 ESTUDIO ESTADISTICO DE LOS LIMITES EXTREMOS DE  $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ , EN AGUARDIENTES DE UVA DURANTE LAS VENDIMIAS DE 1984 Y 1986.**

Para comparar los resultados obtenidos (vendimia de 1986), con los de la vendimia de 1984, estos se agruparon de diversas formas, con el fin de concentrar la información obtenida. El resumen se llevó a cabo calculando los promedios y la desviación estándar de la siguiente manera:

- a) Calculando el promedio aritmético de todas las muestras.
- b) Calculando el promedio aritmético de los promedios de cada región.
- c) Calculando el promedio pesado para la vendimia de 1986, multiplicando el promedio de cada región por el porciento de producción de cada zona.

**TABLA 13. Resultados de las agrupaciones con sus parámetros estadísticos.**

	n	Promedio $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ (‰)	$\sigma$
Todas las muestras.	37	-27.05	0.57
Promedios Regionales.	6	-27.08	0.44
Promedios Regionales Pesados.	6	-26.99	

**TABLA 14. Porcentajes de producciones regionales de 1986 utilizados para la obtención del promedio regional pesado.**

Región	% de producción de aguardiente de uva en 1986	Promedios Regionales $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ (‰)	Promedio Regional Pesado. (‰)
Caborca	21%	-26.95	-5.66
Aguascalientes y Zacatecas	27%	-26.78	-7.231
Hermosillo	29%	-28.04	-8.129
Coahuila y La Laguna	16%	-27.28	-4.365
Baja California	4%	-26.67	-1.067
Queretaro *	2%	-27.10	-0.542
	99%	-27.14 $\pm$ 0.44	-26.99

\* Dr. K. Winters, Coastal Science Laboratories Austin, Texas.

El valor promedio de las 37 muestras de este estudio (vendimia de 1986:  $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}} = -27.05$  ‰) que es igual al valor que se reportó en la Norma Oficial Mexicana NOM-V-25-1985 para brandies puros de uva (vendimia de 1984:  $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}} = -27.12$  ‰), refleja sin lugar a dudas que el valor promedio de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$  de los brandies producidos en México ha sido constante en los últimos 3 años y que estos muestreos independientes han sido representativos de la población total.

Si se toma en cuenta el intervalo natural de los valores para  $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$  encontrados en el muestreo de 1986 de -28.43 a -26.17 ‰, se puede decir que la autenticidad o pureza del 100% de una muestra en particular, no puede juzgarse utilizando sólo como referencia un punto de la gráfica reportada en la Norma Oficial Mexicana NOM-V-25-1985 (100% puro:  $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}} = -27.12$  ‰), sino que es necesario conocer los límites estadísticos para hacer el proceso de certificación de autenticidad con mayor seguridad (ver Figura 10).

Análogamente a este estudio en otros países se lleva a cabo la certificación del origen de otros productos naturales mediante la relación isotópica de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ , como son el jugo de manzana, jugo de naranja, miel de abeja y miel de maple.

Los límites estadísticos que se obtienen de la distribución normal, se basan en la población total de los muestreos de 1984 y 1986, dependiendo del nivel de confianza o de la probabilidad que



se quiera tener de que una muestra auténtica, sea clasificada como tal.

Debido a que la adulteración del brandy se lleva a cabo con aguardiente de caña de azúcar, cuyo valor de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{POB}}$  es más positivo, el límite inferior para considerar que un brandy se encuentra al 100% se tomará de la  $\delta^{13}\text{C}_{\text{POB}}$  de la muestra más negativa que se halla encontrado durante el muestreo (-28.43 ‰).

De esta manera, la probabilidad de que una muestra auténtica caiga dentro de los límites estadísticos establecidos por una desviación estándar ( $1\sigma$ ) de (-27.50 a -26.67 ‰), es del 83.3%, lo que significa que de seis muestras analizadas, una podría ser clasificada erróneamente. Sin embargo, si los límites estadísticos se amplían a dos desviaciones estándar ( $2\sigma$ ) de (-27.91 a -26.26 ‰), la probabilidad aumentaría al 97.73%, lo que significa que una de 44 muestras estaría clasificada erróneamente. Sin embargo este límite no alcanza a agrupar las muestras con un contenido del 100% de uva. Ver Tabla 15 y Figura 12.

Tabla 15. Probabilidad de error en la clasificación de las muestras problema, basándose en los niveles de confianza estadísticos.

Límite	Límite Superior de $\delta^{13}\text{C}_{\text{POB}}$ (‰)	Probabilidad de error.
$\bar{x} + 1\sigma$	-26.67	83.34% 1 de 6
$\bar{x} + 2\sigma$	-26.26	97.73% 1 de 44
$\bar{x} + 2.5\sigma$	-26.06	99.99% 1 de 110
$\bar{x} + 3\sigma$	-25.84	99.99% 1 de 770

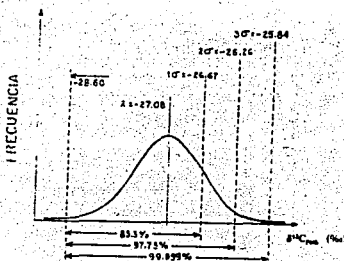
Al utilizar el criterio estadístico de  $2.5\sigma$  a ambos lados del promedio, se incluyen en él a los límites extremos de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{POB}}$  de las variaciones naturales, teniendo un margen de seguridad razonable para incluir el error analítico en que se puede incurrir al realizar la determinación en el laboratorio. De esta manera, las muestras cuyo valor de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{POB}}$  esté entre los límites estadísticos de -28.12 a -26.06 ‰ deben de ser considerados como aguardientes puros; mientras que las muestras con valores más positivos a partir de una  $\delta^{13}\text{C}_{\text{POB}} = -26.05$  ‰ en adelante, deben ser clasificadas como adulteradas.

Sin embargo, cabe hacer notar que una muestra de brandy con una  $\delta^{13}\text{C}_{\text{POB}} = -26.06$  ‰ que cumpla con el criterio estadístico, puede corresponder a una adulteración de 13.2% de un aguardiente puro de uva con una  $\delta^{13}\text{C}_{\text{POB}} = -28.12$  ‰ con alcohol de caña ( $\delta^{13}\text{C}_{\text{POB}} = -12.56$  ‰). A esto se le denomina límite de detección y estadísticamente significa que con este método (en el caso de límite inferior) solo se pueden detectar adulteraciones mayores al 13.2%. En la Figura 12 se muestra el límite de detección.

Para mejorar y optimizar el límite de detección se pueden seguir dos caminos:

a) Las muestras con valores de  $\delta^{13}C_{PDB}$  más positivos al límite superior (-26.06 ‰) deberán de confirmar su autenticidad con otro tipo de prueba analítica (análisis isotópico de hidrógeno D/H).

b) Tener un control sistemático de la producción de aguardiente por variedades y por regiones para poder comparar los valores de  $\delta^{13}C_{PDB}$  de un aguardiente en particular; con su correspondiente valor de  $\delta^{13}C_{PDB}$  regional y/o por la variedad de uva empleada en su elaboración. En la parte de recomendaciones se propone un estudio de la vendimia de cada año para conocer de una manera más confiable estas variaciones naturales y poder determinar el criterio de variedades y regiones.



ESTIMACION ESTADISTICA POR INTERVALOS DE CONFIANZA PARA EL ANALISIS DE  $^{13}C$  EN MUESTRAS DE BRANDY.

Figura 12

**7.6 ANALISIS DE  $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$  EN AGUARDIENTES DE UVA DURANTE LA VENDIMIA DE 1987.**

Para comparar los valores obtenidos en las vendimias de 1984 y 1986, se realizó el análisis de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$  de la vendimia de 1987, que se encuentra en la Tabla 16 y Figura 13.

Como se podrá observar los resultados de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$  de los aguardientes de uva producidos en la República Mexicana se han mantenido dentro de los límites ya establecidos (NOM-V-25-1985).

**Tabla 16. Valores de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$  para aguardientes puros de la vendimia 1987 en distintas regiones.**

**Tabla 16.1**

Región	Muestra	$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ (‰)
Aguascalientes	01	-26.88
	02	-26.56
		$\bar{x} = -26.72$
		$\sigma \pm 0.16$

**Tabla 16.2**

Región	Muestra	$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ (‰)
Baja California	01	-26.40
	02	-26.18
	03	-26.10
	04	-26.10
	05	-26.70
	06	-27.56
	07	-27.62
	08	-26.84
	09	-26.29
	10	-26.33
	11	-26.64
	12	-26.54
		$\bar{x} = -26.61$
		$\sigma \pm 0.49$

**Tabla 16.3**

Región	Muestra	$\delta^{13}C_{PDB}$ (‰)
Caborca	01	-26.80
	02	-28.60
	03	-27.70
	04	-26.80
	05	-27.20
	06	-26.00
	07	-27.49
	08	-26.90
	09	-26.63
	10	-27.05
	11	-26.90
	12	-27.05
	13	-27.20
	14	-26.95
	15	-26.60
		$\bar{x} = -27.06$ $\sigma \pm 0.56$

**Tabla 16.4**

Región	Muestra	$\delta^{13}C_{PDB}$ (‰)
Coahuila	01	-27.52

**Tabla 16.5**

Región	Muestra	$\delta^{13}C_{PDB}$ (‰)
Hermosillo	01	-27.90
	02	-27.75
	03	-28.48
	04	-28.39
	05	-28.19
	06	-28.17
		$\bar{x} = -28.15$ $\sigma \pm 0.26$

Tabla 16.6

Región	Muestra	$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ (‰)
Zacatecas	01	-26.70
	02	-26.77
		$\bar{x} = -26.74$ $\sigma \pm 0.03$

Tabla 16.7. Promedios de n = 38.

n	Promedio $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ (‰)	Límite Inferior $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ (‰)	Límite Superior $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ (‰)	$\sigma$ (‰)
38	-27.07	-28.60	-26.00	$\pm 0.69$

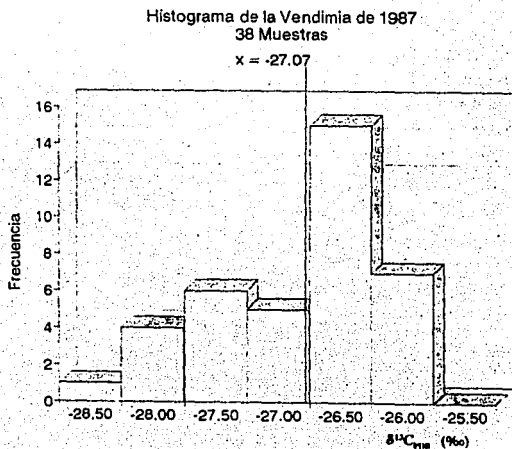


Figura 13

**7.7 ANALISIS DE  $\delta^{13}C_{PDB}$  DE LA UVA AL AGUARDIENTE DURANTE LAS VENDIMIAS DE 1987 Y 1988.**

En los años de 1987 y 1988, se realizaron en el laboratorio de isótopos estables del IFUNAM los siguientes estudios, correspondientes para determinar la  $\delta^{13}C_{PDB}$  en: uvas completas, hoja y tallo de la vid así como del aguardiente originado de las mismas, las cuales provienen de diferentes regiones de la República Mexicana (Caborca, Hermosillo y Baja California), además de ser de diferentes variedades de uva (Carignane, Thompson, Palomino, Chenin Blanc, French Colombard, Cabernet Sauvignon, Petite y Zinfandel); situando los resultados, en las Tablas 17:

**Tablas 17. Muestras de Uvas Completas, Hoja y Tallo de Vid, y Aguardiente en 1987 y 1988.**

**Tabla 17.1 Recolección de uvas: 28 de mayo de 1987.**

Variedad de uva	Región	$\delta^{13}C_{PDB}$ (‰) Uva	$\delta^{13}C_{PDB}$ (‰) Hoja de vid	$\delta^{13}C_{PDB}$ (‰) Tallo de vid
Carignane	Caborca	-24.81	-25.09	-24.11
Carignane	Hermosillo	-26.23	-25.98	-25.13
Thompson	Caborca	-23.56	-25.64	-24.02
Palomino	Hermosillo	-24.69	-26.73	-27.71

**Tabla 17.2 Aguardientes elaborados con uvas de la recolección del 28 de mayo de 1987.**

Variedad de Uva	$\delta^{13}C_{PDB}$ (‰) mosto	$\delta^{13}C_{PDB}$ (‰) Aguardiente	Diferencia (‰)
Carignane	-25.57	-27.98	-2.41
Palomino	-25.62	-27.79	-2.17
Thompson	-23.56	-25.45	-2.89

**Tabla 17.3 Recolección de uvas: 28 de Julio de 1987.**

Variedad de uva	Región	$\delta^{13}C_{PDB}$ (‰) Uva	$\delta^{13}C_{PDB}$ (‰) Hoja de vid	$\delta^{13}C_{PDB}$ (‰) Tallo de vid
Carignane	Caborca	-24.34	-26.30	-24.40
Carignane	Hermosillo	-26.63	-26.89	-25.50
Thompson	Caborca	-23.16	-26.20	-24.18
Thompson	Hermosillo	-26.01	-25.40	-26.54

**Tabla 17.4 Recolección de uvas: Agosto de 1988; procedencia Baja California.**

Variedades de uva	$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ (‰) Uva.	$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ (‰) Hoja de vid	$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ (‰) Tallo de vid
Chenin Blanc	-26.46	-25.81	-26.67
French Colombar	-25.85	-28.34	-27.51
Cabernet Sauvignon	-27.72	-27.79	-26.68
Palomino	-23.70	-25.76	-25.10
Petite	-26.48	-28.00	-25.23
Zinfandel	-24.77	-25.43	-24.61
Cabernet	-23.50	-26.87	-25.75

**Tabla 17.5 Aguardientes elaborados con uva y caña de azúcar de la recolección de julio de 1987.**

Variedad de Uva	$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ (‰) mosto	$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ (‰) Aguardiente	Diferencia (‰)
Carignane	-24.56	-26.41	-1.90
Thompson	-23.39	-26.36	-2.90
Caña de azúcar	-11.10	-13.20	-2.10

**Tabla 17.6  $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$  del jugo concentrado de uva al vino y aguardiente de la cosecha de julio de 1987.**

Variedad de Uva	$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ (‰) concentrado 70°B <sub>x</sub> -0°G.L.	$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ (‰) Vino 10°G.L.	$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ (‰) Aguardiente 92°G.L.
Carignan	-23.77	-25.50	-27.29
Thompson	-23.07	-25.46	-26.20

Con los resultados de estos estudios, observamos las siguientes diferencias:

a) Los resultados de la  $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$  difieren dependiendo de la variedad de uva que se utilice.

b) Los resultados de la  $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$  difieren dependiendo de la parte anatómica de la planta en la que se realice la determinación.

c) Los resultados de la  $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$  difieren dependiendo de la zona geográfica en donde se siembre la vid.

d) Los resultados de la  $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$  no difieren significativamente dependiendo del año de la recolección de las muestras (vendimia), en muestras de la misma variedad de uvas.

e) Los resultados muestran que el fraccionamiento isotópico ocurre durante el proceso de la fermentación, éste induce un empobrecimiento de aproximadamente 2.5 ‰ de  $^{13}\text{C}$ ; sin embargo, el contenido de  $^{13}\text{C}$  de los aguardientes provenientes de la uva reflejan el ciclo fotosintético de la planta original.

#### 7.8 ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS RESULTADOS DE $\delta^{13}\text{C}_{\text{POB}}$ EN MUESTRAS DE BRANDIES NACIONALES DE 1985 A 1994.

A partir de 1985 a 1994 (Figura 14) se han recopilado los resultados de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{POB}}$  de muestras de brandies nacionales, enviados por SECOFI (Secretaría de Comercio y Fomento Industrial) al Laboratorio de Espectrometría de Masas de Isótopos Estables del IFUNAM, a los cuales se les realizó un estudio comparativo (Figuras 15 y 16), con el cual se observa la tendencia de dichos productos para mejorar su calidad (en base a la Norma Oficial Mexicana NOM-V-25-1985).

En la Figura 15, se pueden observar tres diferentes distribuciones, las cuales corresponden a: aguardientes de uva, aguardientes de caña y a las mezclas respectivas, corroborándose en la Figura 18, donde observamos los límites superior e inferior, así como las desviaciones estándar que presentan dichas muestras.

A partir de 1989, con la entrada al país de brandies importados (brandies españoles, cuyo valor de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{POB}}$  tiene un intervalo de -23.9 a -27.5 ‰), considerando que los brandies procedentes de Jerez de la Frontera tenían valores de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{POB}}$  cercanos al límite superior, localizamos en la Figura 16, una doble distribución, la cual no es atribuible a las muestras de brandies nacionales. Por ello, en la NOM-032-SCFI-1993 se hace mención a los límites de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{POB}}$  para brandies españoles anteriormente citados.

En la Figura 16, además de las dos distribuciones anteriormente mencionadas, lo que se deduce, ayudándonos también con la Figura 18, es que la calidad de las muestras mejora ya que los límites superior e inferior se reducen notablemente, así como la desviaciones estándar que presentan las muestras.

Por último, la Figura 17 nos presenta el panorama comparativo de los resultados anuales en los análisis de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{POB}}$  de las muestras de brandy analizadas.



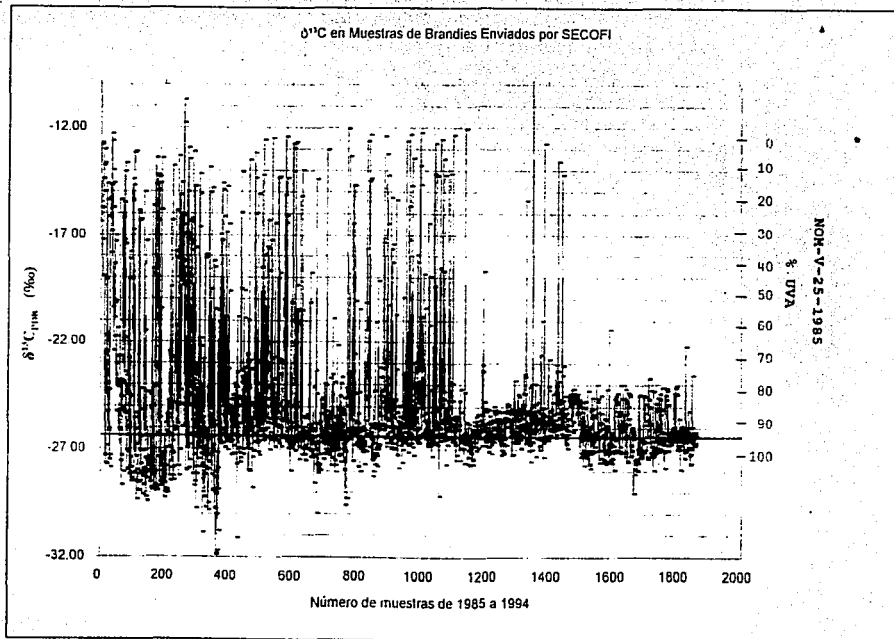


Figura 14

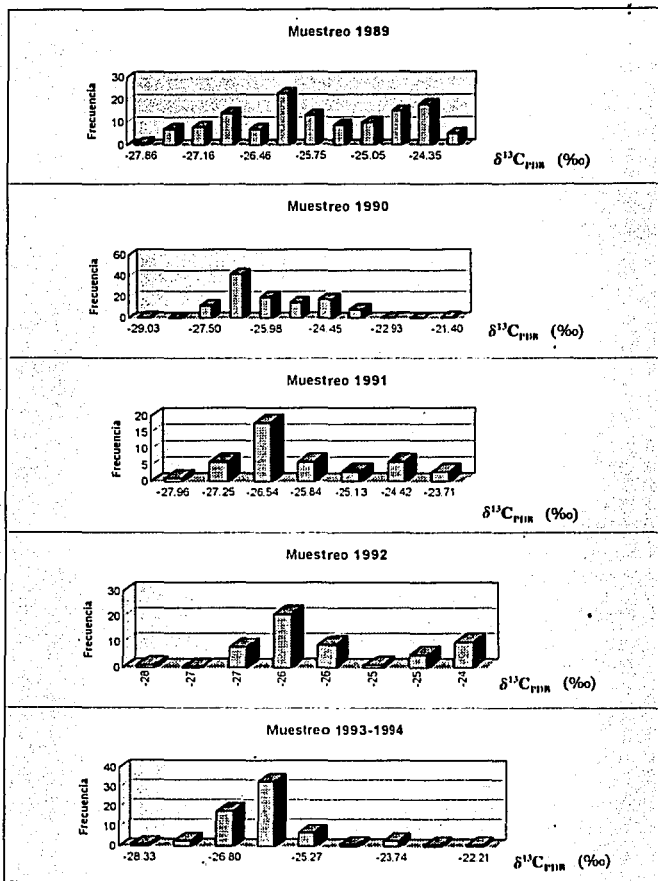


Figura 16

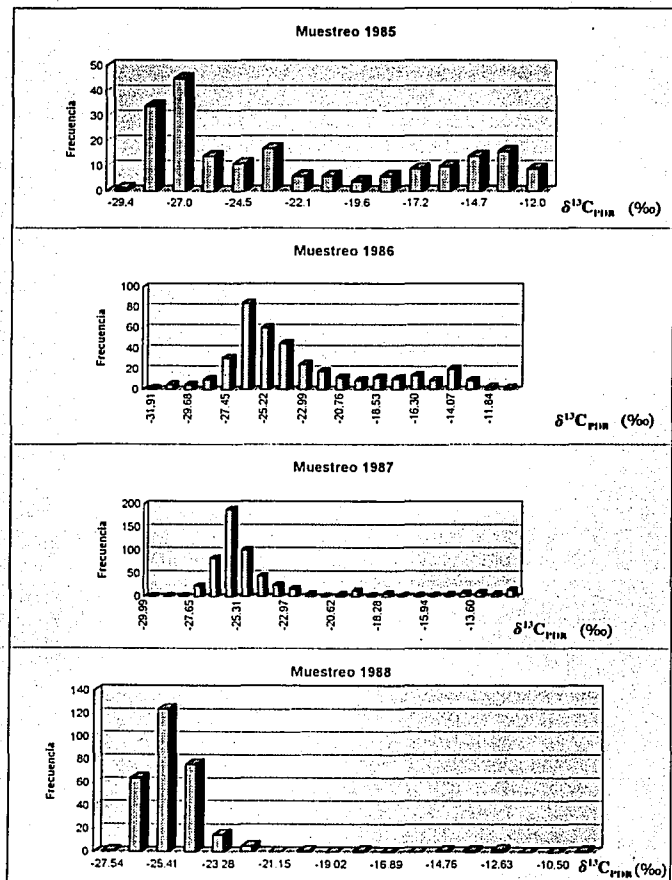


Figura 15

### Muestreo de Brandy (1985-1994)

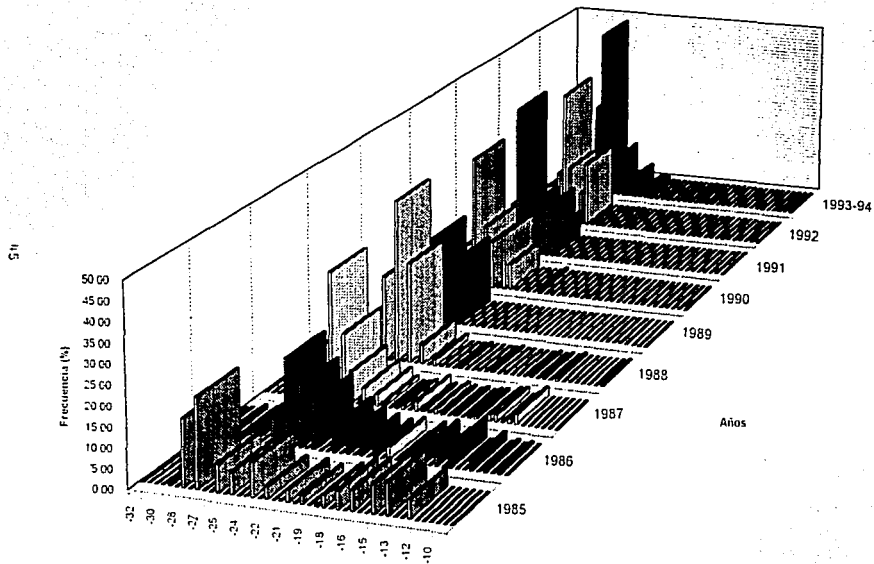
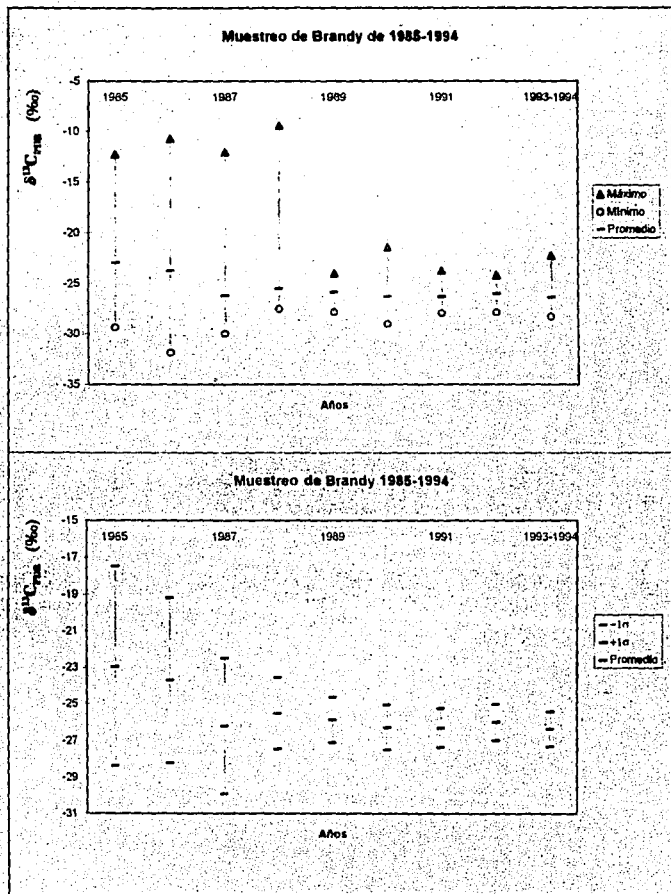


Figura 17



**Figura 18**

## 7.9 ANALISIS DE $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ EN MUESTRAS DE BRANDY DESTILADO.

Para comprobar si la destilación ocasiona fraccionamiento isotópico en las muestras de brandy, se realizaron los siguientes experimentos:

### 7.9.1 DESTILACION DE AGUARDIENTE DE UVA, CAÑA Y MEZCLAS.

A) Se midió la  $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$  de aguardientes a 38°C.L.

B) Los aguardientes anteriores se destilaron fraccionadamente en una columna vigreaux, colectándose las fracciones con un contenido entre 87-90°C.L., y se midió la  $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ .

C) El producto de B, se diluyó con agua destilada a 38°C.L. y se redestilaron con el mismo procedimiento anterior, colectando fracciones entre 87-92°C.L. y se determinó la  $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ .

Los resultados se muestran a continuación en la Tabla 18:

Tabla 18.

$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ (‰) aguardiente original	Contenido de alcohol °G.L.	$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ (‰) primera destilación	Contenido de alcohol °G.L.	$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ (‰) segunda destilación
-26.20	90	-26.40	92	-26.30
-24.20	88	-24.50	89	-24.50
-21.50	87	-21.60	88	-21.50
-26.50	88	-26.30	88	-26.20
-21.60	87	-21.80	87	-21.80
-12.80	88	-13.10	88	-13.10
-20.60	88	-20.60	89	-19.70
-21.60	88	-22.00	90	-21.80
-23.80	89	-24.30	89	-23.90
-25.70	89	-25.70	89	-25.60
-24.60	89	-24.40	89	-24.50

Con el objetivo de verificar la diferencia entre los resultados de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$  del brandy como producto terminado y el destilado del mismo, se llevaron a cabo las siguientes pruebas:

a) Determinación de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$  en brandies como producto terminado.

b) Determinación de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$  en destilados de brandies (destilación fraccionada utilizando columna vigreux). Tabla 19:

Tabla 19.

No. de muestra	$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ (‰) Brandy 38°C.L.	$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ (‰) destilado $\approx 80^\circ\text{C.L.}$	Diferencia (‰)
1	-24.77	-25.19	0.42
2	-25.66	-25.74	0.08
3	-26.25	-26.32	0.07
4	-26.72	-26.75	0.03
5	-25.79	-26.28	0.49
6	-24.14	-24.31	0.17
7	-24.74	-24.95	0.21
8	-26.54	-26.55	0.01
9	-24.77	-24.56	0.29
10	-26.32	-26.52	0.02
			$\bar{x} = 0.20$ $\sigma = 0.15$

Por último, para comparar las diferencias de las determinaciones de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$  entre las partes de un destilado (cabeza, cuerpo y cola) y un destilado completo, se llevo a cabo el análisis de una muestra (100 ml. = 100%), la cual se destiló por medio de dos aparatos diferentes:

1. Destilación fraccionada con columna Vigreux (40 cm. de longitud) 24/40.

A. Recolectando las partes del destilado: Cabeza (5%/V); Cuerpo (28%/V) y Cola (5%/V).

B. Recolectando el destilado completo (36%/V).

2) Destilación fraccionada con columna QFT (19 cm. de longitud) 19/22.

C. Recolectando las partes del destilado: Cabeza (5%/V); Cuerpo (28%/V) y Cola (5%/V).

3) Sin destilar (Brandy como producto terminado).

D. Determinación de la  $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$  (‰) de la muestra comercial Brandy al 38%/V.

Estos análisis se realizaron por duplicado y los resultados se encuentran en la Tabla 20.

Tabla 20.

	Brandy sin destilar 38° G.L.	Cabeza (5%) 80° G.L.	Cuerpo (28%) 78-85° G.L.	Cola (5%) 76° G.L.	Destilado Completo (36%) 84° G.L.
A Vigreux		-25.70 -25.69	-26.41 -26.46	-27.35 -27.33	
A Vigreux		-25.77 -25.77	-26.28 -26.29	-26.87 -26.86	
B Vigreux					-26.32 -26.38
B Vigreux					-26.32 -26.30
C QFT		-25.91 -25.91	-26.32 -26.33	-26.66 -26.67	
C QFT		-25.94 -25.93	-26.36 -26.36	-26.52 -26.66	
D	-26.12 -26.16				
D	-26.18 -26.17				

Para evaluar el efecto de la destilación en la determinación de la  $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ , se realizaron los siguientes análisis de variancia (Tabla 21), entre:

1) La  $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$  de los cuerpos (28%) de los destilados, utilizando las columnas de Vigreux y QFT.

2) La  $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$  de los cuerpos (28%) de los destilados de ambas columnas (Vigreux y QFT) y el destilado completo (36%), utilizando columna de Vigreux.

3) La  $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$  de los cuerpos (28%) de los destilados de ambas columnas (Vigreux y QFT), el destilado completo (36%), utilizando columna de Vigreux y la muestra comercial (Brandy 38%) sin destilar.



**Tabla 21. Análisis de Variancia.**

**Tabla 21.1. Cuerpo de Columna Vigreux y Cuerpo de Columna QFT.**

Fuente de Variación.	Grados de Libertad.	Suma de Cuadrados.	Cuadrado medio.	F
Columna.	1	0.0006	0.0006	0.1466
Error.	6	0.0251	0.0042	
Total.	7	0.0257		

$F_{0.05} = 5.99$   
 Hipótesis nula:  $\delta^{13}C_{PDB}$  (Cuerpo Columna Vigreux) =  $\delta^{13}C_{PDB}$  (Cuerpo Columna QFT)  
 Hipótesis Alternativa:  $\delta^{13}C_{PDB}$  (Cuerpo Columna Vigreux)  $\neq$   $\delta^{13}C_{PDB}$  (Cuerpo Columna QFT)  
 Nivel de Significancia:  $\alpha = 0.05$

Puesto que el valor obtenido para F no excede de 5.99, que corresponde al valor de  $F_{0.05}$  con 1 y 6 grados de libertad, la hipótesis nula no puede rechazarse con un nivel de significancia de 0.05. Concluimos que el valor de  $\delta^{13}C_{PDB}$  para el cuerpo del destilado en columna Vigreux y el cuerpo del destilado en columna QFT tienen resultados consistentes.

**Tabla 21.2. Cuerpos de ambas Columnas (Vigreux y QFT) y Destilado Completo Columna Vigreux.**

Fuente de Variación.	Grados de Libertad.	Suma de Cuadrados.	Cuadrado medio.	F
Destilados.	2	0.0018	0.0009	0.2851
Error.	9	0.0287	0.0032	
Total.	11	0.0305		

$F_{0.05} = 4.26$   
 Hipótesis nula:  $\delta^{13}C_{PDB}$  (Cuerpo Columna Vigreux) =  $\delta^{13}C_{PDB}$  (Cuerpo Columna QFT) =  $\delta^{13}C_{PDB}$  (Destilado Completo).  
 Hipótesis Alternativa:  $\delta^{13}C_{PDB}$  (Cuerpo Columna Vigreux)  $\neq$   $\delta^{13}C_{PDB}$  (Cuerpo Columna QFT)  $\neq$   $\delta^{13}C_{PDB}$  (Destilado Completo).  
 Nivel de Significancia:  $\alpha = 0.05$

Puesto que el valor obtenido para F no excede de 4.26, que corresponde al valor de  $F_{0.05}$  con 2 y 9 grados de libertad, la hipótesis nula no puede rechazarse con un nivel de significancia de 0.05. Concluimos que el valor de  $\delta^{13}C_{PDB}$  para los cuerpos del destilado en Columnas Vigreux y Columna QFT y el destilado completo en columna Vigreux tienen resultados consistentes.

**Tabla 21.3. Cuerpos de ambas Columnas (Vigreux y QFT), Destilado Completo Columna Vigreux y Muestra Comercial (Brandy 38%).**

Fuente de Variación.	Grados de Libertad.	Suma de Cuadrados.	Cuadrado medio.	F
Muestras.	3	0.1064	0.0355	13.83
Error.	12	0.0308	0.0026	
Total.	15	0.1372		

$F_{0.05} = 3.49$

Hipótesis nula:  $\delta^{13}C_{\text{Cuerpo Columna Vigreux}} = \delta^{13}C_{\text{Cuerpo Columna QFT}} = \delta^{13}C_{\text{Destilado Completo}} = \delta^{13}C_{\text{Muestra Comercial}}$

Hipótesis Alterna:  $\delta^{13}C_{\text{Cuerpo Columna Vigreux}} \neq \delta^{13}C_{\text{Cuerpo Columna QFT}} \neq \delta^{13}C_{\text{Destilado Completo}} \neq \delta^{13}C_{\text{Muestra Comercial}}$

Nivel de Significancia:  $\alpha = 0.05$

Puesto que el valor obtenido para F excede de 3.49, que corresponde al valor de  $F_{0.05}$  con 3 y 12 grados de libertad, la hipótesis nula se rechaza con un nivel de significancia de 0.05. Concluimos que el valor de  $\delta^{13}C_{\text{PDB}}$  para los cuerpos del destilado en ambas columnas (Vigreux y QFT), el destilado completo en columna Vigreux y la muestra comercial no tienen resultados consistentes.

Por lo cual podemos concluir que el análisis isotópico de  $\delta^{13}C_{\text{PDB}}$  se debe hacer en muestras destiladas con un contenido mayor a 80°G.L. por las siguientes razones:

a) Se debe realizar el análisis isotópico del aguardiente sin tomar en cuenta el caramelo que se le agrega al Brandy para darle color el cual proviene de una planta  $C_4$  como lo es el azúcar de caña.

b) Para la combustión de muestras con un contenido de alcohol de 38°G.L., se requiere mayor cantidad de muestra y por lo tanto se requiere que los tubos de combustión tengan mayor capacidad.

c) Cuando las muestras no se encuentran destiladas (ya sea utilizando el cuerpo del destilado ó el destilado completo), el resultado de la  $\delta^{13}C_{\text{PDB}}$  de las muestras de brandies se altera y la muestra puede no cumplir con lo establecido dentro de la norma de calidad para brandies (NOM-V-25-1985).

d) La diferencia en los resultados de  $\delta^{13}C_{\text{PDB}}$  utilizando diferentes columnas de rectificación, no es significativa.

## 8.1 CONCLUSIONES.

El análisis isotópico de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{POB}}$  es adecuado como método de control de calidad en México, para los productos alcohólicos derivados de la uva, ya que puede determinarse en la mayoría de los casos el origen de las adulteraciones de los mismos (diferencias entre plantas  $\text{C}_3$  y  $\text{C}_4$ ).

Las muestras de brandy con una  $\delta^{13}\text{C}_{\text{POB}}$  más positivo a  $-26.06$  ‰ tienen mayor probabilidad de encontrarse adulteradas con más del 13.3% de alcohol de caña, por lo que para asegurar la calidad de su origen se debe realizar otra prueba analítica (análisis isotópico de hidrógeno D/H); esta prueba se debe realizar en brandies europeos debido a que presentan una  $\delta^{13}\text{C}_{\text{POB}}$  más positiva a  $-26.06$  (Brandies de Jerez de la Frontera), además cabe hacer notar que la adulteración de los brandies en Europa, se lleva a cabo con alcohol de remolacha azucarera (planta  $\text{C}_3$ ).

El análisis isotópico de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{POB}}$  en muestras de brandies nacionales, desde 1985, año en que se aplicó la Norma Oficial Mexicana NOM-V-25-1985, a la fecha ha contribuido a que desaparezca la adulteración en los mismos con alcohol proveniente de la caña de azúcar (Figuras 15 y 16).

El análisis isotópico de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{POB}}$  se debe realizar en muestras destiladas con un contenido mayor a 80°G.L., debido a que de no ser así podemos encontrar resultados falsos negativos, que pueden deberse al edulcorante que proviene de una planta  $\text{C}_4$  que generalmente es de azúcar de caña, además de que en el proceso de combustión se necesita una mayor cantidad de muestra y por lo tanto se requiere que los tubos de combustión tengan una mayor capacidad.

La rectificación (destilación fraccionada) del etanol proveniente de muestras de brandy nacional, no implica un fraccionamiento isotópico de las mismas.

Es necesario continuar con la Norma Oficial Mexicana NOM-V-25-1985 para desalentar las prácticas fraudulentas y lucrativas que implican el deterioro de la calidad en un producto, en este caso el Brandy mexicano.

## 9.1 BIBLIOGRAFIA.

- Bender, Margaret N. Variation in the  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ratios of plants in Relation to the Pathway of Photosynthetic Carbon Dioxide Fixation. *Phytochemistry*. 1971, Vol. 10, pp. 1239-1244.
- Bonner, J. y J.C. Vari. *Plant Biochemistry*. Academy Press, Varnen. Cap. 24. 1976.
- Bricout, J., Fontes, J., Merlivat, L., Pusset, M. Sur la Composition en Isotopes Stables de l'éthanol. *Industr. Alim. Agr.* 1975, Vol. 92, pp 375-378.
- Bricout, J. Possibilities of Stable Isotopes Analysis in the Control of Food Products. *Stable Isotopes*. 1982, pp. 483-493.
- Casar, I., Cienfuegos, E. y Morales P. Manual de Métodos de Prueba y Aseguramiento de la Calidad del Laboratorio de Isótopos Estables del Instituto de Física de la U.N.A.M., Febrero de 1994.
- Coplen Tyler B., Kendall Carol & Hopple Jessica. Comparison of stable isotope reference samples. *Nature*, 1983, Vol. 302, No. 5905, pp. 236-238.
- Craig Harmon. The geochemistry of the stable carbon isotopes. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 1953, Vol. 3, pp 53-92.
- Craig, H. Isotopic standards for carbon and oxygen and correction factors for mass-spectrometric analysis of carbon dioxide. *Geochim. Cosmochim Acta*, 1957, 12, pp. 133-149.
- De Niro, M.J. y Epstein, S. Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. *Geochim. Cosmochim. Acta*. 1978, Vol. 42, pp. 495-506.
- Dempster, *Physics Rev.* 1918, 11, 316.
- Hachey, D. L., Wong, William W, Boutton, T. W. y Klein P. Isotope Ratio Measurements in Nutrition and Biomedical Research. *Mass Spectrometry Reviews*. 1987, Vol. 6, pp. 289-331.
- Hatch. M.D., Slack. C.R., & Johnson, Hillary S. Further Studies on a new pathway of photosynthetic carbon dioxide fixation in sugar - cane and its occurrence in other plant species. *Biochem. J.* 1967, 102, pp 417 - 422.
- Hayes, J.M. Fractionation, et al.: An Introduction to Isotopic Measurements and Terminology. *Spectra, A Finnigan Mat Publication*. 1982, Vol. 8, Num. 4, pp. 3-8.
- Hillaire Marcel G. Isotopes and Food. *Handbook of Environmental Isotopes, Vol II, Geochemistry, Fritz and Fontes, Elsevier*. 1985, Chapter 12, pp 507 - 549.
- Keeling, Charles, Mook, W. G., Tans, Pieter P. Recent trends in the  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ratio of atmospheric carbon dioxide. *Nature*, 1979, 277, pp. 121- 123.
- Kiser Robert W. Introduction to Mass Spectrometry and its Applications. Prentice-Hall, INC. Englewood Cliffs, 1965.
- Krueger, H. W. y Reesman R.H. Carbon Isotope Analyses in Food Technology. *Mass Spectrometry Reviews*, 1982, 1, pp. 205-23.
- Krueger Dana A. Sample Preparation Bias in Carbon Stable Isotope Ratio Analysis of Fruit Juices And Sweeteners. *Journal Of AOAC International*. 1993, Vol. 76, No. 2, pp 418-420.
- Lehninger. *Biochemistry*. Worth Publishers, INC. N.Y. 1979, Cap. 23.

- Martin, G. Reporte de EUROFINs. Analytical Report: Carbone 13 Isotopic Ratios in Spanish Musts of Tomello, Badajoz and Jerez. 1989.
- Martin, G.J., Danho, D. and Vallet, C. Natural Isotope Fractionation in the Discrimination of Sugar Origins. *J. Sci. Food Agric.* 1991, Vol.56, pp 419-434.
- Martin, G.J., Guillou, C., Naulet, N., Brun, S., Tep, Y., Cabanis, J., Cabanis, T., Sudraud, P. Controle de L'origine et de L'enrichissement des Vins par Analyse Isotopique Spécifique. Etude de Différentes Techniques d'enrichissement des Vins. *Sciences des Aliments.* 1986, Vol. 6, pp.385-405.
- Mc.Crea, J.M. On the Isotopic Chemistry of Carbonates and Paleotemperature Scale. *The Journal of Chemical Physics.* 1950, Vol. 18, No. 6, pp. 849-857.
- Miller, Irwin y Freund John E. Probability and Statistics for Engineers. Prentice Hall Inc. 1985.
- Misselhorn, K., Bruckner, H., Mussig-Zufika, M., Grafarend, W. Nachweis des Rohstoffs bei hochrektifiziertem Alkohol. *Brann tweinwirtschaft.* 1988.
- Mook, Willem Gerrit. Geochemistry of the Stable Carbon and Oxygen Isotopes of Natural Waters in the Netherlands. Tesis. Rijksuniversiteit te Groningen. 1968.
- Mook, W.G. and Grootes, P.M. The measuring procedure and corrections for high precision mass-spectrometric analysis of isotopic abundance ratios, specially referring to carbon, oxygen and nitrogen. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics*, 1973, Vol.12, pp. 273-298.
- Mook, W.G. Principles of Isotope Hydrology. Introductory Course on Isotope Hydrology. Center of Isotope Research University of Groningen, The Netherlands. September, 1989. 104-107.
- Mook, Willem G y Jongasma, Jaap. Measurement of the N<sub>2</sub>O corrections for <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C ratios of atmospheric CO<sub>2</sub> by removal of N<sub>2</sub>O. *Tellus*, 1987, 39B, pp.96-99.
- Morales, P., Gaona, S. y Alba, F. Espectrómetro de masas con triple colector para el análisis preciso de relaciones isotópicas entre carbonos y oxígenos. *Revista Mexicana de Física*, 1970, Vol. 19, FA77-FA90.
- Nier, A.O., Abbott, T.A., Pickard, J.K., Leland, W.T., Taylor, T.I., Stevens, C.M., Dukey, D.L. and Goertzel G. Recording Mass Spectrometer for Process Analysis. *Analytical Chemistry*, 1948, Vol. 20: pp 188-192.
- Nier, A. O., A redetermination of the relative abundances of the isotopes of carbon, nitrogen, oxygen, argon and potassium. *Phys. Rev.* 1950, 74:789.
- NOM-V-18-1983 Bebidas alcohólicas destiladas-Brandy.
- NOM-V-25-1985 Bebidas alcohólicas destiladas - Brandy - determinación del origen de los alcoholes en los aguardientes de uva y brandies - Espectrometría de masas - Método de prueba.
- NOM-032-SCFI-1993 Información comercial-Brandy- Bebida alcohólica. Operating Manual. Mass Spectrometer Finnigan Mat. 250. Bremen Germany, 1982.

- Rauschenbach, P., Simon, H., Stichler, W., Moser, H. Vergleich der Deuterium-und Kohlenstoff-13-Gehalte in Fermentations-und Syntheseethanol. *Z. Naturforsch.* 1979, 34c, pp 1-4.
- Reed William P, Chief. Standards Reference Materials Program. National Institute of Standards & Technology. Report of Investigation. Gaithersburg, MD 20899. June 22, 1992.
- Sallège, J.F. y Fontes, J.Ch. Essai de Détermination Experimentale du Fractionnement des Isotopes  $^{13}\text{C}$  et  $^{14}\text{C}$  du Carbone au cours de Processus Naturels. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* 1984, Vol. 35, No.1. pp. 55-62.
- Simpkins, W.A. and Rigby, D. Detection of the Illicit Extension of Potable Spirituous Liquors Using  $^{13}\text{C}$ : $^{12}\text{C}$  Ratios. *J. Sci. Food Agric.* 1982, Vol. 33. pp 898-903.
- Smith, B.N. y Epstein, S. Two Categories of  $^{12}\text{C}$ / $^{13}\text{C}$  Ratios for Higher Plants. *Plant Physiol.* 1971, vol. 47, pp. 380-384.
- Sofer, Zvi. Preparation of Carbon Dioxide for Stable Carbon Isotope Analysis of Petroleum Fractions. *Anal. Chem.* 1980, Vol. 52, pp. 1389-1391.
- Somerville, Christopher R., Somerville, Shauna C. Las fotosintesis de las plantas. *Mundo Científico*, 1984, No. 37, Vol. 4, pp. 612 - 623.
- Taylor John K. Standards Reference Materials, Handbook for SMR Users. NIST Special Publication 260-100. February 1993.
- Troughton, J.H. Carbon isotope fractionation in plants. *Proc. 8th Conf., Radio carbon Dating*, Wellington 2. 1972, pp. 39-57.
- Turner, F.T. y Feinleib, M. Performance Criteria for Sorption Pumps. Varian Associates, Palo Alto California. Presented at Eighth Annual Symposium of the American Vacuum Society, Washington, D.C., October 16-19, 1961.
- Urey, H.C., Lowenstam, H.A., Epstein, S and McKinney, C.R. Measurements of paleotemperatures of the Upper Cretaceous of England, Denmark and the south-eastern United States. *Bull. Geo. Soc. A.* 1951, Vol.62, pp. 399-416.
- USP XX and NF XV. United States Pharmacopeial Convention Inc. 1980.
- Yoshida, Naohiro., Yoneguchi, Takahiro y Kitano, Manabu. Determination of Stable Isotope Ratios of Atmospheric Water Vapor and Carbon Dioxide. *Mass Spectroscopy*, 1991, Vol. 39, No. 5.
- Whelan, T. y Benedic C.R. Carbon Isotope Discrimination in a Plant Possessing The C Dicarboxylic Acid Pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 1970, Vol.41, No.5, pp. 1205 - 1210.

## APENDICE I

### I.1 ESPECTROMETRO DE MASAS PARA ANALISIS DE ISOTOPOS ESTABLES.

El espectrómetro de masas es un aparato diseñado para separar moléculas de acuerdo a su relación carga-masa mediante campos eléctricos y/o magnéticos.

Un espectrómetro de masas para análisis isotópico consiste de tres partes principales:

a) **Fuente de Iones.** En ella las moléculas y átomos neutros son convertidos en iones positivos mediante ionización por impacto de electrones.

b) **Analizador Magnético.** La separación de los iones de acuerdo a sus masas se realiza mediante un campo magnético.

c) **Colectores.** Los haces de iones una vez separados con respecto a su masa son medidos con un instrumento capaz de detectar a bajas corrientes como lo es un amplificador eléctrico (Espectrómetro de masas). (P. Morales, 1970).

### I.2 DESCRIPCION DEL ESPECTROMETRO DE MASAS PARA ANALISIS DE ISOTOPOS ESTABLES.

Todos los análisis isotópicos realizados en este trabajo se efectuaron en un espectrómetro de masas comercial, diseñado por Finnigan Mat, modelo 250. (Finnigan, Operating Manual, 1982), el cual está diseñado para medir las abundancias isotópicas de carbono, oxígeno e hidrógeno.

#### I.2.1 SISTEMA DE VACIO.

Para poder realizar con precisión, exactitud y reproducibilidad las medidas de cualquier especie isotópica, es necesario tener la seguridad de que estas corresponden al gas que se quiere analizar, por lo que es esencial:

- Reducir al máximo la presión dentro de la cámara de ionización para evitar perturbaciones causadas por colisiones de los iones con moléculas de gas residual contenidas en el tubo analizador a través de su trayectoria en el tubo de vuelo.

- Evitar colisiones del haz con moléculas de gas cuando los iones cruzan desde la cámara de ionización a la región de los colectores.

- Evitar variaciones de presión en la región de ionización mediante un bombeo uniforme.

Por otra parte para garantizar que el análisis es representativo de la muestra es necesario tener un sistema hermético para evitar las contribuciones generadas por la atmósfera exterior ó por gas residual que puede penetrar a la cámara de ionización y por lo tanto los iones formados son medidos junto con la muestra. Para evitar los problemas generados por el gas residual, el sistema de vacío debe tener una presión dentro de la cámara de ionización y en el tubo de vuelo respectivamente del orden de  $10^{-8}$  mbar.

En la Figura 19, se muestra un esquema de la configuración del sistema de vacío en el espectrómetro de masas Finnigan Mat 250, en el cual para tener esta presión se cuenta con dos bombas mecánicas que operan de presión atmosférica a  $10^{-3}$  mbar, con una velocidad de bombeo de  $4 \text{ m}^3/\text{h}$ , una bomba iónica con placas de titanio que opera de  $10^{-3}$  a  $10^{-6}$  mbar, una bomba mecánica descrita anteriormente acoplada a una bomba turbomolecular con una velocidad de bombeo de 170 l/s que opera en un intervalo de  $10^{-3}$  a  $8 \times 10^{-9}$  mbar y una bomba difusora opcional que se encuentra acoplada entre la bomba mecánica y la bomba turbomolecular para análisis de hidrógeno.

Para lograr un alto vacío se requiere seleccionar el material de construcción del espectrómetro de masas, el cual deberá tener las siguientes características:

- Deben ser estructuralmente cerrados para no permitir el paso de gas entre el exterior y el interior.
- A una temperatura de  $100^\circ\text{C}$  deberá tener una presión de vapor muy baja.
- Debe ser resistente a temperaturas de  $200^\circ\text{C}$ , para poder desgasificar las superficies expuestas al vacío.
- No debe liberar cantidades excesivas de gases ocluidos o disueltos.

Una vez satisfechas las condiciones de operación del espectrómetro de masas, las cuales deben ser: para el sistema de introducción de muestras de  $10^{-2}$  mbar y la presión en el tubo de vuelo debe ser del orden de  $10^{-8}$  mbar sin muestra y de  $2 \times 10^{-7}$  mbar con muestra.

En el caso del Espectrómetro de masas Finnigan Mat 250, Figura 2, los materiales empleados son de acero inoxidable para la cámara de ionización, tubo de vuelo, colectores y bridas. Todas las uniones del espectrómetro de masas, incluyendo el sello de las válvulas neumáticas son de oro de 24 K, esto es para tener un ensamble perfecto en todas las uniones, evitando fugas. Y cerámica para los atravesadores.



- Evitar variaciones de presión en la región de ionización mediante un bombeo uniforme.

Por otra parte para garantizar que el análisis es representativo de la muestra es necesario tener un sistema hermético para evitar las contribuciones generadas por la atmósfera exterior ó por gas residual que puede penetrar a la cámara de ionización y por lo tanto los iones formados son medidos junto con la muestra. Para evitar los problemas generados por el gas residual, el sistema de vacío debe tener una presión dentro de la cámara de ionización y en el tubo de vuelo respectivamente del orden de  $10^{-8}$  mbar.

En la Figura 19, se muestra un esquema de la configuración del sistema de vacío en el espectrómetro de masas Finnigan Mat 250, en el cual para tener esta presión se cuenta con dos bombas mecánicas que operan de presión atmosférica a  $10^{-3}$  mbar, con una velocidad de bombeo de  $4 \text{ m}^3/\text{h}$ , una bomba iónica con placas de titanio que opera de  $10^{-3}$  a  $10^{-9}$  mbar, una bomba mecánica descrita anteriormente acoplada a una bomba turbomolecular con una velocidad de bombeo de  $170 \text{ l/s}$  que opera en un intervalo de  $10^{-3}$  a  $8 \times 10^{-9}$  mbar y una bomba difusora opcional que se encuentra acoplada entre la bomba mecánica y la bomba turbomolecular para análisis de hidrógeno.

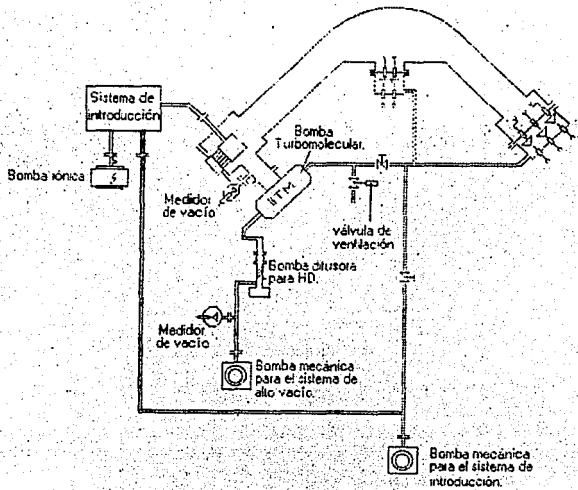
Para lograr un alto vacío se requiere seleccionar el material de construcción del espectrómetro de masas, el cual deberá tener las siguientes características:

- Deben ser estructuralmente cerrados para no permitir el paso de gas entre el exterior y el interior.
- A una temperatura de  $100^\circ\text{C}$  deberá tener una presión de vapor muy baja.
- Debe ser resistente a temperaturas de  $200^\circ\text{C}$ , para poder desgasificar las superficies expuestas al vacío.
- No debe liberar cantidades excesivas de gases ocluidos o disueltos.

Una vez satisfechas las condiciones de operación del espectrómetro de masas, las cuales deben ser: para el sistema de introducción de muestras de  $10^{-2}$  mbar y la presión en el tubo de vuelo debe ser del orden de  $10^{-8}$  mbar sin muestra y de  $2 \times 10^{-7}$  mbar con muestra.

En el caso del Espectrómetro de masas Finnigan Mat 250, Figura 2, los materiales empleados son de acero inoxidable para la cámara de ionización, tubo de vuelo, colectores y bridas. Todas las uniones del espectrómetro de masas, incluyendo el sello de las válvulas neumáticas son de oro de 24 K, esto es para tener un ensamble perfecto en todas las uniones, evitando fugas. Y cerámica para los atravesadores.

# FALLA DE ORIGEN



Sistema de Vacío del Espectrómetro  
Finnigan Mat 250

Figura 19

La presión en el sistema de introducción automático de muestras se evalúa con un medidor de vacío tipo piranni, y para medir el alto vacío se cuenta con un ion gauge.

### 1.2.2 SISTEMA DE INTRODUCCION DE GASES.

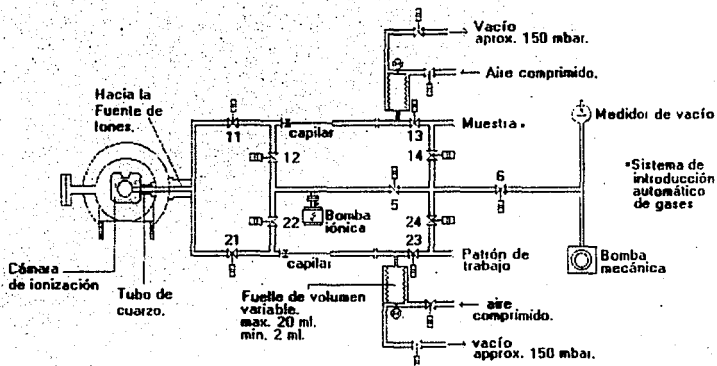
La sustancia a analizar es  $\text{CO}_2$  en estado gaseoso se maneja a través del sistema de introducción de gases y el análisis de masas se maneja dentro del espectrómetro en sí.

Con el sistema de doble introducción de gases, que facilita la comparación entre la muestra y el estándar, Figura 20. Tiene dos fuelles de volumen variable en los cuales la presión es ajustada independiente y automáticamente entre el patrón de trabajo y la muestra para producir la misma corriente de iones en el colector de masa más abundante (masa <44> para  $\text{CO}_2$ ,  $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$ ); los dos sistemas de introducción son conectados independientemente a la fuente de iones por medio de un capilar de 0.1 mm de diámetro interno y aproximadamente 50 cm de largo para el Finnigan Mat 250, el cual tiene una constricción cerca del extremo que va a la fuente de iones, provocando un flujo en el gas, de viscoso a molecular, (Nier, A.O., 1950) para prevenir el fraccionamiento isotópico del gas en el capilar. Una vez que se logra igualar la cantidad de gas que entra al espectrómetro de masas se intercambia el gas problema y el gas patrón para obtener la  $\delta$  de reporte de análisis. La definición de  $\delta$  implica la determinación de las relaciones isotópicas del estándar y de la muestra, por lo cual es conveniente analizar el  $\text{CO}_2$  de la muestra en las mismas condiciones que el  $\text{CO}_2$  patrón para tener la precisión que se requiere, es por ello que se cuenta con válvulas neumáticas que se encuentran en el sistema de introducción automático de gases, operan rápidamente y su sello hace despreciable la contaminación de gases.

Para poder llevar a cabo un análisis satisfactorio de gases, se deben considerar los siguientes requerimientos:

- La intensidad de la corriente del haz de iones debe ser directamente proporcional a la presión del gas de la muestra.
- El flujo de gas, y por tanto la intensidad del haz de iones, debe permanecer constante durante todo el análisis.

Todos estos requerimientos los puede llenar el flujo molecular, si escogemos adecuadamente las presiones.



SISTEMA DE INTRODUCCION (FINNIGAN MAT 250)

Figura 20

### I.2.3 FUENTE DE IONES.

La fuente de iones consiste principalmente en la cámara de ionización y el sistema de lentes para enfocamiento del haz.

Por lo que el gas que se desea determinar entra a la cámara de ionización vía un tubo de cuarzo, en ella el gas es parcialmente transformado en iones positivos por bombardeo de electrones producidos por un filamento caliente de tungsteno (cátodo). Figura 21. La reacción de ionización es la siguiente:



La colimación del haz de electrones es muy importante, se tiene un alto rendimiento de iones gracias a dos barras magnéticas que se encuentran montadas en la cámara de ionización, lo cual se logra mediante un campo magnético en paralelo al haz de electrones, por lo tanto la trayectoria que siguen los electrones es en forma helicoidal. Aumentando de esta forma la probabilidad de ionización de los electrones del haz central.

La energía de los electrones, está determinada por la diferencia de potencial entre el cátodo y la cámara de ionización es de 100 eV, la emisión se mantiene constante gracias a un regulador de emisión (BLE) y es del orden de 2 mA.

Para tener una mejor precisión en las medidas de las relaciones isotópicas deben considerarse los siguientes puntos:

- El haz de iones producido deberá tener una intensidad suficiente para ser medido con precisión, del orden de  $\pm 3 \times 10^{-9}$  Amperes para dar 30 volts.
- El haz de iones debe ser estable, con un ruido menor al 0.1%.
- La dispersión de energía de los iones del haz formado debe mantenerse lo más baja posible, del orden de 1 eV.
- Los efectos de ionización de gas residual deben de ser mínimos.
- No debe haber efectos de memoria entre muestras sucesivas ni contaminación permanente en el sistema de introducción de gases.
- El gas que se introduce al sistema debe ser puro, evitando mezclas ó contaminaciones que puedan dañar el filamento.
- El número de iones producidos depende de la energía cinética y de la corriente de los electrones emitidos por el filamento,

por lo cual es necesario llevar un control de la señal emitida (v) para una misma presión de un gas determinado.

El haz de electrones deja la cámara de ionización vía una rendija opuesta al cátodo en una trampa de electrones, la cual se encuentra en un potencial ligeramente positivo con respecto a la cámara de ionización.

Los iones positivos formados en la cámara de ionización son acelerados y colimados fuera de la cámara de ionización mediante unas placas de extracción de iones que operan con un potencial constante, con valores que oscilan entre los 3,000 a 10,000 volts, dependiendo del haz de iones que se quiere enfocar, la energía cinética adquirida por los iones se puede calcular con la siguiente fórmula:

$$eV = \frac{mv^2}{2} = 10^7 qV \text{ (en erg)} \quad (3)$$

Donde e es la carga eléctrica del ion, generalmente es 1, V es el potencial de aceleración en volts, m es la masa en gramos de los iones, v su velocidad en cm/seg, q que es la carga eléctrica en coulombs.

De inmediato el haz de iones es enfocado por un sistema de lentes electrostáticas de enfoque axial del haz de electrones, cuyo voltaje es variable entre 1.6 y 9.6 KV y es menor al de la cámara de ionización. Una vez enfocado el haz pasa por una rendija de definición a tierra por medio de la cual es colimado pasando por un sistema de lentes electrostáticas de enfoque vertical del haz de iones. Todos ellos se controlan en el sistema electrostático de lentes de la unidad BLU del espectrómetro de masas Finnigan Mat 250.

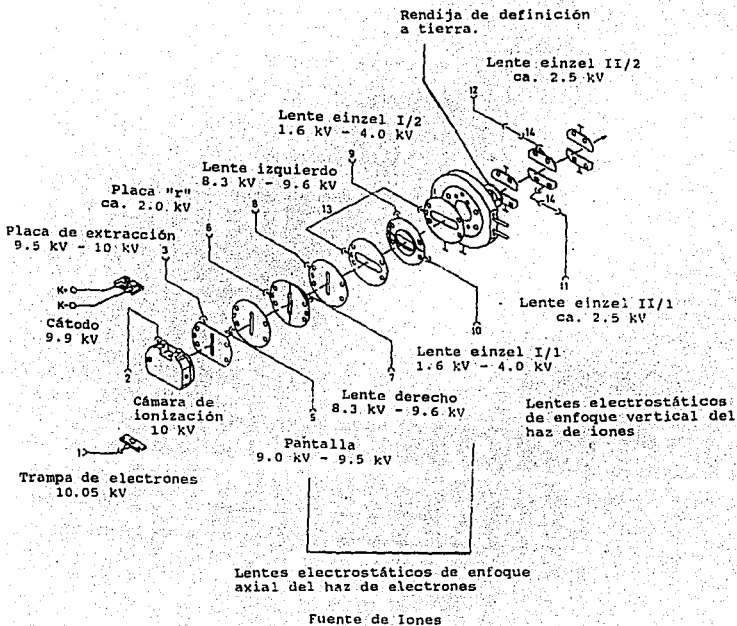


Figura 21

#### I.2.4 ANALIZADOR MAGNETICO (Finnigan Mat 250).

Está constituido por un sector de campo magnético con una configuración de  $90^\circ$  y un radio central de 23 cm, Figura 22, generado por un imán permanente de 0.325 Tesla (3250 Gauss). Cuando el haz de iones deja la fuente de iones tiene 0.5 mm de ancho y 4mm de alto, los iones son acelerados a una energía aproximada de 10 KeV, y son proyectados con un ángulo de  $26.5^\circ$  en el sector magnético de  $90^\circ$ , del cual emergen con este mismo ángulo. Este arreglo de campo magnético se conoce como de doble dispersión porque produce separación de entrada de 23 cm de radio entre dos masas consecutivas equivalente a un sistema convencional de entrada normal con una trayectoria de iones con un radio de curvatura de 46 cm.

Los iones formados en la cámara de ionización viajan a través de una región equipotencial desde la fuente de iones hasta llegar al campo magnético, cuyas fronteras forman  $26.5^\circ$  con la trayectoria del haz. En el sector magnético aparece entonces una fuerza sobre los iones llamada de Lorentz. La cual es determinada por:

$$F = 10q\vec{v}\vec{B} \quad (4)$$

si F está en dynas, donde q es la carga, v la velocidad y B la intensidad del campo magnético y por ser un sistema en equilibrio dinámico, la magnitud de ésta se encuentra equilibrada con la fuerza centrífuga por lo que los iones describen una trayectoria circular de radio r, dada en cm, que dependerá directamente de la masa de las partículas.

$$\frac{mv^2}{r} = 10qvB \quad (5)$$

$$mv = 10 qBr \quad (6)$$

$$\frac{m}{q} = \frac{K r^2 B^2}{2V} \quad (7)$$



En donde K es una constante que depende del espectrómetro.

Combinando las ecuaciones 3 y 6 tenemos:

$$m = \frac{100 B^2 r^2 q}{2V \cdot 10^7} \quad (8)$$

Siendo ésta la ecuación que gobierna el movimiento de los iones dentro del campo magnético, la cual en unidades convencionales queda de la siguiente forma:

$$m = \frac{B^2 r^2}{20,721.59 V} \quad (9)$$

6

$$r = \frac{143.95 \cdot \sqrt{mV}}{B} \quad (10)$$

donde: m es la masa del ión, en unidades de masa atómica; B, es la intensidad del campo magnético, en gauss; r, es el radio de curvatura de la trayectoria, en centímetros y V es la energía del electrón, en electrón-volts.

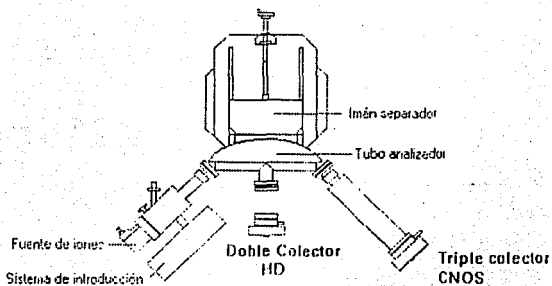
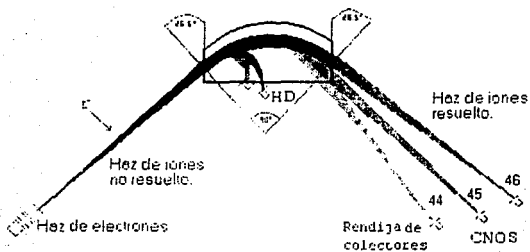
La relación matemática entre el voltaje y la masa, sirve para calcular la relación entre las masas, de esta forma podemos saber a diferentes voltajes que masas aparecen en el colector, esto es muy útil cuando se hace un barrido de fondo para determinar si tenemos contaminación por gas residual. Siendo el radio de curvatura y la intensidad del campo magnético constantes, utilizamos la siguiente ecuación para predecir algunas masas.

$$\frac{r_1 V_1}{r_2 V_2} = m_2 \quad (11)$$

En la Tabla 22 podemos observar un ejemplo de un barrido experimental que se realizó con el triple colector en la posición III, con 300 mv de sensibilidad y  $10^{-8}$  mbar de presión en el tubo de vuelo.

Tabla 22.

Voltaje	Masa	Posibilidad de tener:
10300	28	$^{14}\text{N}_2$ , $^{12}\text{C}^{16}\text{O}$ , $^{12}\text{C}_2\text{H}_4$
9899	29	$^{14}\text{N}^{15}\text{N}$ , $^{12}\text{CH}^{16}\text{O}$ , $^{12}\text{C}_2\text{H}_5$
9560	30	$^{14}\text{N}^{16}\text{O}$ , $^{14}\text{N}_2\text{H}_2$ , $^{12}\text{C}_2\text{H}_4$ , $^{12}\text{CH}_2^{16}\text{O}$
8971	32	$^{16}\text{O}_2$ , $^{32}\text{S}$ , $^{14}\text{N}_2\text{H}_4$
6526	44	$^{12}\text{C}^{16}\text{O}_2$
6367	45	$^{13}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}^1$ , $^{12}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O}^1$
6117	46	$^{12}\text{C}^{18}\text{O}^{16}\text{O}^1$ , $^{13}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O}^1$ , $^{12}\text{C}^{17}\text{O}^{17}\text{O}$ , $^{14}\text{N}^{16}\text{O}_2$



**Sector Magnético y Tubo de Vuelo del Espectrómetro de Masas.**

**Figura 22**

### I.2.5 DETECTOR DE IONES.

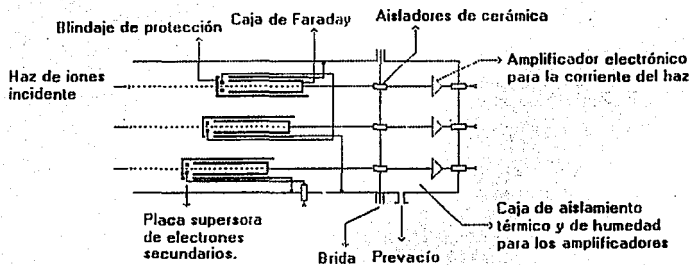
La detección cualitativa y cuantitativa de los iones es muy importante, ya que el número de iones de cada masa del haz dará una señal proporcional a la abundancia isotópica de la especie que se desea determinar, la cual es detectada mediante señales eléctricas captadas por aparatos de alta sensibilidad. Para la detección simultánea de iones se utiliza un triple colector para medir las masas 44, 45 y 46 correspondientes a las diferentes especies isotópicas del  $\text{CO}_2$ , cada uno de estos colectores neutralizan y miden el haz incidente utilizando cajas de Faraday colocadas en regiones previamente calculadas. La interacción de haz incidente con las cajas de Faraday es bastante compleja y puede provocar la salida de electrones secundarios provenientes de la superficie metálica, debida al impacto de los iones que poseen una alta energía.

Para evitar la alteración de la corriente por cada especie isotópica, se coloca un electrodo con un voltaje negativo, del orden de 90 volts, llamado supresor de electrones. Una de las formas de corregir estos efectos consiste en un buen diseño de las cajas de Faraday, Como se observa en la Figura 23.

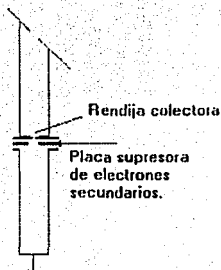
Debido a la gran separación entre los colectores del sistema analizador; la distancia entre los colectores es muy grande (aproximadamente 10 mm entre las masas 44 y 45). Esto hace posible el diseño de las cajas de Faraday profundas, protegidas en cubos con un integrador secundario de supresión de electrones, con el objeto de eliminar los efectos antes mencionados así como la pérdida de señal.

La señal producida por la corriente de iones, alimenta tres rendijas hacia los amplificadores. cada una de ellas es seguida por un convertidor lineal de voltaje a frecuencia, el cual convierte la corriente de iones en pulsos.

Estos pulsos alimentan a un contador durante un tiempo de integración preseleccionado. Después de cada intervalo de integración la calculadora HP 9815A almacena los datos y después de un determinado número de lecturas en operaciones múltiples; tanto para la muestra como para el patrón de trabajo, la calculadora efectúa una serie de operaciones y nos proporciona el resultado del análisis efectuado.



Esquema del arreglo del triple colector de iones.



Forma del Colector

Figura 23

### I.3 CORRECCIONES DE LOS ANALISIS OBTENIDOS.

En todos los espectrómetros de masas existen dos tipos de fuentes de error; por azar, que en la mayoría de los casos, son despreciables y otros sistemáticos.

Las fuentes de error sistemáticas las cuales deben identificarse, eliminarse, reducirse ó controlarse.

Se deben aplicar las correcciones adecuadas en un espectrómetro de masas para el análisis de abundancia isotópica de carbono-13, oxígeno - 18 ó deuterio, debido a que para poder obtener buenos resultados estos análisis deben ser precisos, exactos y reproducibles.

A los valores que se obtienen del espectrómetro se le deben aplicar varias correcciones pequeñas para poder transformar las diferencias relativas entre los voltajes generados por los haces de iones de la muestra y un patrón interno a los valores de relaciones isotópicas de la muestra contra un patrón internacional. Estas correcciones son:

- a) Corrección por efectos de presión.
- b) Corrección por efecto de memoria, impurezas en las muestras y gas residual y mezcla de gases en válvulas de cambio.
- c) Corrección por cambio de un patrón internacional a un patrón de trabajo interno.
- d) Corrección por abundancia isotópica o masas parásitas.

#### I.3.1 CORRECCION POR EFECTOS DE PRESION.

Para obtener el valor de  $\delta$  la muestra y el patrón deben tener la misma presión. Ya que la señal del cociente de voltaje está referido a la abundancia isotópica verdadera. Este efecto se controla en el espectrómetro de masas Finnigan Mat 250, utilizando los fuelles de volumen variable, los cuales ajustan automáticamente la presión del gas de la muestra para ser equivalente con el gas del patrón. Sin embargo cabe hacer notar que si se introduce una muestra muy pequeña, el espectrómetro no podrá ajustar la presión y el fuelle corre el riesgo de perforarse de la misma manera el valor de  $\delta$  de la muestra se verá afectado. Por lo que es importante medir la presión del gas antes de introducirse al espectrómetro, para evitar errores por efecto de presión, los cuales provocan falta de precisión y exactitud en la medida.

En caso del Finnigan Mat 250 al no poder igualar la presión entre el gas muestra y el gas patrón el espectrómetro aborta el análisis. En caso de reportar un número, este no es adecuado porque

el software de la máquina no tiene como calcular este efecto descrito por Mook y Grotas (1973), por lo que es muy crítico controlar las cantidades de gas muestra que se introducen en el espectrómetro.

### I.3.2 CORRECCION POR IMPUREZAS EN EL GAS MUESTRA, GAS RESIDUAL Y POR EFECTO DE MEMORIA.

#### Impurezas en las muestras.

Las impurezas en una muestra de gas que puedan tener un componente con una masa similar al  $\text{CO}_2$  contribuyen a la corriente de iones causando errores en la  $\delta$ , entre los principales están:

a) Trazas de solventes orgánicos utilizados para limpiar las válvulas, los cuales pueden ser fácilmente determinados y evitados calentando los frascos contenedores antes de usarlos. Como un ejemplo; son los fragmentos de ionización que interfieren en el espectro de masas, como pueden ser: para el éter las masas relevantes son de la masa <24> a la <30> y de la <40> a la <44>, para el tetracloruro de carbono la masa <47> (iones  $\text{CCl}^+$ ), para la acetona la masa <43> ( $\text{CH}_3\text{CO}^+$ ), para el alcohol la masa <45> ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{O}^+$ ).

b) Las muestras por si mismas pueden contener hidrocarburos ó compuestos inorgánicos ( $\text{SO}_2$  masa <64>,  $\text{H}_2\text{S}$  masa <34>,  $\text{NO}_2$  masa <46>,  $\text{NO}$  masa <30>,  $\text{CH}_4$  masa <16>, etc), las cuales no pueden ser removidas durante la preparación de la muestra sin utilizar procedimientos especiales.

c) Durante ó después de la preparación de la muestra de gas a determinar hay una pequeña cantidad de aire, ( $\text{N}_2$ ,  $\text{O}_2$ ,  $^{40}\text{Ar}$ ). Esto se puede reducir a un mínimo si se cuenta con un buen sistema de vacío en las líneas de preparación y purificación de las muestras, con juntas apropiadas y utilizando válvulas adecuadas en los frascos contenedores.

d) Si la impureza tiene una masa igual a las masas que se desean determinar como lo es el caso del óxido nítrico ( $m/z$  <44> ( $^{16}\text{N}_2^{16}\text{O}^+$ ), <45> ( $^{14}\text{N}^{15}\text{N}^{16}\text{O}^+$ ,  $^{15}\text{N}^{14}\text{N}^{16}\text{O}^+$  y  $^{14}\text{N}_2^{17}\text{O}^+$ ) y <46> ( $^{14}\text{N}_2^{18}\text{O}^+$ ,  $^{14}\text{N}^{15}\text{N}^{17}\text{O}^+$  y  $^{15}\text{N}^{14}\text{N}^{17}\text{O}^+$ )), provocan que la magnitud de la contaminación no podrá ser medida directamente. El cociente de los isótopos de ( $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ) es  $3.663 \times 10^{-3}$  el cual es significativamente menor al cociente de carbono ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C} = 1.122 \times 10^{-2}$ ), esto causa un aparente empobrecimiento de los cocientes de los isótopos de carbono y oxígeno en el bióxido de carbono que se encuentra contaminado con óxido nítrico. En particular la contaminación de la masa <45> tiene una influencia considerable en la  $\delta^{13}$ , <46> en la  $\delta^{15}$ , desde el haz de iones de esas masas con una intensidad baja. El óxido nítrico se puede eliminar de la muestra con cobre metálico a  $650^\circ\text{C}$ . (Mook y Jongsma, 1983).

### **Gas residual.**

El error por gases residuales, vapores desadsorbidos por las paredes de los tubos y analizador ó por pequeñas fugas eventuales, debe eliminarse.

Para cuantificar este efecto es necesario realizar un barrido de masas cuando el espectrómetro está evacuado a  $1 \times 10^{-8}$  para determinar la presencia de masas oscuras derivadas de estos compuestos, ya que esas contribuciones aumentan el espectro de fondo de manera incontrolada.

Esto hace que en el espectro de fondo generalmente contiene picos de masas distintas a las que contiene el patrón de trabajo, si la contribución de este espectro de fondo es constante en la corriente del colector no afecta el valor de  $\delta$ .

La corrección por gas residual en el espectrómetro de masas Finnigan Mat 250 se hace automáticamente antes de iniciar su operación.

### **Efecto de memoria.**

Cuando el espectro de fondo depende de la muestra previa, esta pequeña corriente de iones se sumará a la corriente de la muestra que se desea determinar alterando los valores delta. Este efecto aunque pequeño en el  $\text{CO}_2$  es particularmente importante para el caso de las determinaciones de delta de  $\text{SO}_4$ . Para evitar este efecto de memoria es necesario desgasificar los capilares del sistema de introducción.

Por último mencionaré la posibilidad de error causada por fallas en las válvulas del sistema que introduce el patrón y la muestra causado por falta de hermeticidad al cerrar ó por no tener la velocidad de respuesta adecuada. Cuando ocurre este efecto no existe corrección sencilla por lo que es necesario mantener en óptimo estado las válvulas de sello de oro que operan a este sistema.

### **I.3.3 CORRECCION POR EL USO DE UN PATRON INTERNO DE TRABAJO EN LUGAR DE UN PATRON INTERNACIONAL.**

Otro aspecto importante es el hecho de que el patrón internacional PDB al que se refiere el análisis isotópico de carbono y oxígeno ya se agotó, por lo cual la comunidad de isótopos estables utiliza otros patrones internacionales los cuales tienen valores certificados referidos al PDB y distribuidos por el NIST (National Institute of Standards and Thechnology).



Sin embargo estos patrones no están diseñados para utilizarse como patrones de trabajo por lo que es necesario obtener una cantidad homogénea de  $\text{CO}_2$  con composición isotópica determinada contra varios patrones internacionales, para ser utilizado como patrón de trabajo, para analizar muestras problema.

Este patrón de trabajo se caracteriza por medio de patrones internacionales y se le hacen las correcciones necesarias para que la computadora del Espectrómetro de Masas HP 9815A tenga los valores correctos del  $\text{CO}_2$  patrón que se va a utilizar referido a PDB y a su vez con este patrón de trabajo podremos medir la  $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$  y  $\delta^{18}\text{O}_{\text{PDB}}$  del  $\text{CO}_2$  de una muestra referidos a PDB.

Por otra parte el gas patrón que se utiliza debe tener una composición similar a las muestras que se desean medir, debido a que los errores de medición se reducen de esta forma.

Para saber el valor correcto del  $\text{CO}_2$  patrón que se va a utilizar, en el programa de la calculadora HP 9815A del espectrómetro de masas en el programa 9, inciso 1, fila 13 se graban los valores certificados de un patrón internacional, como lo es el NBS-19, se preparan tres patrones y se utiliza uno de ellos como patrón de trabajo, al mismo tiempo se preparan como mínimo 5 frascos contenedores con el  $\text{CO}_2$  patrón que se utilizará, para saber su valor exacto y posteriormente ese valor será grabado en el programa 9, inciso 1, fila 13, y en la fila 19 del mismo inciso quedarán grabados los valores de PDB. Para que el espectrómetro realice las correcciones apropiadas por el uso del patrón de trabajo.

### I.3.4 CORRECCION POR ABUNDANCIA ISOTOPICA.

En la corrección por abundancia isotópica natural de los valores de  $\delta^{45}$  y  $\delta^{46}$  para obtener la  $\delta^{13}\text{C}$  y la  $\delta^{18}\text{O}$ , se deben considerar las siguientes especies isotópicas que conforman la molécula de  $\text{CO}_2$ .

Siendo R = cociente de abundancia isotópica

		Abundancia Natural
R <sup>13</sup>	<sup>13</sup> C/ <sup>12</sup> C en cualquier compuesto	≈0.011
R <sup>17</sup>	<sup>17</sup> O/ <sup>16</sup> O en cualquier compuesto	0.00038
R <sup>18</sup>	<sup>18</sup> O/ <sup>16</sup> O en cualquier compuesto	0.0021
R <sup>45</sup>	<45>/<44> $\frac{^{13}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}/^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}}{^{12}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O}/^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}}$	0.011 0.00076
R <sup>46</sup>	<46>/<44> $\frac{^{12}\text{C}^{18}\text{O}^{16}\text{O}/^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}}{^{13}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O}/^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}}$ $\frac{^{12}\text{C}^{18}\text{O}^{17}\text{O}/^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}}{^{13}\text{C}^{17}\text{O}^{17}\text{O}/^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}}$	0.0042 $8.4 \times 10^{-6}$ $1.4 \times 10^{-7}$
R <sup>47</sup>	<47>/<44> $\frac{^{13}\text{C}^{18}\text{O}^{16}\text{O}/^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}}{^{12}\text{C}^{18}\text{O}^{17}\text{O}/^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}}$ $\frac{^{13}\text{C}^{17}\text{O}^{17}\text{O}/^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}}{^{12}\text{C}^{18}\text{O}^{17}\text{O}/^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}}$	$4.6 \times 10^{-5}$ $8.0 \times 10^{-7}$ $1.6 \times 10^{-9}$
R <sup>48</sup>	<48>/<44> $\frac{^{12}\text{C}^{18}\text{O}^{18}\text{O}/^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}}{^{13}\text{C}^{18}\text{O}^{17}\text{O}/^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}}$	$4.4 \times 10^{-6}$ $8.8 \times 10^{-9}$
R <sup>49</sup>	<49>/<44> $\frac{^{13}\text{C}^{18}\text{O}^{18}\text{O}/^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}}{^{12}\text{C}^{18}\text{O}^{18}\text{O}/^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}}$	$4.9 \times 10^{-8}$

En el análisis de  $\text{CO}_2$  en el espectrómetro los resultados se obtienen en unidades de delta por mil ( $\delta$  ‰).

El cociente absoluto de  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  en PDB nunca se ha medido, Craig en 1953 reporta comparaciones con una muestra de  $\text{CaCO}_3$  (Jurassic Limestone, Solenhofen, Bavaria) del cual Nier en 1950 determinó  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C} = 0.01124$  con un 95% de confianza con un intervalo de  $\pm 0.00009$ . Nier reconsideró las contribuciones por  $^{17}\text{O}$  y Craig en 1957 corrigió este valor a 0.0112372. Para expresar las diferencias entre muestras en términos de cocientes absolutos, Craig simplemente consideró que la muestra de Nier era  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  exactamente igual a 0.0112300, por lo que la  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  en el PDB era 0.0112372. Por otro lado, debemos notar que el cociente de  $^{17}\text{O}/^{16}\text{O}$  en el  $\text{CO}_2$  que Nier preparó a partir de su muestra de  $\text{CaCO}_3$  es poco conocido. Y en 1953 Craig obtuvo el valor de  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C} = -0.90$  ‰ para la muestra de Nier contra PDB.

El patrón PDB fué definido por Urey y colaboradores en 1951. Numerosos patrones secundarios han sido definidos y comparados cuidadosamente contra PDB ó a otros materiales bien conocidos, y todas las medidas de los cocientes isotópicos de carbono se siguen reportando referidos a PDB. En 1957 Craig reporta para PDB los siguientes valores  $\delta^{13}\text{C} = 0$  y  $\delta^{18}\text{O} = 0$ ;  $[R^{13}] = 0.0112372$ ,  $[R^{17}] = 0.0007599$ ,  $[R^{18}]_{\text{PDB}} = 0.004158$ ,  $[R^{45}] = 0.0119971$ .

Como se había mencionado anteriormente Nier en 1950 calculó los valores absolutos de  $R^{13}$ ,  $R^{17}$  y  $R^{18}$ , los cuales fueron referidos a PDB por Craig y corregidos con otros patrones internacionales por Willem Mook y P.M. Grootes en 1973 refiriendo sus resultados al estándar internacional PDB:

$[S^{13}]_{\text{PDB}} = 0.0112372$ ,  $[S^{17}]_{\text{PDB}} = 0.000380$ ,  $[S^{18}]_{\text{PDB}} = 0.0020790$ , obteniendo así la ecuación para la  $\delta^{13}$  y la  $\delta^{18}$  simplificando quedaría:

$$S_{\text{PDB}}^{45} = S_{\text{FEL}}^{13} \cdot 2S_{\text{FDE}}^{17} = 0.0112372 \cdot 2(0.00038) = 0.0119972 \quad (12)$$

$$\delta_{\text{FEB}}^{13} = \frac{S^{45}}{S^{13}} \delta^{45} - \frac{S^{17}}{S^{13}} \delta^{17} = \frac{0.011997}{0.011237} \delta^{45} - \frac{0.00038}{0.0112372} \delta^{17} \quad (13)$$

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{FDB}} = 1.06763371 \delta^{45} - 0.033816253 \delta^{18} \quad (14)$$

$$\delta^{18}\text{O}_{\text{FDB}} = \delta^{16} - \frac{R^{17}R^{45}}{R^{18}} \delta^{45} = 1.0010\delta^{16} - 0.0021\delta^{13}\text{C} \quad (15)$$

Utilizando  $\text{CO}_2$  de un tanque como patrón de trabajo ( $\delta^{13}$  y  $\delta^{18} \approx -20$  ‰ con respecto a  $\text{PDB-CO}_2$ ), se pueden utilizar estas ecuaciones asumiendo que el fraccionamiento isotópico depende exclusivamente de la masa, mostrando diferencias menores a 0.01 ‰. Mientras la medida isotópica de  $\text{CO}_2$  que utilizemos como patrón de trabajo sea más cercana a las muestras el error será menor.

#### I.4 PATRONES DE REFERENCIA INTERNACIONALES.

Uno de los problemas que se presentaron con el avance del uso de los isótopos, fué la comparación de resultados obtenidos por los diferentes laboratorios; es por esto que se ha aceptado internacionalmente que los datos obtenidos sean referidos a estándares distribuidos por el NIST (National Institute of Standards & Technology). Actualmente los datos son reportados en  $\delta^{13}\text{C}$  con respecto a un patrón internacional, esto es, se hace una calibración del patrón de trabajo interno, con respecto a una referencia confiable y certificada, utilizando la fórmula de la sección anterior.

En las relaciones isotópicas de carbono-13 y oxígeno-18 se utiliza como patrón internacional de referencia el PDB (belemnita from Peedee Formation of South Carolina) que es un  $\text{CaCO}_3$  carbonato marino de la formación Peedee en Carolina del Sur.

Como se mencionó anteriormente este patrón ya no existe, por lo cual el National Institute of Standards & Technology distribuye patrones internacionales con valores referidos a PDB, los cuales son utilizados para calibrar el  $\text{CO}_2$  que es utilizado como patrón de trabajo y corregir su valor. Los patrones que son utilizados para ello se muestran en la Tabla 23.

TABLA 23.

Patrón Internacional Certificado	Descripción	$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}} \pm \sigma$
NBS-16	$\text{CO}_2$ puro	$-41.48 \pm 0.03_{1983}$
NBS-17	$\text{CO}_2$ puro	$-4.41 \pm 0.02_{1983}$
SRM 8543 NBS-18	$\text{CaCO}_3$ carbonatita	$-5.04 \pm 0.06_{1983}$
SRM 8544 NBS-19	$\text{CaCO}_3$ mármol	$+1.95 \pm 0.02_{1992}$
NBS-20 Solenhofen (limestone)	$\text{CaCO}_3$ mármol	$-1.06 \pm 0.02_{1983}$
NBS-21	Grafito	$-28.10 \pm 0.03_{1992}$
SRM 8539 NBS-22	Aceite	$-29.73 \pm 0.09_{1992}$
SRM 8540 PEFI	Polietileno	$-31.77 \pm 0.08_{1992}$
SRM 8542 Sucrose ANU	Sucrosa	$-10.47 \pm 0.13_{1992}$

(Coplen Taylor B., Kendall Carol & Hopple Jessica, 1983) y (Reed William P. 1992).

La definición de un material de referencia (RM); es una sustancia para calibrar un análisis químico ó validar un proceso de medición. Un material de referencia interno (IRM); es un material hecho por un laboratorio para su uso interno. Un material de referencia externo (ERM); es un material hecho por alguien y otro lo utiliza. Un material de referencia certificado (CRM); es un material de referencia (RM) el cual está certificado por una organización reconocida como técnicamente competente. Un material de referencia estándar (SRM); es un material de referencia certificado (CRM) por el NIST.

Todas las buenas mediciones dependen de patrones. Los patrones internacionales utilizados para calibrar el espectrómetro de masas de isótopos estables deben ser capaces de producir valores exactos. Por lo cual deben ser suficientemente precisos. Para estimar la precisión, es necesario medir un número de réplicas durante un largo período. La precisión se cuantifica en término de variancia, la cual es el cuadrado de la desviación estándar. La calibración puede ser definida como la comparación de la medida de un patrón con un instrumento con la medida del mismo patrón con otro instrumento para identificar cualquier variación de la exactitud del mismo y corregirla.

Para realizar una calibración cuando se tienen problemas, es necesario medir por lo menos tres muestras de referencia tres veces cada una. Así mismo la frecuencia de recalibración depende de la estabilidad del sistema de medición y los requerimientos de exactitud de los datos. El intervalo de una calibración confiable puede considerarse como el intervalo de una medición confiable y viceversa.

Un patrón internacional SRM, debe cumplir ciertas especificaciones: rara vez requiere control, es puro, homogéneo en su total y en particiones antes de certificar el análisis. En el caso de que ocurran discrepancias en los análisis, a estos valores no se les dará certificado. Otra forma de certificar la composición de un patrón SRM deberá ser analizado por otros laboratorios para determinar su precisión y exactitud, esto facilita la intercalibración de los laboratorios y promueve la compatibilidad de las mediciones.

Es importante hacer notar que, cuando un proceso de medición demuestra estar bajo control estadístico, la exactitud del proceso implica la caracterización de la exactitud de todos los datos producidos por el proceso. Un sistema de medición estable produce resultados reproducibles. El control estadístico puede definirse como el conocimiento de un estado de predicción. Bajo esas condiciones, el promedio de un gran número de medidas, se aproxima al valor límite y las medidas individuales deben tener una distribución estable dentro de su desviación estándar. Bajo estas condiciones, los límites en los cuales un nuevo valor se espera dentro de la predicción con una probabilidad esperada, los

límites de confianza para una medida ó promedio de una serie de medidas pueden ser calculados, y el número de medidas que se requieren para obtener el valor promedio está dado por la confianza con que se puede estimar. (Taylor, 1993).

APENDICE II.

II.1 MATERIAL Y METODOS.

II.2 METODO DE DESTILACION.

A) OBJETIVO

El objetivo de este método es eliminar los azúcares (colorantes y edulcorantes), así como las sustancias más volátiles (de menor punto de ebullición) que contienen las muestras de brandy comercial para elevar el contenido alcohólico de la muestra, para su posterior combustión.

Las muestras a destilar fueron aquellas que presentaban una concentración alcohólica menor al 50%/V.

B) MATERIALES

- Matraz bola 500 ml. junta hembra esmerilada Pyrex 24/40.
- Columna Vigreux de 38.1 cm. de longitud esmerilado Pyrex 24/40.
- Tubo conector de tres salidas (esmerilado Pyrex 24/40).
- Refrigerante de 33 cm. de longitud (esmerilado Pyrex 24/40).
- Tubo conector de vacío (esmerilado Pyrex 24/40).
- Termopar Thermolyne Pirometro Digital (Intervalo 0.1°C). Modelo PM20700 Barnstead/Thermolyne Corp.
- Termómetro (-10 a 260°C) Brannan.
- Regulador Variac 120 V, 5 amperes (Reostato).
- Canastilla térmica para matraz bola 500 ml.
- Matraz bola 250 ml. junta hembra esmerilada Pyrex QFT 19/22.
- Refrigerante de 19 cm. de longitud utilizado como columna de destilación (esmerilado Pyrex QFT 19/22).
- Refrigerante de 19 cm. de longitud (esmerilado Pyrex QFT 19/22).
- Tubo conector de tres salidas (esmerilado Pyrex QFT 19/22).

- Adaptador para termómetro (esmerilado Pyrex QFT 19/22).
- Tubo conector de vacío (esmerilado Pyrex QFT 19/22).
- Termómetro con adaptador esmerilado 10/30 (-10 a 150°C) CAT ST 1-150.ERTCO.
- Esferas de vidrio para ebullición de 5 mm. de diámetro.
- Probetas de 10, 100 y 250 ml. Pyrex.
- Ampolletas de vidrio 5 ml. de capacidad.
- Contenedores de 50 ml. de capacidad.

### C) PROCEDIMIENTO

Una muestra de 100 ml. de brandy se coloca en un matraz bola de 500 ml. junta hembra esmerilada 24/40 limpio y seco, agregándole tres esferas de vidrio de 5 mm. de diámetro (para evitar el sobrecalentamiento del líquido en ebullición).

Se arma el aparato de destilación fraccionada, colocando la columna de Vigreux de 38.1 cm. de longitud 24/40 en el matraz destilador.

La destilación fraccionada, se puede llevar a cabo mediante el uso de un equipo QFT 19/22.

El control de la temperatura se puede llevar a cabo mediante el uso del termómetro ó bien utilizando el termopar Thermolyne.

La cabeza del destilado (5% = 5 ml.) se colecta por separado y se desechan.

El cuerpo del destilado (28% = 28 ml.) se colecta por separado para su posterior determinación de gravedad específica (porcentaje de alcohol en volumen) y de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{POB}}$ .

La cola del destilado (5% = 5 ml.) se puede colectar ó desechan.



## II.3 METODO PARA DETERMINAR EL PORCENTAJE DE ALCOHOL EN VOLUMEN DE LAS MUESTRAS (SIN DESTILAR Y DESTILADAS).

### A) OBJETIVO

El objetivo de esta determinación es conocer el porcentaje de alcohol en volumen de las muestras de brandies y de los destilados.

En el caso de los brandies para corroborar su contenido alcohólico.

En el caso de los destilados, para que la cantidad de muestra que se lleva a combustión sea la suficiente para producir el  $\text{CO}_2$  que se requiere para el análisis isotópico.

### B) EQUIPO

- Balanza Analítica Sartorius, modelo 2474; con un peso máximo de 200 g. y  $d=0.1$  mg.

### C) MATERIALES Y REACTIVOS

- Densímetro Gay-Lussac Cartier Tp.  $15^\circ\text{C}$  No. 0100.
- Picnómetro Nach Gay-Lussac 10 ml.
- Probeta 50 ml Pyrex.
- Agua destilada.

### D) PROCEDIMIENTO

Se lleva a cabo la determinación del porcentaje de alcohol en volumen de las muestras mediante:

#### D.1 DENSIMETRO

Se colocan 25 ml de la muestra en la probeta de 50 ml y se introduce el densímetro, se toma la lectura cuidando que el densímetro no se pegue a las paredes de la probeta.

## D:2 PICNOMETRO

Se realiza en base a la USP XX (Pruebas Físicas <841> Gravedad Específica); que consiste en:

La determinación de la gravedad específica se aplica únicamente a líquidos y se basa en el cociente del peso de una sustancia en aire a 25°C entre el peso del agua en las mismas condiciones.

Procedimiento: en un picnómetro limpio y seco calibrado previamente, mediante la diferencia de su peso con el peso de agua de reciente ebullición a 25°C.

Se ajusta la temperatura del líquido a 20°C y se llena el picnómetro. Se ajusta la temperatura del picnómetro lleno a 25°C, removiendo el exceso del líquido y se pesa; a este peso se le resta el peso de la tara del picnómetro.

La gravedad específica del líquido, es el cociente del peso del líquido contenido en el picnómetro entre el peso del agua contenida en el picnómetro, ambos determinados a 25°C.

Para obtener el porcentaje de alcohol en volumen (ó en peso), se traslada el dato obtenido a la Tabla Alcoholométrica localizada en la página 104 (Datos basados en el National Bureau of Standards Bulletin, vol. 9, pp. 424-5).

## II.4 METODO PARA DETERMINAR LA $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ EN MUESTRAS ORGANICAS. (IFUNAM.C13.ORG).

### A) OBJETIVO

El objetivo del presente método es transformar totalmente el carbono de la materia orgánica en bióxido de carbono  $\text{CO}_2$  puro para medir su contenido de carbono-13. Lo anterior se realiza mediante la combustión de la muestra durante dos horas en presencia de óxido cúprico a  $900^\circ\text{C}$ .

Es posible aplicar este método a toda la materia orgánica en estado sólido, líquido ó gaseoso.

### B) EQUIPO

- La combustión de la materia orgánica se realiza en una mufla que opera con una temperatura máxima de  $1100^\circ\text{C}$  con un error no mayor de  $\pm 5^\circ\text{C}$ . (Mufla Termolyne Modelo No. F48025)

- La preparación y purificación de las muestras se realizan en líneas de vacío 1 y 2, Figura 24 y 25. La línea de vacío para la preparación de muestras es una línea horizontal con capacidad para preparar 9 muestras y la línea de vacío para la purificación de muestras es una línea vertical de extracción múltiple con capacidad de purificar 5 muestras a la vez.

Cada una de las líneas de preparación y purificación de muestras está equipada con una bomba mecánica para obtener un prevacío de  $2 \times 10^{-2}$  Torr y un sistema de bombas acopladas, mecánica y difusora para tener un vacío medio de  $10^{-3}$  Torr. (Bombas mecánicas marca Leybold, modelo D4b, y bombas difusoras construidas en el taller del IFUNAM)

- Se cuenta con medidores de vacío tipo piranni, termopares y un baratrón para medir el rendimiento de las muestras. (Piranni marca Edwards Modelo DV-23, Termopar marca Hasting Modelo DV-23, Termopar marca RCA y Baratrón marca Setra S/N 251363, modelo 280E con un intervalo de 0-25 psia, con fuente desarrollada en el Instituto de Física de la UNAM en millitorr).

- Se determinan las abundancias relativas de  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  (expresadas mediante la  $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$  en ‰) con un espectrómetro de masas Finnigan Mat 250, de triple colector y sistema de introducción automático de gases. (Finnigan Mat. 355 River Oaks Parway, San José California 95134-1991).

### C) MATERIAL Y REACTIVOS.

- Pinzas de punta de acero inoxidable para disección.
- Secadora de aire tipo industrial.
- Gatos mecánicos de laboratorio.
- Generador tesla para detección de fugas en sistemas de vidrio.
- Tamices. malla 40, malla 100 y malla 150.
- 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 y tubo de cuarzo de 6 mm de diámetro externo, 4 mm de diámetro interno y 2 cm de largo, sellado por un lado con soplete. Este tubo es quemado a 650°C en una mufla para que se encuentre libre de materia orgánica.
- Óxido Cúprico en tiras (J.T. Baker S.A. de C.V.). El óxido cúprico es pasado por una malla del No. 40 para retirar el polvo. Posteriormente es quemado en una mufla a 860°C durante tres horas al aire para oxidar toda la materia orgánica que contenga.
- Plata 99.9994% de pureza, es laminada 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 30%, posteriormente son lavados con agua desmineralizada y son calentados en una mufla a 650°C durante una hora. La plata es usada como catalizador en un tubo de combustión. Es necesario colocar la plata en un capilar de cuarzo y posteriormente este en el tubo de combustión.
- Cobre metálico activado. (Alpha Resources Inc.).
- Tubos de combustión. Al tubo de cuarzo se le adicionan  $\approx$  3 gr. de óxido cúprico, la plata y es calentado a 650°C en una mufla durante dos horas y son almacenados en un horno a 50°C. Previo al análisis se colocan  $\approx$  3 gr. de cobre metálico.
- Tubo capilar de cuarzo de 2 mm de diámetro interno y 3.2 mm de diámetro externo, el cual es cortado en punta para tener aprox. 2.5 cm de largo, posteriormente es quemado a 650°C en una mufla durante una hora y son almacenados en un horno a 60°C.
- Acetona, para limpiar la grasa de las conexiones.
- Frascos contenedores de vidrio con válvulas para vacío de teflón y de vidrio (Kontes y Lowers Hapert). Estos frascos se utilizan para transportar el CO<sub>2</sub> de la línea de preparación de muestras al espectrómetro de masas.

- Termos de vidrio de diferentes tamaños (1, 1/2 y 1/4 lt) para nitrógeno líquido. (Cristalab S.A.)
- Termo de 50 litros de acero inoxidable.
- Un soplete (antorcha) de gas-oxígeno para sellar el tubo de cuarzo.
- Tanque de oxígeno, para el soplete. (Infra, S.A. de C.V.).
- Hielo seco. Hecho con un tanque de CO<sub>2</sub> con sifón. (Infra, S.A. de C.V.).
- Mezcla Frigorífica - 80°C. Hecha con hielo seco frapé y alcohol etílico industrial ó acetona.
- Nitrógeno líquido. (Infra, S.A. de C.V.).
- 9 uniones cajón ultra torr de 3/8" a 3/8" Cat. SS-6-UT-6. (Uniones Cajón. Swagelok Companies).
- Se requiere un sistema para romper el tubo que contiene el gas CO<sub>2</sub>, este sistema se encuentra formado por las siguientes partes: a) dos uniones reductoras cajón ultra torr de 3/8" a 1/2", Cat. SS-8-UT-8-6; b) un tubo flexible cajón de 1/2", Cat. 321-8-X-1; c) y dos adaptadores de acero inoxidable Cat. SS-6-UT-A-8. El material de este inciso es para un solo rompedor. (Uniones Cajón. Swagelok Companies).
- Una microjeringa Oxford de volumen variable de 2 a 10 µl y de 20-50 µl. con puntas de plástico para la jeringa. (Monoject).
- Tanque de CO<sub>2</sub> (Grado analítico), de 99.995% mínimo de pureza en un cilindro de 7 L, contenido en un tanque metálico a una presión máxima de 1551 KPa a 294°K (21°C) con un regulador de dos pasos con una presión de entrega de 0 - 718.2 Pa (0 a 15 psi) para trabajar con cilindros con una presión máxima de 20.7 KPa. (Air Products & Chemical INC.).

#### D) PROCEDIMIENTO.

La técnica empleada es la más recientemente aceptada internacionalmente y está de acuerdo con las técnicas descritas por: Zvi Sofer (1980), Mook y Jongsma (1987) y Boutton y col. (1983).

##### D.1 PREPARACION DE LA MUESTRA

La muestra no requiere ninguna preparación especial. Se toman 20 µl de alcohol ≈ 90%G.L. con una micropipeta y se colocan en un capilar de cuarzo el cual se introduce en el tubo de

combustión, posteriormente se coloca un tubo de 6 mm de diámetro invertido en el tubo de combustión de cuarzo preparado con  $\approx 3$  g. de óxido cúprico y plata contenida en un capilar de cuarzo previamente calentados a  $650^{\circ}\text{C}$ , posteriormente se agregan  $\approx$  de 3 g. de cobre metálico, es importante separar con el tubo de cuarzo el  $\text{Cu}^{\circ}$  de la muestra, del  $\text{CuO}$  y de la  $\text{Ag}^{\circ}$ .

Algunas de las precauciones que se deben tomar en el momento de preparar la muestras es no contaminar con materiales orgánicos como la grasa de los dedos, por lo que se debe colocar la muestra en el tubo capilar rápidamente y este se debe manipular con pinzas, así mismo es importante señalar que la porción de muestra a analizar sea homogénea.

Los tubos de combustión una vez preparados con la muestra se conectan a la línea de vacío para la preparación de la muestra. Figura 24 a través de una unión ultra torr de  $3/8"$ , se congela la muestra con nitrógeno líquido para evitar su evaporación en el caso de muestras líquidas y se evacúan con prevacío y vacío medio hasta alcanzar una presión de  $1 \times 10^{-3}$  torr, una vez que se ha alcanzado este vacío son sellados con el soplete. Cada vez que se preparan muestras para análisis isotópico de  $\delta^{13}\text{C}$ , se prepara un patrón internacional NBS-22 (8  $\mu\text{l}$ ), PEFI (8 mg) y/o sacarosa ANU (15 mg).

Línea de vacío para la preparación de muestras.

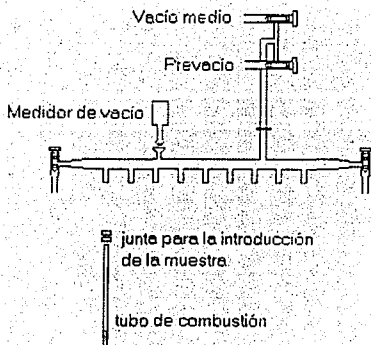


Figura 24

## D.2 COMBUSTION.

Los tubos de combustión en cuarzo sellados, son calentados durante 2 horas a 900°C en una mufla, posteriormente se dejan enfriar lentamente hasta 650°C y son mantenidos a esta temperatura durante 1 hora y se dejan enfriar lentamente hasta temperatura ambiente.

Para lograr la combustión completa de la muestra se utiliza óxido cúprico, el cual libera oxígeno.

El cobre metálico sirve para poder convertir los óxidos de nitrógeno en  $N_2$  a una temperatura de 650°C.

## D.3 PURIFICACION DE $CO_2$ .

El  $CO_2$  producido durante la combustión de la muestra es separado y purificado criogénicamente a través de trampas de nitrógeno líquido (-190°C) y mezcla de hielo seco y alcohol ó acetona (-80°C) en una línea de vacío para la preparación simultánea de cinco muestras, Figura 25, de la siguiente manera.

- Se marcan los tubos de combustión con un cortador de vidrio y se colocan en el rompedor de tubos.

- Se conectan los rompedores con los tubos de combustión en la línea de vacío y se abren las válvulas 5a, 6a y 7a (5b, 6b, 7b, 5c, 6c, 7c etc. hasta 5e, 6e, 7e) para bombear el aire abriendo la válvula 1. Así mismo se conectan las válvulas contenedoras y se abren las válvulas 10 y 11.

- Una vez que se ha alcanzado un vacío de  $1 \times 10^{-1}$  torr con las válvulas 1, 10, 11, 5a, 6a y 7a abiertas, se cierra la válvula 1 y se abre la válvula 2. Una vez que el vacío llega a  $10^{-3}$  torrs se cierran las válvulas 5a, 5b, 5c, 5d y 5e.

- Se procede a romper los tubos, flexionando el rompedor.

- Se coloca un termo con nitrógeno líquido (-180°C) en la trampa #8 para condensar el  $CO_2$  y el agua. Los gases no condensables se bombean a través del sistema de vacío, abriendo primero la válvula 1 y después la válvula 2. Es importante anotar la cantidad de gases incondensables que marca el medidor de vacío.

- Se cierran las válvulas 7a, 7b, 7c, 7d y 7e y las válvulas 5a, 5b, 5c, 5d y 5e.

- Se retira el nitrógeno líquido de los dedos fríos y se cambia el termo por una mezcla de hielo seco-etanol (-80° C). En esta trampa, el agua producida en la reacción se queda congelada.



- Se coloca nuevamente el termo de nitrógeno líquido en la trampa 9, para colectar el CO<sub>2</sub>, una vez que se tiene un vacío de 10<sup>-3</sup> Torr, se cierran las válvulas 6a, 6b, 6c, 6d y 6e y se cambia la trampa por mezcla de hielo seco-etanol, esta trampa es para asegurar que toda el agua se ha quedado en los dedos fríos.

- El CO<sub>2</sub> purificado se transfiere a la trampa que se encuentra entre las válvulas 10 y 11 con nitrógeno líquido para medir la presión del gas, el cual es descongelado y transferido al frasco contenedor a través de la válvula 11 utilizando nitrógeno líquido. De esta misma forma se colecta el CO<sub>2</sub> de los demás dedos fríos en los frascos contenedores a través de las válvulas 5b, 5c, 5d y 5e.

Para la purificación de CO<sub>2</sub> se recomienda utilizar la línea de vacío para la purificación de muestras orgánicas Figura 26 la cual se diseñó especialmente para este tipo de muestras, ya que la limpieza de ellas es mejor.

#### D.4 ANALISIS ISOTOPICO.

Los frascos con el CO<sub>2</sub> purificado se colocan en el espectrómetro de masas para determinar la  $\delta^{13}\text{C}$  de las muestras.

#### D.5 OBTENCION DE RESULTADOS.

- La fórmula de cálculo se describe a continuación:

$$\delta^{13}\text{C} = \left( \frac{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{muestra}}}{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{PDB}}} - 1 \right) 10^3 \quad (16)$$

Donde:

$\delta^{13}\text{C}$  está expresada por los cocientes de los isótopos estables ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) de la muestra contra el patrón internacional PDB.

El cálculo del resultado se encuentra en el programa de la computadora del espectrómetro de masas.

La precisión de esta técnica esta dada por la desviación estándar de los análisis del patrón internacional y del patrón interno realizados durante los últimos 12 meses. (0.1%)

Línea de vacío 2 para la preparación simultánea de cinco muestras.

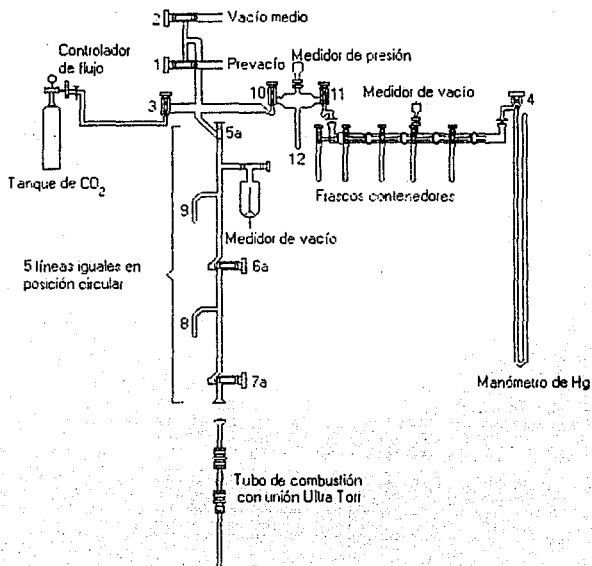


Figura 25

Línea de vacío para la purificación de  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$   
de muestras orgánicas.

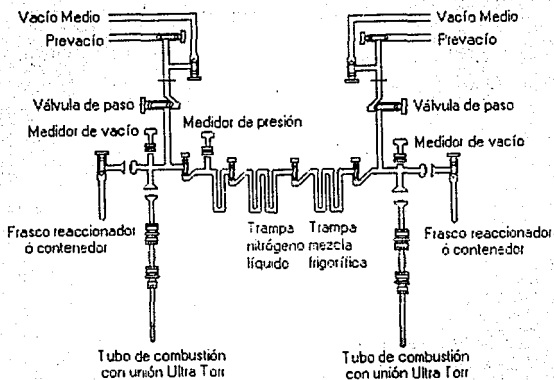


Figura 26

II.5 METODO PARA DETERMINAR LA  $\delta^{13}\text{C}_{\text{POB}}$  Y  $\delta^{18}\text{O}_{\text{POB}}$  EN CARBONATOS.  
IFUNAM.C13.CA

A) OBJETIVOS.

El objetivo del presente método es la de convertir el carbono y oxígeno de los carbonatos en  $\text{CO}_2$  mediante su reacción con ácido ortofosfórico al 100%, para determinar su composición isotópica tanto de Carbono-13 como de Oxígeno-18 ( $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{18}\text{O}$ ). (Craig, 1953).

El presente método se puede utilizar en muestras tales como conchas, caracoles, mármol, etc.

B) MATERIAL Y REACTIVOS.

- Un baño con temperatura controlada a  $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$ , el espectrómetro de masas y el sistema de vacío de preparación y purificación de muestras.
- Frascos reaccionadores de vidrio con tubo lateral para colocar el ácido.
- Válvula de paso.
- Pipeta y Propipeta para medir el volumen del ácido.
- Mezcla hielo seco-etanol ó hielo seco-acetona.
- Termos de vidrio de diferentes volúmenes; 1/4, 1/2 y 1 lt.
- Frascos contenedores de vidrio con válvula de paso.
- Acido ortofosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) al 85%. (J.T. Baker S.A. de C.V.).
- Pentóxido de fósforo ( $\text{P}_2\text{O}_5$ ). (E. Merck).
- Trióxido de Cromo ( $\text{CrO}_3$ ). (J.T. Baker S.A. de C.V.).
- Acido ortofosfórico al 100%. En un vaso de precipitados, a un litro de ácido ortofosfórico  $\text{H}_3\text{PO}_4$  al 85% se le agrega pentóxido de fósforo  $\text{P}_2\text{O}_5$  ( $\pm 665.6$  gr.) muy lentamente hasta que no exista reacción entre el agua del ácido y el  $\text{P}_2\text{O}_5$ . Con una espátula se le agregan unos cristales de trióxido de cromo. La solución es calentada a  $200^\circ\text{C}$  durante 7 horas continuas, posteriormente se le agrega 1 ml. de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (30 volúmenes), y nuevamente se calienta durante 4.5 hr. a  $220^\circ\text{C}$ . Se enfría y se determina su densidad la cuál deberá ser de  $1.90 - 1.92 \text{ gr/cm}^3$ .

Si la densidad es menor, se agrega más pentóxido de fósforo  $P_2O_5$ , y si la densidad es mayor se agrega un poco de  $H_2O$  destilada y se calienta durante cuatro horas más.

- Balanza analítica.

### C) PROCEDIMIENTO.

#### C.1 PREPARACION DE LA MUESTRA.

Cuando la muestra es pura, se pesan aproximadamente 40 mg de la muestra y se colocan en el frasco reaccionador teniendo cuidado de que no quede polvo en las paredes, con una pipeta se colocan en el dedo lateral del frasco reaccionador aproximadamente 10 ml de ácido ortofosfórico  $H_3PO_4$  al 100%.

- Se cierran los frascos reaccionadores con sus válvulas de paso y se colocan en la línea de purificación de la Figura 33.

- Se les hace prevacío a los frascos reaccionadores abriendo las válvulas 5, 6 y 7 hasta  $10^{-1}$  torr a través de la válvula 1 y después se cierra esta y se abre la válvula 2 y se espera hasta lograr un vacío de  $10^{-3}$  torrs.

- Una vez alcanzado los  $10^{-3}$  torrs se cierran las válvulas 7 y las válvulas de paso de los frascos reaccionadores y se retiran estos de la línea teniendo precaución de que las válvulas 7 estén cerradas.

- Se coloca el frasco reaccionador en el baño a  $25^{\circ}C$  durante 30 min, hasta que el ácido ha adquirido la temperatura del baño.

- Se vierte el ácido a la muestra y se inicia la siguiente reacción:



(17)

El factor de fraccionamiento,  $\alpha$ , es el cociente de dos isótopos dividido por el cociente correspondiente de otra fase, como lo es el caso del ion carbonato

$$\alpha = \frac{\frac{3[C^{18}O_2^*] \cdot 2[C^{16}O^{18}O_2^*] - [C^{17}O_2^{18}O^*]}{3[C^{16}O_3^*] \cdot 2[C^{16}O_2^{18}O^*] - [C^{16}O^{18}O_2^*]}}{\frac{[H_2^{18}O]}{[H_2^{16}O]}} \quad (18)$$

Las constantes de equilibrio de la reacción de intercambio entre varios iones de carbonato esta dada por una simetría de números, por lo que la expresión para  $\alpha$ , se reduce a la expresión de la constante de equilibrio de la reacción:



El fraccionamiento isotópico asociado a esta reacción depende de la temperatura y para 25°C es de 1.0137. (Mc. Crea 1950).

- Se vuelve a colocar el frasco reaccionador en el baño a 25°C, y se permite que siga reaccionando durante 12 horas.

#### C.2 PURIFICACION DE LA MUESTRA.

- A las 12 horas se retira el frasco del baño y se procede a purificar el CO<sub>2</sub>.

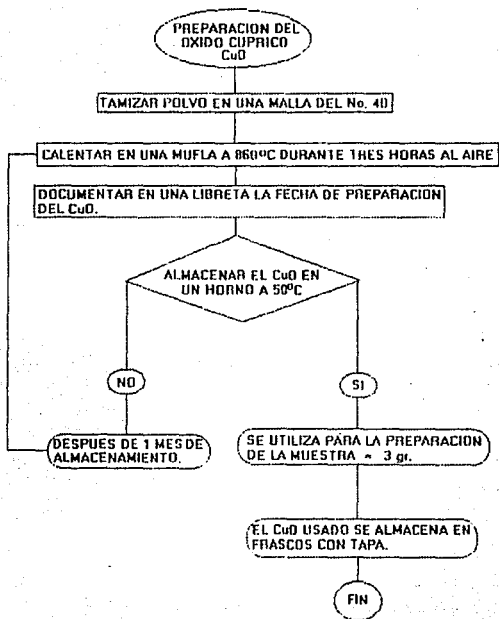
- El CO<sub>2</sub> producido es separado y purificado criogénicamente a través de trampas de nitrógeno líquido (-190°C) y mezcla de hielo seco y alcohol (-80°C), de la misma manera y en la misma línea de preparación que la de la técnica IFUNAM.C13.ORG.

Se conecta el frasco reaccionador en la línea de purificación de muestra (Figura 25) a través de las válvulas 7, 6 y 5 abiertas, una vez que se tiene un vacío de 10<sup>-2</sup> torr se extrae el CO<sub>2</sub> y agua a través de la válvula de paso con nitrógeno líquido (-190°C) y se congela en el dedo frío 8. Se cierra la válvula de paso hacia el frasco reaccionador y las válvulas 7, el aire líquido es cambiado por mezcla frigorífica (hielo seco-alcohol) (-80°C), lo cual permite congelar el agua y descongelar el CO<sub>2</sub> de la reacción, posteriormente el CO<sub>2</sub> se congela con nitrógeno líquido en los frascos contenedores a través de las válvulas 5, 10 y 11 para efectuar la medida de la  $\delta^{13}C$  y la  $\delta^{18}O$  en el espectrómetro de masas.

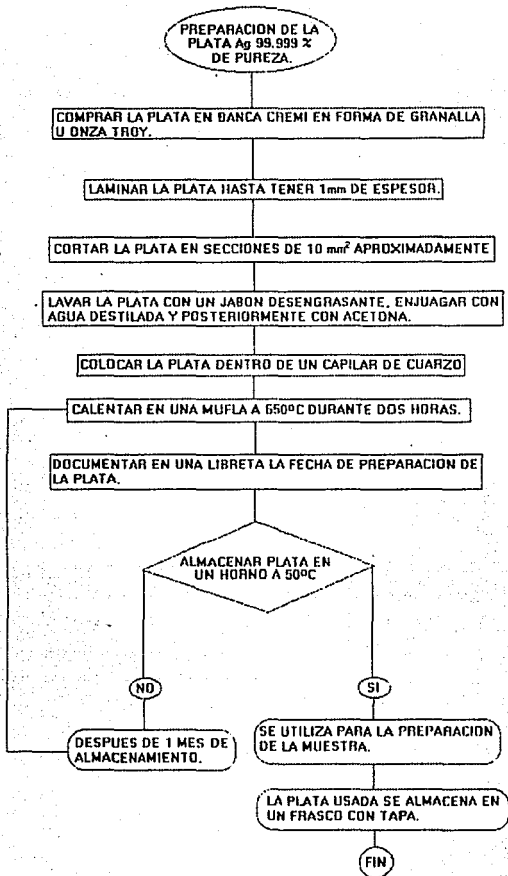
## II.6 Diagramas de Flujo de los Métodos utilizadas para este trabajo.

A continuación se presentan los diagramas de flujo de las siguientes técnicas:

- a) Método para determinar la  $\delta^{13}\text{C}$  en muestras orgánicas.  
(IFUNAM.C13.ORG.)
- b) Método para determinar la  $\delta^{13}\text{C}$  y la  $\delta^{18}\text{O}$  en carbonatos.  
(IFUNAM.C13.CA.)







PREPARACION TUBOS DE  
COMBUSTION

CORTAR EL TUBO (1.5 m) EN 3 SECCIONES Y MARCAR EL CENTRO  
SI EL TUBO ES CAPILAR SE CORTA EN SECCIONES DE 3 cm.  
APROXIMADAMENTE

SELLAR CON SOPLETE CADA SECCION EN LA PARTE CENTRAL

CALENTAR EN UNA MUFLA A 650°C DURANTE DOS HORAS  
Y DEJAR ENFRIAR LENTAMENTE A TEMPERATURA AMBIENTE  
SIN ABRIR LA MUFLA.

COLOCAR APROXIMADAMENTE 3 gr. DE CuO

COLOCAR LA PLATA DENTRO DE UN CAPILAR DE CUARZO.

CALENTAR EN UNA MUFLA A 650°C DURANTE DOS HORAS  
Y DEJAR ENFRIAR LENTAMENTE A TEMPERATURA AMBIENTE  
SIN ABRIR LA MUFLA.

DOCUMENTAR EN UNA LIBRETA LA FECHA DE PREPARACION  
DE LOS TUBOS.

ALMACENAR TUBOS EN  
UN HORNO A 50°C

NO

DESPUES DE 1 MES DE  
ALMACENAMIENTO.

SI

SE UTILIZAN PARA LA PREPARACION  
DE LA MUESTRA.

LOS TUBOS USADOS SE OBSEQUIAN A  
LA FACULTAD DE QUIMICA, UNAM.

FIN

PREPARACION DE MUESTRAS  
TECNICA IFUNAM.CT3. ORG.

TOMAR UN TUBO DE COMBUSTION DEL HORNO QUE SE ENCUENTRA A 50°C

PESAR 25 mg. DE MUESTRA SOLIDA O 20  $\mu$ l DE MUESTRA LIQUIDA EN UN CAPILAR, COLOCAR LA MUESTRA EN UN TUBO DE COMBUSTION Y ETIQUETAR CON SU CLAVE CORRESPONDIENTE.

EN EL TUBO DE COMBUSTION DE CUARZO, DESPUES DE COLOCAR LA MUESTRA, COLOCAR UN TUBO PEQUEÑO Y ADICIONAR 3 gr. DE  $\text{Cu}^0$

CONECTAR EL TUBO DE COMBUSTION A LA LINEA DE VACIO Fig. 24 MEDIANTE UNIONES SWAGelok.

SI LA MUESTRA ES LIQUIDA, CONGELAR EL TUBO DE COMBUSTION CON NITROGENO LIQUIDO

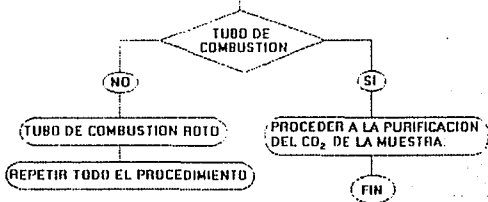
HACER PREVACIO Y VACIO MEDIO. CUANDO EL MEDIDOR DE VACIO LLEGA A  $10^{-3}$  mbar. PROCEDER A SELLAR EL TUBO DE COMBUSTION CON UN SOPLETE

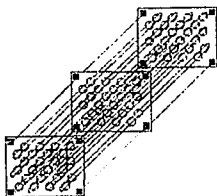
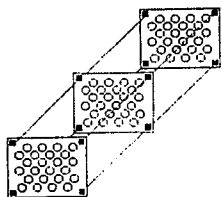
COLOCAR LOS TUBOS DE COMBUSTION EN LA MUFLA, SIGUIENDO UN ORDEN COMO SE MUESTRA EN LA Fig. 27

CALENTAR A 900°C DURANTE 2 HORAS. BAJAR LA TEMPERATURA LENTAMENTE A 650°C Y MANTENER TEMPERATURA 1 HORA MAS.

APAGAR LA MUFLA Y DEJAR ENFRIAR LAS MUESTRAS LENTAMENTE

ARRIBAR LA MUFLA Y VERIFICAR QUE LOS TUBOS DE COMBUSTION SE ENCUENTREN EN ORDEN Y COMPLETOS





**Figura 27**

PURIFICACION DE CO<sub>2</sub>  
TECNICA IFUNAM. C13.ORG.

EL TUBO DE COMBUSTION ES MARCADO CON UN CORTADOR DE VIDRIO

CONECTAR EL TUBO DE COMBUSTION EN UN ROMPEDOR SWAGelok  
CON UNION ULTRA TORR EN LA LINEA DE VACIO FIG. 25. SE PROCEDE  
DE LA MISMA FORMA HASTA COMPLETAR CINCO MUESTRAS.

ABRIR VALVULAS 7A, 6A, 5A, 10, 11 Y 1 PARA HACER PREVACIO. CERRAR  
VALVULA 1 Y ABRIR VALVULA 2 HASTA LLEGAR A UN VACIO DE 10<sup>-3</sup> mbar.

CERRAR VALVULAS 5A, 5B, 5C, 5D, 5E Y PROCEDER A ABRIR VALVULAS DE  
PASO DE LOS FRASCOS REACCIONADORES. POSTERIORMENTE COLOCAR  
EN LAS TRAMPAS 8 Y 9 NITROGENO LIQUIDO DURANTE 10'

DOCUMENTAR CLAVES DE LAS MUESTRAS Y VACIO DE CADA UNA DE ellas.  
EN LA FORMA IFUNAM F05.

VOLVER HA HACER VACIO A LAS MUESTRAS SI ASI LO REQUIEREN, ABRRIENDO  
LAS VALVULAS 5A, 5B, 5C, 5D, 5E. HACIENDO PREVACIO Y VACIO MEDIO.  
CERRAR VALVULAS 7A, 7B, 7C, 7D, 7E. RETIRAR DE LA LINEA LOS TUBOS CON  
EL ROMPEDOR. CERRAR VALVULAS 5A, 5B, 5C, 5D, 5E Y QUITAR EN NITROGENO  
LIQUIDO DE LA TRAMPA 9 Y DESCONGELAR.

CAMBIAR EL NITROGENO LIQUIDO DE LA TRAMPA 8 POR MEZCLA FRIGORIFICA  
Y ESPERAR 10 MINUTOS.

COLOCAR NITROGENO LIQUIDO EN LA TRAMPA 9. DOCUMENTAR EL VACIO EN  
LA FORMA IFUNAM F05 Y HACER PREVACIO Y VACIO MEDIO A LAS MUESTRAS  
QUE LO REQUIERAN HASTA 10<sup>-3</sup> mbar.

CERRAR VALVULAS 6A, 6B, 6C, 6D, 6E Y RETIRAR LA MEZCLA FRIGORIFICA DE  
LA TRAMPA 8. CAMBIAR EL NITROGENO LIQUIDO DE LA TRAMPA 9 POR MEZCLA  
FRIGORIFICA Y ESPERAR 10 MINUTOS.

CERRAR VALVULA 11. COLOCAR NITROGENO LIQUIDO EN LA TRAMPA 12. VERIFICAR  
QUE LAS VALVULAS 1 Y 2 SE ENCUENTREN CERRADAS Y ABRIR LA VALVULA 5A.  
Y DOCUMENTAR EL VACIO EN LA FORMA IFUNAM F05

CERRAR VALVULA 10. RETIRAR EL NITROGENO LIQUIDO Y DESCONGELAR EL CO<sub>2</sub>  
DOCUMENTAR LA PRESION EN LA FORMA IFUNAM F05.

PRESION MAYOR DE  
300 militor

NO

SI

DESHECHAR LA MUESTRA  
ABRIENDO LAS VALVULAS  
10, 11, 1 Y POSTERIORMENTE  
LA 2.

CALCULAR LA CANTIDAD DE  
MATERIA QUE SE REQUIERE  
PARA TENER LA PRESION  
REQUERIDA Y REPETIR  
TODO EL PROCEDIMIENTO.

COLOCAR NITROGENO LIQUIDO EN LA  
VALVULA CONTENEDORA 1. ABRIR LA  
VALVULA 11. DOCUMENTAR EL VACIO  
EN LA FORMA IFUNAM F05.

ABRIR VALVULA 10. SI SE REQUIERE HACER  
PREVACIO Y VACIO MEDIO HASTA  
CERRAR VALVULA DE PASO DEL FRASCO  
CONTENEDOR. REPETIR ESTOS PASOS  
PARA CADA UNA DE LA 4 MUESTRAS  
RESTANTES.

UNA VEZ QUE SE TIENEN LA 5 MUESTRAS EN  
LOS FRASCOS CONTENEDORES CON SUS  
CLAVES. SE CIERRA LA VALVULA 11 Y SON  
COLOCADAS EN LA UNIDAD BLY DEL ESPECTRO  
METRO DE MASAS PARA SU ANALISIS.

FIN

PREPARACION DE MUESTRAS  
TECNICA IFUNAM. C13.CA.

PESAR 40 A 70 mg DE CARBONATO EN EL FRASCO REACCIONADOR.  
COLOCAR 10 ml. DE AC. FOSFORICO 100% EN EL DEDO LATERAL

VERIFICAR QUE LA VALVULA DE PASO SE ENCUENTRE CERRADA.

CONECTAR EL FRASCO REACCIONADOR A LA LINEA DE VACIO Fig. 25  
DE LA MISMA FORMA HASTA COMPLETAR 5 MUESTRAS.

SI

AC. FOSFORICO 100%  
CAE EN CARBONATO.

NO

REPETIR EL PROCEDIMIENTO

ABRIR VALVULAS DE PASO, 7A, 6A, 5A, 10, 11, 4 Y 1 PARA HACER PREVACIO.  
CERRAR VALVULA 1 Y ABRIR VALVULA 2. HASTA LLEGAR A UN VACIO DE  
 $10^{-3}$  mbar. CERRAR VALVULAS DE PASO.

DESCONECTAR LOS FRASCOS REACCIONADORES DE LA LINEA DE VACIO  
Fig. 25 Y TRASLADARLOS AL BAÑO A 25° C. ESPERAR 1 HORA, VOLTEAR  
EL FRASCO REACCIONADOR PARA QUE EL AC. FOSFORICO 100% SE MEZCLE  
CON EL CARBONATO.

DEJAR LOS FRASCOS REACCIONADORES DURANTE TODA LA NOCHE  
A 25° C.

DE LA MISMA FORMA SE PROCEDE A PREPARAR OTRAS MUESTRAS. PARA  
CADA LOTE DE MUESTRAS (DIA), SE INTRODUCEN 2 PATRONES INTERNOS.  
AL TERMINAR, SE DEJA LA LINEA AL VACIO.

AL SIGUIENTE DIA SE PROCEDE A PURIFICAR EL CO<sub>2</sub>

FIN

PURIFICACION DE CO<sub>2</sub>  
TECNICA IFUNAM. C13.CA.

CONECTAR EL FRASCO REACCIONADOR EN LA LINEA DE VACIO No. 2 DE LA FIG. 25 Y DOCUMENTAR EN LA FORMA IFUNAM F05, LA CLAVE, CANTIDAD Y TEMPERATURA DE LA MUESTRA. SE PROCEDE DE LA MISMA FORMA HASTA COMPLETAR CINCO MUESTRAS

ABRIR VALVULAS 7A, 6A, 5A, 10, 11 Y 1 PARA HACER PREVACIO. CERRAR VALVULA 1 Y ABRIR VALVULA 2 HASTA LLEGAR A UN VACIO DE 10<sup>-2</sup> mbar.

CERRAR VALVULAS 5A, 5B, 5C, 5D, 5E Y PROCEDER A ABRIR VALVULAS DE PASO DE LOS FRASCOS REACCIONADORES, POSTERIORMENTE COLOCAR EN LAS TRAMPAS 8 Y 9 NITROGENO LIQUIDO DURANTE 10'

DOCUMENTAR CLAVES DE LAS MUESTRAS Y VACIO DE CADA UNA DE ellas, EN LA FORMA IFUNAM F05.

VOLVER HA HACER VACIO A LAS MUESTRAS SI ASI LO REQUIEREN, ABRIENDO LAS VALVULAS 5A, 5B, 5C, 5D, 5E, HACIENDO PREVACIO Y VACIO MEDIO. CERRAR VALVULAS 7A, 7B, 7C, 7D, 7E. RETIRAR DE LA LINEA LOS TUBOS CON EL ROMPEDOR. CERRAR VALVULAS 5A, 5B, 5C, 5D, 5E Y QUITAR EN NITROGENO LIQUIDO DE LA TRAMPA 9 Y DESCONGELAR.

CAMBIAR EL NITROGENO LIQUIDO DE LA TRAMPA 8 POR MEZCLA FRIGORIFICA Y ESPERAR 10 MINUTOS.

COLOCAR NITROGENO LIQUIDO EN LA TRAMPA 9, DOCUMENTAR EL VACIO EN LA FORMA IFUNAM F05 Y HACER PREVACIO Y VACIO MEDIO A LAS MUESTRAS QUE LO REQUIERAN HASTA 10<sup>-3</sup> mbar.

CERRAR VALVULAS 6A, 6B, 6C, 6D, 6E Y RETIRAR LA MEZCLA FRIGORIFICA DE LA TRAMPA 8, CAMBIAR EL NITROGENO LIQUIDO DE LA TRAMPA 9 POR MEZCLA FRIGORIFICA Y ESPERAR 10 MINUTOS.

CERRAR VALVULA 11, COLOCAR NITROGENO LIQUIDO EN LA TRAMPA 12, VERIFICAR QUE LAS VALVULAS 1 Y 2 SE ENCUENTREN CERRADAS Y ABRIR LA VALVULA 5A, Y DOCUMENTAR EL VACIO EN LA FORMA IFUNAM F05.

CERRAR VALVULA 10, RETIRAR EL NITROGENO LIQUIDO Y DESCONGELAR EL CO<sub>2</sub>, DOCUMENTAR LA PRESION EN LA FORMA IFUNAM F05.

PRESION MAYOR DE  
300 milton

NO

SI

DESHECHAR LA MUESTRA  
ABRIENDO LAS VALVULAS  
10, 11, 1 Y POSTERIORMENTE  
LA 2.

CALCULAR LA CANTIDAD DE  
MATERIA QUE SE REQUIERE  
PARA TENER LA PRESION  
REQUERIDA Y REPETIR  
TODO EL PROCEDIMIENTO.

COLOCAR NITROGENO LIQUIDO EN LA  
VALVULA CONTENEDORA 1, ABRIR LA  
VALVULA 11. DOCUMENTAR EL VACIO  
EN LA FORMA IFUNAM F05.

ABRIR VALVULA 10, SI SE REQUIERE HACER  
PREVACIO Y VACIO MEDIO HASTA  
CERRAR VALVULA DE PASO DEL FRASCO  
CONTENEDOR. REPETIR ESTOS PASOS  
PARA CADA UNA DE LA 4 MUESTRAS  
RESTANTES.

FIN

UNA VEZ QUE SE TIENEN LA 5 MUESTRAS EN  
LOS FRASCOS CONTENEDORES CON SUS  
CLAVES, SE CIERRA LA VALVULA 11 Y SON  
COLOCADAS EN LA UNIDAD OLV DEL ESPECTRO  
METRO DE MASAS PARA SU ANALISIS.

Percentage of C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH				Percentage of C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH			
Specific gravity in air		Specific gravity in air		Specific gravity in air		Specific gravity in air	
By volume at 15.56° C (1)	By weight at 25° at 15.56° (2)	at 25° (3)	at 15.56° (4)	By weight (5)	By volume at 15.56° at 25° (6)	at 15.56° (7)	at 15.56° (8)
0	0.00	1.0000	1.0000	0	0.00	1.0000	1.0000
1	0.80	0.9985	0.9985	1	1.26	0.9981	0.9981
2	1.59	0.9970	0.9970	2	2.51	0.9963	0.9963
3	2.39	0.9956	0.9956	3	3.76	0.9945	0.9945
4	3.19	0.9941	0.9942	4	5.00	0.9927	0.9928
5	4.00	0.9927	0.9928	5	6.24	0.9911	0.9912
6	4.80	0.9914	0.9915	6	7.48	0.9894	0.9896
7	5.61	0.9901	0.9902	7	8.71	0.9879	0.9881
8	6.42	0.9888	0.9890	8	9.94	0.9863	0.9867
9	7.23	0.9875	0.9878	9	11.17	0.9848	0.9852
10	8.05	0.9862	0.9866	10	12.39	0.9833	0.9839
11	8.86	0.9850	0.9854	11	13.61	0.9818	0.9825
12	9.68	0.9838	0.9843	12	14.83	0.9804	0.9812
13	10.50	0.9826	0.9832	13	16.05	0.9789	0.9799
14	11.32	0.9814	0.9821	14	17.26	0.9776	0.9787
15	12.14	0.9802	0.9810	15	18.47	0.9762	0.9774
16	12.96	0.9790	0.9800	16	19.68	0.9748	0.9763
17	13.79	0.9778	0.9789	17	20.88	0.9734	0.9751
18	14.61	0.9767	0.9779	18	22.08	0.9720	0.9738
19	15.44	0.9756	0.9769	19	23.28	0.9706	0.9726
20	16.27	0.9744	0.9759	20	24.47	0.9692	0.9714
21	17.10	0.9733	0.9749	21	25.66	0.9677	0.9701
22	17.93	0.9721	0.9739	22	26.85	0.9663	0.9688
23	18.77	0.9710	0.9729	23	28.03	0.9648	0.9675
24	19.60	0.9698	0.9719	24	29.21	0.9633	0.9662
25	20.44	0.9685	0.9708	25	30.39	0.9617	0.9648
26	21.29	0.9673	0.9697	26	31.56	0.9601	0.9633
27	22.13	0.9661	0.9687	27	32.72	0.9585	0.9620
28	22.97	0.9648	0.9676	28	33.88	0.9568	0.9605
29	23.82	0.9635	0.9664	29	35.03	0.9551	0.9590
30	24.67	0.9622	0.9653	30	36.18	0.9534	0.9574
31	25.52	0.9609	0.9641	31	37.32	0.9516	0.9558
32	26.38	0.9595	0.9629	32	38.46	0.9498	0.9541
33	27.24	0.9581	0.9617	33	39.59	0.9480	0.9524
34	28.10	0.9567	0.9604	34	40.72	0.9461	0.9506
35	28.97	0.9552	0.9590	35	41.83	0.9442	0.9488
36	29.84	0.9537	0.9576	36	42.94	0.9422	0.9470
37	30.72	0.9521	0.9562	37	44.05	0.9402	0.9451
38	31.60	0.9506	0.9548	38	45.15	0.9382	0.9432
39	32.48	0.9490	0.9533	39	46.24	0.9362	0.9412
40	33.36	0.9473	0.9517	40	47.33	0.9341	0.9392
41	34.25	0.9456	0.9501	41	48.41	0.9320	0.9372
42	35.15	0.9439	0.9485	42	49.48	0.9299	0.9352
43	36.05	0.9421	0.9469	43	50.55	0.9278	0.9331
44	36.96	0.9403	0.9452	44	51.61	0.9256	0.9310
45	37.87	0.9385	0.9434	45	52.66	0.9235	0.9289

(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)
46	38.78	0.9366	0.9417	46	53.71	0.9213	0.9268
47	39.70	0.9348	0.9399	47	54.75	0.9191	0.9246
48	40.62	0.9328	0.9380	48	55.78	0.9169	0.9225
49	41.55	0.9309	0.9361	49	56.81	0.9147	0.9203
50	42.49	0.9289	0.9342	50	57.83	0.9124	0.9181
51	43.43	0.9269	0.9322	51	58.84	0.9102	0.9159
52	44.37	0.9248	0.9302	52	59.85	0.9079	0.9137
53	45.33	0.9228	0.9282	53	60.85	0.9056	0.9114
54	46.28	0.9207	0.9262	54	61.85	0.9033	0.9092
55	47.25	0.9185	0.9241	55	62.84	0.9010	0.9069
56	48.21	0.9164	0.9220	56	63.82	0.8987	0.9046
57	49.19	0.9142	0.9199	57	64.80	0.8964	0.9024
58	50.17	0.9120	0.9177	58	65.77	0.8941	0.9001
59	51.15	0.9098	0.9155	59	66.73	0.8918	0.9978
60	52.15	0.9076	0.9133	60	67.69	0.8895	0.8955
61	53.15	0.9053	0.9111	61	68.64	0.8871	0.8932
62	54.15	0.9030	0.9088	62	69.59	0.8848	0.8909
63	55.17	0.9006	0.9065	63	70.52	0.8824	0.8886
64	56.18	0.8983	0.9042	64	71.46	0.8801	0.8862
65	57.21	0.8959	0.9019	65	72.38	0.8777	0.8839
66	58.24	0.8936	0.8995	66	73.30	0.8753	0.8815
67	59.28	0.8911	0.8972	67	74.21	0.8729	0.8792
68	60.33	0.8887	0.8948	68	75.12	0.8706	0.8768
69	61.38	0.8862	0.8923	69	76.02	0.8682	0.8745
70	62.44	0.8837	0.8899	70	76.91	0.8658	0.8721
71	63.51	0.8812	0.8874	71	77.79	0.8634	0.8697
72	64.59	0.8787	0.8848	72	78.67	0.8609	0.8673
73	65.67	0.8761	0.8823	73	79.54	0.8585	0.8649
74	66.77	0.8735	0.8797	74	80.41	0.8561	0.8625
75	67.87	0.8709	0.8771	75	81.27	0.8537	0.8601
76	68.98	0.8682	0.8745	76	82.12	0.8512	0.8576
77	70.10	0.8655	0.8718	77	82.97	0.8488	0.8552
78	71.23	0.8628	0.8691	78	83.81	0.8463	0.8528
79	72.38	0.8600	0.8664	79	84.64	0.8439	0.8501
80	73.53	0.8572	0.8636	80	85.46	0.8414	0.8479
81	74.69	0.8544	0.8608	81	86.28	0.8389	0.8454
82	75.86	0.8516	0.8580	82	87.08	0.8364	0.8429
83	77.04	0.8487	0.8551	83	87.89	0.8339	0.8404
84	78.23	0.8458	0.8522	84	88.68	0.8314	0.8379
85	79.44	0.8428	0.8493	85	89.46	0.8288	0.8354
86	80.66	0.8397	0.8462	86	90.24	0.8263	0.8328
87	81.90	0.8367	0.8432	87	91.01	0.8237	0.8303
88	83.14	0.8335	0.8401	88	91.77	0.8211	0.8276
89	84.41	0.8303	0.8369	89	92.52	0.8184	0.8250
90	85.69	0.8271	0.8336	90	93.25	0.8158	0.8224
91	86.99	0.8237	0.8303	91	93.98	0.8131	0.8197
92	88.31	0.8202	0.8268	92	94.70	0.8104	0.8170
93	89.65	0.8167	0.8233	93	95.41	0.8076	0.8142
94	91.03	0.8130	0.8196	94	96.10	0.8048	0.8114
95	92.42	0.8092	0.8158	95	96.79	0.8020	0.8086
96	93.85	0.8053	0.8118	96	97.46	0.7992	0.8057
97	95.32	0.8011	0.8077	97	98.12	0.7962	0.8028
98	96.82	0.7968	0.8033	98	98.76	0.7932	0.7998
99	98.38	0.7921	0.7986	99	99.39	0.7902	0.7967
100	100.00	0.7871	0.7936	100	100.00	0.7871	0.7936

Based upon data appearing in the National Bureau of Standards Bulletin, vol. 9, pp. 424-5.

ALCOHOLOMETRIC TABLE