



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA  
INGENIERIA EN SISTEMAS – SISTEMAS DE CALIDAD

“APLICACIÓN DE LOS METODOS ISOTOPICOS (EN AZUCARES Y PULPA), UTILIZANDO LA  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ , PARA DETERMINAR LA AUTENTICIDAD DE LOS JUGOS PREENVASADOS”.

TESIS.  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRO EN INGENIERÍA

PRESENTA:  
FRANCISCO JAVIER OTERO TRUJANO

TUTORES  
DRA. MARIA ISABEL CASAR ALDRETE, INSTITUTO DE FISICA  
M. C. PEDRO MORALES PUENTE, INSTITUTO DE GEOLOGIA

MÉXICO, D. F. JUNIO 2013



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

JURADO ASIGNADO:

Presidente: DRA. AMANDA GALVEZ MARISCAL  
Secretario: DR. JOSE GUADALUPE LOPEZ CORTES  
Vocal: DRA. MARIA ISABEL CASAR ALDRETE  
1<sup>er</sup>. Suplente: DR. CECILIO ALVAREZ TOLEDANO  
2<sup>do</sup>. Suplente: M. C. PEDRO MORALES PUENTE

Lugar donde se realizó la tesis: Laboratorio de Isótopos Estables, Instituto de Geología, Universidad Nacional Autónoma de México.

TUTORES DE TESIS:

DRA. MARIA ISABEL CASAR ALDRETE

M.C. PEDRO MORALES PUENTE

-----  
FIRMA

-----  
FIRMA

*(Segunda hoja)*

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

Por tu comprensión, amor, dedicación, gracias amada esposa:

**EDITH**

A **Dios** por la oportunidad de vivir.

A mis Padres:  
**Victoria y Nicolás (✝).**

A mis Hijos:  
**Claudia Irenne y Francisco Israel.**

A todos los integrantes de mi **Familia.**

A mis **Amig@s**, presentes, futuros y ausentes.

## **Agradecimientos.**

A la **Universidad Nacional Autónoma de México**, mi Alma Mater.

Al M. en C. Pedro Morales Y Puente, M. en C. Edith Cienfuegos Alvarado y Sr. Rafael Puente Martínez del **Laboratorio de Isótopos Estables del Instituto de Geología**, de la Universidad Nacional Autónoma de México en donde realicé la parte experimental del presente trabajo.

A la Dra. Amanda Gálvez Mariscal, al Dr. José Guadalupe López Cortés, a la Dra. María Isabel Casar Aldrete, al Dr. Cecilio Alvarez Toledano y al M. en C. Pedro Morales Y Puente por la revisión del presente trabajo.

A mis Profesores de la Maestría de Sistemas de Calidad.

A mis Compañeros de la Maestría de Sistemas de Calidad.

En especial a Rafael Puente Martínez por su apoyo y amistad incondicional.

**“LA CALIDAD EMPIEZA EN LA GENTE NO EN LAS COSAS”.**

**PHILIP B. CROSBY**

## **TITULO.**

**“Aplicación de los métodos isotópicos (en azúcares y pulpa), utilizando la  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ , para determinar la autenticidad de los jugos preenvasados”.**

## RESUMEN.

La importancia económica que los jugos de frutas preenvasados han adquirido en el mercado nacional, ha fomentado la adulteración con azúcares de bajo costo como el azúcar de caña y el jarabe fructosado.

Para desalentar la competencia desleal, que se genera por estas adulteraciones es necesario implementar métodos analíticos que detecten las adiciones fraudulentas y que puedan ser utilizados como herramientas para legislar el etiquetado de los productos. Esto permitirá proteger al consumidor guiando su elección y establecer una competitividad justa entre los productores.

Para el caso específico de la adición de edulcorantes exógenos en jugos de frutas preenvasados, el presente trabajo demostró que la determinación de las relaciones isotópicas de carbono de los jugos preenvasados puede utilizarse como soporte analítico para verificar su autenticidad. Actualmente esta metodología forma la base de la Norma Oficial Mexicana NOM-173-SCFI-2009.

Se define la “Autenticidad en Jugos” como: el mantenimiento en el producto de las características físicas, químicas, organolépticas y nutricionales esenciales de la fruta de que proceden. (CODEX STAN 247-2005).

En el desarrollo del presente trabajo, se emplearon las normas nacionales e internacionales para asegurar que el método analítico basado en las relaciones isotópicas de carbono cumple con los requisitos que la aplicación requiere (ser capaz de determinar la autenticidad de los jugos con un 95.0 % de confianza) y validarlo (dar certidumbre al juicio de autenticidad) para que las decisiones tomadas en base a los resultados analíticos se realicen con el nivel de confianza necesaria.

La validación, el desarrollo y al implementación del método de prueba se realizó en las siguientes etapas:

### **Validación del método de prueba.**

Una vez seleccionadas las técnicas analíticas y su capacidad para detectar la autenticidad de los jugos de frutas, se validaron las metodologías analíticas desarrolladas mediante el empleo sistemático de materiales de referencia o patrones internacionales (calibración), la evaluación independiente del desempeño técnico del laboratorio (análisis inter laboratorios) y de la evaluación sistemática de los factores de influencia en los resultados (precisión, límite de repetibilidad y límite de reproducibilidad).

### **Desarrollo del Método de Prueba.**

Se desarrollaron las técnicas analíticas del método de prueba para la determinación de las relaciones isotópicas de carbono ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) de los azúcares (sólidos solubles) y pulpa (sólidos no solubles) de los jugos de fruta.

Las técnicas desarrolladas se utilizaron en 66 muestras de jugos auténticos de frutas; 17 muestras de caña de azúcar y 17 muestras de jarabe fructosado.

Se validó el uso de la pulpa como patrón interno (utilizando estadística multivariable ANOVA).

Se obtuvo la curva de calibración de mezclas a partir de relaciones isotópicas de carbono ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ); empleando jugo de naranja auténtico preparado en el laboratorio con la adición de

diferentes porcentajes (%) de azúcares de edulcorantes externos conocidos (caña de azúcar y jarabe fructosado).

### **Criterios de Autenticidad.**

Se establecieron los criterios de autenticidad necesarios para que los resultados obtenidos puedan emplearse con la confianza necesaria en la toma de decisiones respecto a la autenticidad de los “Jugos 100.0 % de fruta preenvasados”. Se establecieron así mismo los procedimientos para el control de calidad de los resultados.

Y lo más importante se implementó el Método de Prueba en la Norma Oficial Mexicana NOM-173-SCFI-2009; después de casi dos décadas de trabajo del Subcomité de Trabajo del Anteproyecto de NOM “Alimentos, jugos y néctares envasados. Denominaciones, Especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba”, en beneficio y protección de los intereses de los consumidores.

## **CAPITULOS.**

### **I. INTRODUCCION.**

### **II. HIPOTESIS.**

### **III. OBJETIVOS.**

III.1. Objetivo General.

### **IV. ANTECEDENTES.**

IV.1. Fundamento Teórico.

IV.2. Diferencia Isotópica entre azúcares y pulpa.

IV.3. Composición isotópica de nitrógeno.

### **V. METODOLOGIA.**

V.1. Calibración (materiales de referencia).

V.2. Comparaciones (entre laboratorios).

V.3. Evaluación sistemática (de los factores que tienen influencia en los resultados).

V.4. Diseño del Método de Prueba.

### **VI. DESARROLLO EXPERIMENTAL.**

VI.1. Calibración (materiales de referencia).

VI.2. Comparaciones (entre laboratorios).

VI.3. Muestras auténticas de jugos de fruta.

VI.4. Muestras auténticas de edulcorantes exógenos.

VI.5. Muestras de mezclas experimentales.

VI.6. Muestras comerciales de jugos de fruta.

### **VII. ANALISIS DE RESULTADOS.**

VII.1. Calibración (materiales de referencia).

VII.2. Comparaciones (entre laboratorios).

VII.3. Muestras auténticas de jugos de fruta.

VII.4. Muestras auténticas de edulcorantes exógenos.

VII.5. Muestras de mezclas experimentales.

VII.6. Muestras comerciales de jugos de fruta.

### **VIII. CRITERIOS DE AUTENTICIDAD.**

### **IX. CONCLUSIONES.**

**X. BIBLIOGRAFIA.**

**XI. ANEXOS.**

A. DEFINICIONES.

B. NORMA OFICIAL MEXICANA: NOM-173-SCFI-2009, - Jugos de frutas preenvasados – Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba. 28 de Agosto de 2009.

C. MATERIALES DE REFERENCIA.

## I. INTRODUCCION.

Los jugos de frutas naturales son una fuente de nutrimentos importantes para mantener una buena salud. Sin embargo, a pesar de que la elaboración de jugos naturales es relativamente sencilla y económica, cada vez es más frecuente recurrir a la facilidad que ofrecen los jugos de frutas preenvasados.

De acuerdo con lo anterior, surge siempre una pregunta:

¿Qué tan "natural" es un jugo preenvasado?

O mejor dicho:

¿Qué tan semejante es un jugo preenvasado a uno natural?

Cuando se extrae toda el agua de un jugo, lo que resta son azúcares (sólidos solubles) y pulpa (sólidos no solubles). Los azúcares en su gran mayoría son los sólidos solubles de la fruta.

Una forma de responder a la pregunta de qué tan "natural" es un jugo preenvasado es medir el porcentaje de los azúcares (sólidos solubles) que contiene y determinar qué tanto de esos azúcares corresponden a la fruta original; la diferencia obviamente son los azúcares de otro origen que fueron agregados durante el proceso. Además de la adición de los azúcares exógenos se adicionan espesantes y/o acidulantes.

La producción de jugos industrializados en México, se remonta a mediados de la década de 1950, en la cual no se realizaba un control de calidad en el producto terminado, solo la determinación de pruebas organolépticas y la pasterización.

Para la década de los 80, se desarrollaron las primeras Normas Mexicanas NMX aplicadas a los jugos, por ejemplo: (F-018-1968 "Calidad para jugo de Toronja", F-045-1982 "Jugo de Manzana", F-44-1983 "Jugo de Uva" y F-118-1984 "Jugo de Naranja Envasado"), las cuales eran específicas para las frutas respectivas. En estos casos se incluyeron diferentes métodos analíticos y microbiológicos.

A finales de 1990 se comenzó a tratar de elaborar una Norma Oficial Mexicana, teniendo como participantes a la CANAINCA (Cámara Nacional de la Industria de Conservas Alimenticias), PROFECO, UNAM, IPN, etcétera; lamentablemente no había consenso entre las partes y esto se fue retrasando hasta el año de 2003 en el cual se formó el Subcomité de Trabajo del Anteproyecto de NOM "Alimentos, jugos y néctares envasados. Denominaciones, Especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba".

En el transcurso de 2004 a 2009, este Subcomité se encargó de elaborar los trabajos del:

- a) Anteproyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-173-SCFI-2007, Alimentos - Jugos de frutas envasados – Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba. Aprobado en 2007.
- b) Proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-173-SCFI-2008, - Jugos de frutas preenvasados – Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba. Aprobado el 3 de diciembre de 2008.
- c) Y a partir de agosto de 2009, se cuenta con la Norma Oficial Mexicana NOM-173-SCFI-2009, - Jugos de frutas preenvasados – Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba. 28 de Agosto de 2009.

A diferencia de las normas NMX anteriores, se llevó a cabo un trabajo exhaustivo en el cual se definen las características de la elaboración de los jugos; las referencias a consultar (Normas de apoyo); la clasificación de los productos; las especificaciones; el llenado; el muestreo; los métodos de prueba (actualizados tanto para la calidad como para la autenticidad); el envasado; el etiquetado; la evaluación de la conformidad y la vigilancia (ANEXO B). En este caso específico el subcomité aprobó la aplicación del método isotópico para determinar la autenticidad, como método de prueba para esta Norma.

En este trabajo se llevó a cabo la aplicación y validación del método isotópico (en azúcares y pulpa), utilizando la composición isotópica de carbono  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  (diferencia relativa entre la relación isotópica de carbono de una muestra y la relación isotópica de un patrón internacional, en este caso al VPDB Viena Pee Dee Belemnite Limestone) para determinar la autenticidad de los jugos preenvasados.

La aplicación y validación del método isotópico se realizó bajo las indicaciones de la EURACHEM Guide. The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, EURACHEM, (United Kingdom, First English Edition 1998) la cual indica que para la aplicación de un método analítico, es necesario verificar que sus parámetros (especificaciones con las que se describen los atributos de un producto) por analizar, sean los adecuados para resolver el problema particular.

Además para el desarrollo del presente trabajo, se aplicaron las normatividades nacionales (F-045-1982 “Jugo de Manzana”, F-44-1983 “Jugo de Uva” y F-118-1984 “Jugo de Naranja”) e internacionales (CODEX STAN 247-2005; Eurachem Guide; UNE-EN-12140:1997, PNE-ENV-13070 y Code of Practice, December 2005, publicados por la A. I. J. N. European Fruit Juice Association; A. O. A. C. Official Method 981.09 y A. O. A. C. Official Method 982.21), el diseño de experimentos, las herramientas de calidad, la metrología y la química, para dar certidumbre al juicio de autenticidad. Con lo que se podrá asegurar la autenticidad de los jugos de frutas preenvasados y por tanto que se cumpla con la calidad que satisfaga las necesidades de los consumidores.

## **II. HIPOTESIS.**

**Si la prueba de la relación de isótopos estables de carbono contenido en los azúcares (sólidos disueltos) y en la pulpa (sólidos no disueltos) de un jugo preenvasado, son capaces de determinar la autenticidad del mismo, a un nivel de confianza del 95.0 % del total de los azúcares, entonces se dará certidumbre para la aplicación de este método de prueba, en la Norma Oficial Mexicana NOM-173-SCFI-2009: “Jugos de frutas preenvasados, denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba”.**

### III. OBJETIVOS.

#### III.1. Objetivo General.

Implementar el método de prueba analítico para la determinación de la autenticidad de jugos preenvasados mediante la confirmación del cumplimiento de sus especificaciones de calidad, basado en la composición de los isótopos estables de carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ) de los azúcares y la pulpa.

Para lograr este objetivo, se realizaron las siguientes etapas:

##### a) **Validación del Método de Prueba.**

Validar el método de prueba analítico por medio de calibración (usando materiales de referencia), comparaciones (estudios colaterales con otros laboratorios) y la evaluación sistemática de los factores que tienen influencia en los resultados.

##### b) **Desarrollo del Método de Prueba.**

Implementar las técnicas analíticas para medir la composición isotópica de carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ) provenientes de los azúcares (sólidos solubles) y pulpa (sólidos no solubles) en los jugos de frutas de varias especies botánicas. Evaluar la repetibilidad y reproducibilidad del método.

Determinar la composición isotópica del carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ) de los azúcares (sólidos solubles) y pulpa (sólidos no solubles) de 66 muestras de jugos auténticos de 11 especies botánicas de frutas preparados en el laboratorio. Evaluar la variación natural de la composición isotópica de azúcares de las frutas de especies botánicas estudiadas.

Determinar la correlación entre la composición isotópica de la pulpa (sólidos no disueltos) y la de sus azúcares (sólidos disueltos).

Demostrar utilizando estadística multivariable (ANOVA) que la composición isotópica de la pulpa (sólidos no disueltos) de la frutas es indistinguible de la de sus azúcares (sólidos disueltos) para una muestra auténtica y puede utilizarse como patrón interno para mejorar la precisión del método analítico.

Determinar la composición isotópica del nitrógeno ( $\delta^{15}\text{N}$ ) de la pulpa de jugos de frutas auténticos así como de espesantes sintéticos utilizados en la industria alimenticia para fortalecer la determinación de la autenticidad de los jugos.

Determinar la composición isotópica de los edulcorantes exógenos: caña de azúcar y jarabe fructosado.

Implementar la ecuación para calcular el porcentaje de azúcares provenientes de la fruta en un jugo a partir de la composición isotópica de los azúcares (sólidos solubles), la pulpa (sólidos no solubles) y los edulcorantes exógenos.

Analizar el comportamiento de la composición isotópica de mezclas adulteradas artificialmente de jugos de naranja elaborados en el laboratorio de tal manera que para una concentración constante de azúcares totales (grados Brix) se tuvieran diferentes proporciones de azúcares de la fruta (naranja) y de los edulcorantes exógenos. Con la aplicación de estos resultados

podemos determinar y cuantificar los errores debidos al uso de los promedios de la composición isotópica de los azúcares provenientes de los jugos (plantas C<sub>3</sub>) y de los edulcorantes exógenos (plantas C<sub>4</sub>).

c) **Criterios de autenticidad.**

Establecer los criterios necesarios para que los resultados obtenidos puedan emplearse con la confianza necesaria en la toma de decisiones respecto a la autenticidad de los jugos de frutas preenvasados y puedan incluirse estos en la Norma Oficial Mexicana.

Establecer los procedimientos para control de calidad de los resultados.

Utilizar el método de prueba de la composición de los isótopos estables de carbono (<sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C) desarrollado como parte de la Norma Oficial Mexicana NOM-173-SCFI-2009, “Jugos de frutas preenvasados – Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba”.

#### IV. ANTECEDENTES.

Esta metodología tiene como objeto detectar la adición de edulcorantes industriales exógenos como son los detallados en el CODEX alimentarius para los azúcares (CODEX STAN 212-1999 enmienda 1-2) a los jugos de fruta industrializados provenientes de plantas C<sub>3</sub>, elaborados a partir de frutas sanas y maduras o preparados a partir de concentrados de fruta obtenidos por un proceso industrial de eliminación del agua contenida en los jugos. Este método no es aplicable para el caso de jugo de piña (debido a que la diferencia entre la composición isotópica de la piña y de los edulcorantes exógenos no es significativa).

Los azúcares exógenos que se consideraron como adulterantes en el mercado nacional de la producción de jugos fueron: caña de azúcar y jarabe fructosado.

La mayoría de los jugos de frutas que se encuentran en el mercado nacional, son jugos reconstituidos, preparados a partir de jugos concentrados. Es práctica común que, en la zonas de producción, las frutas colectadas se conviertan en jugos y a estos se les extraiga el agua para reducir el volumen y el costo de transporte a las zonas donde se industrializan. En la industria se reconstituyen a la concentración original adicionando agua, se pasterizan, envasan y venden como jugos naturales.

Aunque la legislación estipula que la cantidad de agua que se debe usar al reconstituir un jugo debe ser la misma que se extrajo al concentrar, no es posible obligar el cumplimiento de esta legislación. Más aún los lineamientos legales establecidos en la normas anteriores al 2009 son respecto a los mínimos permitidos de densidad relativa de los jugos o sea a su correspondiente valor de grados Brix. Esta legislación al permitir la dilución del concentrado y el ajuste de los grados Brix facilitaba la adición de azúcares exógenos de valores comerciales inferiores. Por tanto se requería la implementación de técnicas analíticas que pudieran detectar esta adulteración y modificar la norma vigente, en beneficio del consumidor final. En específico se requería de una técnica analítica que fuera competente para distinguir en un jugo de frutas de ciertos grados Brix, el porcentaje de los azúcares totales que provienen de la fruta misma y el porcentaje de azúcares que se adicionaron de edulcorantes exógenos de distinto origen como son el jarabe fructosado y/o la caña de azúcar.

En principio la composición de cada especie botánica de fruta y por tanto de su jugo puede definirse por un conjunto de parámetros físicos y químicos típicos: los perfiles de azúcares (glucosa, sacarosa y fructosa); la presencia de ciertos ácidos orgánicos y compuestos fenólicos; el contenido de minerales, aminoácidos etc. Sin embargo todos estos parámetros varían considerablemente debido tanto al grado de madurez de las frutas, a su variedad botánica, así como a las características del suelo y del clima de la región donde crecen las frutas. Los procesos industriales usados en la producción y envasado de los jugos pueden también afectar la composición de los parámetros mencionados. En Europa, la A. I. J. N. (Association of the Industry of Juices and Nectars from Fruits and Vegetables of the European Union) con el fin de proporcionar criterios para la interpretación de la autenticidad de jugos y néctares de fruta, publicó los intervalos de los parámetros mencionados anteriormente obtenidos a partir de una gran cantidad de muestras no adulteradas que representan las variaciones naturales de cada fruta.

Sin embargo los análisis isotópicos de carbón de los compuestos orgánicos de los jugos poseen la capacidad de detectar con alta precisión el porcentaje de los azúcares de un jugo cuyo origen es la fruta misma. Esto se logra por la precisión intrínseca del método y además porque es posible medir la composición isotópica de varios de los componentes orgánicos de la muestra de jugo (pulpa, azúcares y ácidos orgánicos) que son del mismo origen, es decir se formaron bajo las

mismas condiciones y a partir del mismo reservorio de carbono y tienen la misma huella isotópica. Es decir para cada muestra se tienen indicadores internos (pulpa, ácidos orgánicos) de su autenticidad que no se ve alterado por la adición de azúcares exógenos y cuya diferencia con respecto a otros componentes (azúcares) en las muestras auténticas da la referencia necesaria, que reduce considerablemente la incertidumbre debido a la variación natural. Lo anterior es válido para cualquier conjunto de moléculas orgánicas. (White, J. W. y Winters, K. (1989); White, J. W. (1992) y White, J. W., Winters K., Martin P. & Rossmann, A. (1998)).

Este método, es un Método de Análisis Oficial de la Association of Official Analytical Chemists (AOAC (995.17)) referencia página 140. Food Authenticity Issues and Methodologies. Eurofins Scientific. 1998. ISBN2-9512051-0-4.

#### IV.1. Fundamento Teórico.

El fundamento del método es la determinación de la relaciones isotópicas de carbono ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ). La abundancia relativa de los isótopos estables de carbono no es constante en la naturaleza, esto es debido a que la pequeña diferencia en sus masas atómicas provoca que en los procesos (físicos, químicos y biológicos) en donde participan se genere un enriquecimiento de un isótopo con respecto a otro dejando una huella isotópica.

Cabe hacer notar que las variaciones de la composición isotópica del  $^{13}\text{C}$  en la naturaleza son muy pequeñas por tanto se requieren para su determinación instrumentación y técnicas analíticas muy precisas. Las medidas de las relaciones isotópicas se determina por Espectrometría de Masas de Isótopos Estables, no como valores absolutos sino como una diferencia relativa entre la muestra y un patrón internacional el cual es un carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ) de origen marino proveniente de la formación cretácica Peedee de Carolina del Sur, conocido como PDB (Pee Dee Belemnite Limestone). La relación isotópica absoluta de  $(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{PDB}} = 0.0112372$  (fracción mol lo que equivale aproximadamente a 11 átomos de  $^{13}\text{C}$  por cada mil átomos de  $^{12}\text{C}$ ) y este valor se usa como el punto de referencia de las relaciones isotópicas de carbono. (Chang and Li, 1990 y Rosmann and Taylor, 1998). La abreviatura VPDB (Vienna Peedee Belemnite) se refiere al material de referencia distribuido por el Organismo Internacional de Energía Atómica con sede en Viena, Austria.

Esta diferencia relativa  $\delta$  expresada en partes per mil (‰) se define en la siguiente ecuación (Craig, 1957):

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

En la actualidad esta unidad es considerada como unidad internacional. (Glossary of Terms used in Expression of Relative Isotope Ratios and Gas Ratios. IUPAC Recommendations 2008. T. B. Coplen, January 16, 2008) y define la composición isotópica de una muestra.

La principal fuente del carbono contenido en las plantas es el bióxido de carbono atmosférico que fijan los cloroplastos en las hojas. Durante la fotosíntesis, las plantas discriminan la fijación del carbono 13 y el grado de esta discriminación o fraccionamiento isotópico depende de la enzima que la planta utiliza durante la fijación. Así las plantas se clasifican en tres grandes grupos dependiendo de los procesos fotosintéticos de la fijación del CO<sub>2</sub> atmosférico:

- a) Las plantas tipo C<sub>3</sub> (árboles en general y en específico frutales de naranja, manzana, limón, mango, guayaba, ciruela, chabacano, etc.) fijan el bióxido de carbono en el ciclo de Calvin a ribulosa-1,5 bifosfato (RuBP) usando la carboxilasa RuBP.
- b) Las plantas C<sub>4</sub>, como la caña de azúcar, el sorgo, el maíz y algunos pastos tropicales utilizan el ciclo de Hatch Slack y fijan el bióxido de carbono al fosfoenolpiruvato (PEP) utilizando la carboxilasa PEP.
- c) Las plantas denominadas CAM (Crasulacean Acid Metabolism) como los agaves, la vainilla y piña poseen los dos mecanismos anteriores (Lehninger, 1976).

La carboxilasa RuBP de las plantas C<sub>3</sub> discrimina en mayor proporción la fijación del carbono-13 y por lo tanto la  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  (huella isotópica) de sus compuestos orgánicos es menor que la de las plantas C<sub>4</sub> permitiendo de esta manera diferenciar mediante la  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  de una molécula orgánica el tipo de planta que le dio origen.

En menor grado existen también variaciones en las relaciones isotópicas de carbono entre las distintas moléculas orgánicas que se forman en la planta, sin embargo, estas diferencias son pequeñas y su contenido de carbono es muy semejante al de los primeros productos de asimilación y la huella isotópica de origen se mantiene. En general los compuestos orgánicos de las plantas C<sub>3</sub> tiene un intervalo natural entre - 24.0 ‰ y - 32.0 ‰ (dependiendo de la especie botánica de la planta, las condiciones climatológicas, posición geográfica, etc.), mientras que los compuestos orgánicos de las plantas C<sub>4</sub> tienen un intervalo natural de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  entre - 10.0 ‰ y - 15.0 ‰ (Bender, Margaret, 1971; Troughton, 1972).

Por lo tanto es posible cuantificar el grado de mezcla entre moléculas orgánicas provenientes de plantas C<sub>3</sub> y C<sub>4</sub> mediante una proporción lineal construida tomando como extremos, la composición isotópica  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  de cada una de ellas. En nuestro caso particular como los edulcorantes utilizados como azúcares exógenos para adulterar a los jugos (plantas C<sub>3</sub>) son el azúcar de caña y el jarabe fructosado ambos plantas C<sub>4</sub>, se puede calcular una curva de calibración de mezclas a partir de la  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  de los azúcares (sólidos solubles) en jugos de fruta y de la  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  de los azúcares exógenos.

#### IV.2. Diferencia entre la composición isotópica de azúcares y pulpa.

Cabe hacer notar que como se explicó con anterioridad, para aumentar la precisión de las determinaciones de la composición isotópica de carbono de los jugos de frutas con vistas a determinar su adulteración se pueden utilizar varios compuestos orgánicos como un patrón interno. Esto es, se determina en la misma muestra, la  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  en los azúcares (sólidos disueltos), así como la  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  de la pulpa (sólidos no solubles), ya que, ambos se formados en la planta a partir de los primeros carbohidratos (del mismo reservorio de carbono,) la diferencia de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  entre ellos es independiente de los factores climatológicos y solo depende de la diferencia entre los factores de

fraccionamiento isotópico asociados a la formación de cada molécula orgánica.

Lo anterior permite no solo mejorar la precisión de la determinación sino utilizar la pulpa de cada muestra como indicador de autenticidad .

### IV.3. Composición isotópica de nitrógeno.

El nitrógeno al igual que el carbono forma parte esencial de las plantas y se encuentra en ellas formando compuestos nitrogenados (aminoácidos, fitoproteínas, clorofila, fitohormonas, principalmente). Este se absorbe a través de la raíz en forma de nitratos, que son producto de la transformación del amoníaco, urea y nitritos por la acción microbiológica de las bacterias nitrificantes (Nitrosomonas y Nitrobacter) y bacterias (microorganismos diazótrofes) fijadoras de nitrógeno inorgánico de los suelos.

El nitrógeno tiene dos isótopos, el  $^{14}\text{N}$  y el  $^{15}\text{N}$  y sus relaciones también cambian en los ciclos naturales dejando huellas isotópicas que contienen información sobre ciertos procesos físico-químicos: por ejemplo el nivel trófico de los animales superiores en las cadenas alimenticias. El intervalo natural de  $\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$  que se ha observado en estudios de suelos agrícolas y suelos sin adición de fertilizantes sintéticos es de 0.00 ‰ a 10.00 ‰. (Coplen, T. B. *et al*, Compilation of Minimum and Maximum Isotope Ratios of Selected Elements in Naturally Occurring Terrestrial Materials and Reagents. U.S. Geological Survey Water-Resources Investigations Report. 01-4222. 2002).

## V. METODOLOGIA

Para validar y poder aplicar el método de prueba capaz de realizar la determinación de la autenticidad en jugos preenvasados por la confirmación de la evidencia objetiva del cumplimiento de sus especificaciones de calidad, basada en el método de prueba de la composición de los isótopos estables de carbono ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ), se cumplieron los siguientes lineamientos:

V.1. **Calibración** (usando patrones o materiales de referencia y estándares de trabajo).

V.2. **Comparaciones** (entre laboratorios).

V.3. **Evaluación sistemática** (de los factores que tienen influencia en los resultados ).

V.4. **Diseño del Método de Prueba.**

V.4.1. Implementación de la técnica analítica.

V.4.2. Validación del patrón interno.

V.1. **Calibración** (usando patrones o materiales de referencia y estándares de trabajo).

Los materiales de referencia son de vital importancia para poder detectar, cuantificar, calibrar y estandarizar los resultados. En el ANEXO C se muestra la lista de los materiales que han sido aprobados por el Subcomité de Medidas en Abundancia Isotópica (Subcommittee on Isotope Abundance Measurements, SIAM) perteneciente a la IUPAC y se adquieren en el Organismo Internacional de Energía Atómica (IAEA) o en el Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST).

La calibración del método, se llevó a cabo utilizando los materiales de referencia enunciados a continuación: IAEA-CH-7 (PEF1), NBS-22, IAEA-CH-6 USGS-25 y el USGS-26, realizando la determinación de la incertidumbre (parámetro no negativo que caracteriza la dispersión de los valores atribuidos a un mensurando, a partir de la información que se utiliza) de cada uno de ellos. Utilizando y siguiendo el método de prueba que se aplicó a todas las muestras.

Posterior a la medición de los materiales de referencia, se seleccionaron dos muestras de aminoácidos con valores extremos, que abarcan el intervalo natural de las sustancias orgánicas que se miden en el laboratorio, éstos aminoácidos se utilizaron como estándares de trabajo (referencias internas).

V.2. **Comparaciones** (entre laboratorios).

El laboratorio de Isótopos Estables del Instituto de Geología de la UNAM, participa cada año en un programa de control de calidad en técnicas isotópicas, el cual se describe a continuación:

Se denomina FIT-PTS (Food analysis using Isotopic Techniques – Proficiency Testing Scheme) por sus siglas en ingles, (Análisis de alimentos usando Técnicas Isotópicas - Esquema de Habilidad en las Pruebas).

Es este un esquema específico dedicado al análisis isotópico de alimentos que fue implementado por Eurofins Scientific en 1994, y ha continuado dentro de la estructura del Programa de Investigación Europeo (1996-1998) y llamado Análisis de Alimentos usando Técnicas Isotópicas (FIT). Desde 1999, este Esquema de Habilidad en las Pruebas (ahora llamado FIT-PTS) se extendió a todos los laboratorios que realizan análisis isotópicos alrededor del mundo, el cual representa las mediciones de los isótopos estables en los alimentos.

Organización y la evaluación de los datos: El FIT-PTS cumple con las normas ISO (International Standard Organization); IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry); AOAC (Association of Official Analytical Chemists), y el Protocolo Armonizado Internacional para la Habilidad en las Pruebas de laboratorios analíticos.

Los datos fueron evaluados por un comité científico de expertos, integrado por:

- - Dr. Claude Guillou (JRC Ispra, Italia)
- - Dr. Eric Jamin (Eurofins Scientifics, Francia)
- - Dr. Carsten Faulh-Hassek (BfR, Alemania)
- - Dr. Andrew Damant (FSA, Reino Unido)

Confidencialidad del nombre del laboratorio en el momento de la presentación de los resultados globales: Los laboratorios participantes envían los resultados al Dr. Claude Guillou al Joint Research Centre, Ispra (Italy) {Centro de Investigación Conjunta, Ispra (Italia)}, donde estos resultados son codificados antes de que se remitan al comité especialista para el tratamiento estadístico. Los datos estadísticos resultantes se regresan al JRC Ispra, para ser devueltos a cada uno de los laboratorios en forma individual.

Métodos Involucrados: los métodos y técnicas involucradas en las que participamos para el análisis de jugos, se presentan a continuación:

Referencia	Muestra	Fracción	Técnica	Isótopo
ENV 12140 (CEN/TC 174 N108)	Jugo de Fruta	Azúcares (Sólidos Disueltos)	IRMS	<sup>13</sup> C
Analytica Chimica Acta 340 (1997) 21-29	Jugo de Fruta	Pulpa (Sólidos no Disueltos)	IRMS	<sup>13</sup> C

Frecuencia: se envían las muestras a analizar tres veces por año. Cada laboratorio escoge las muestras que desea (o pueda) analizar dentro de un tiempo predeterminado (vigencia). La fecha tope para informar los resultados es de 2 meses después de haber sido enviadas las muestras. Un informe con los análisis estadísticos se envía a cada uno de los laboratorios inscritos dentro de los 2 meses siguientes. (Nota: no siempre envían muestras de jugos envasados en cada uno de los eventos).

El Análisis Estadístico: la evaluación de los datos se realiza según las normas de ISO / IUPAC / AOAC y el Protocolo Armonizado Internacional para la Habilidad de Pruebas de los laboratorios analíticos.

Los resultados individuales de los laboratorios se expresan como: "z-scores":

$$Z = \frac{(x - \hat{X})}{\sigma}$$

Donde:

- x es el resultado reportado por el laboratorio participante.
- $\hat{X}$  es el valor "verdadero" asignado al analito a determinar. En este ejercicio los valores asignados se toman como la media robusta de todos los resultados reportados.
- $\sigma$  es el valor designado para la desviación estándar. En este ejercicio los valores designados se derivan de los resultados reportados de todos los ensayos de colaboración.

Consideración:

-Si  $\hat{X}$  y  $\sigma$  son buenas estimaciones de la media poblacional y de la desviación estándar, y presentan distribuciones normales, entonces Z está normalmente distribuida con una media de cero (0) y una unidad (1) para la desviación estándar.

Así el "z-scores" puede interpretarse como sigue:

- $|Z| \leq 2$  "Satisfactorio": ocurrirá aproximadamente en el 95.0 % de los casos enviados.
- $2 < |Z| \leq 3$  "Cuestionable": ocurrirá aproximadamente en el 5.0 % de los casos enviados.
- $3 < |Z|$  "Poco satisfactorio": ocurrirá aproximadamente en el 0.3 % de los casos enviados.

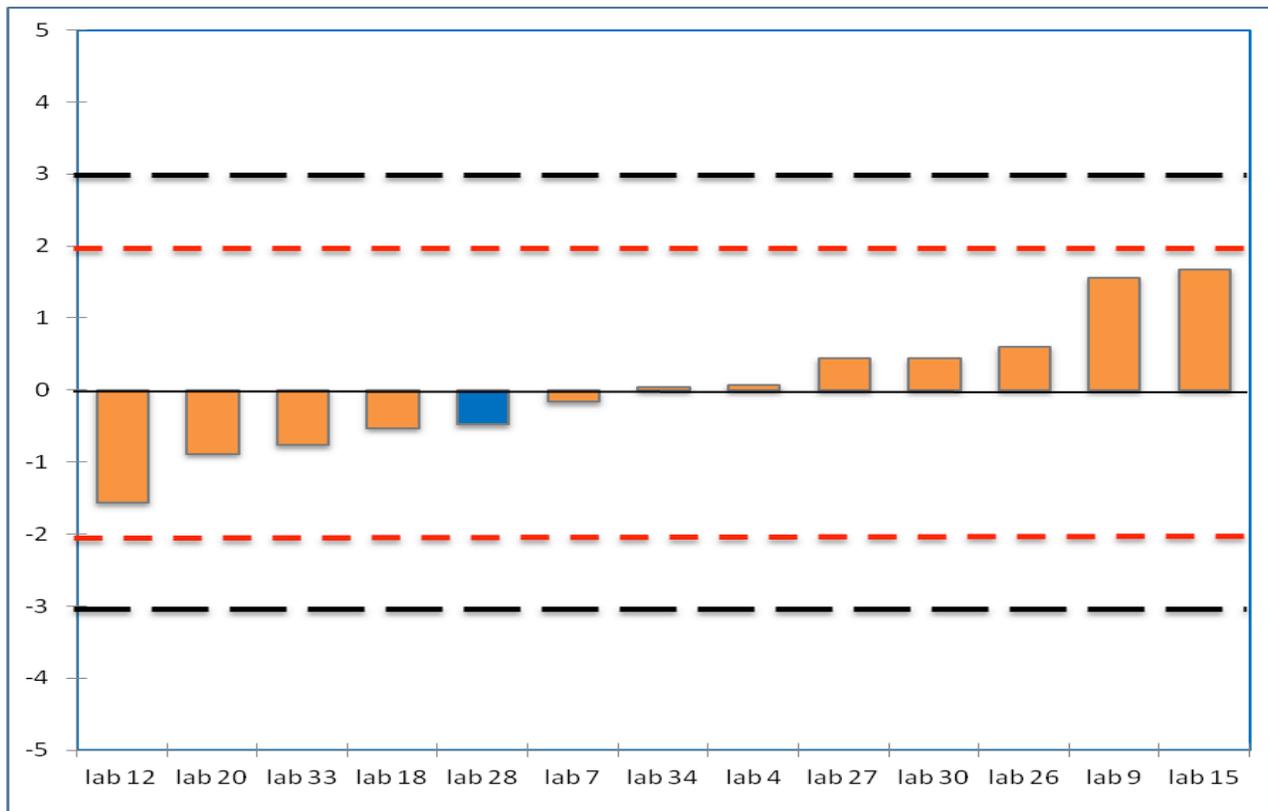
Un ejemplo de una representación gráfica de "z-scores", es la siguiente:

Z-scores of the FIT Proficiency Testing Scheme					
--	--	--	--	--	--

Round	Product:	Parameter:			
2006 Round 3	Fruit Juice	Sugars C <sup>13</sup>			
Laboratory Code	Sugars C <sup>13</sup>	Z-scores			
lab 12	-12.93	-1.56			
lab 20	-12.76	-0.88			
lab 33	-12.73	-0.76			
lab 18	-12.67	-0.52			
lab 28	-12.66	-0.48	LIE		
lab 7	-12.58	-0.16			
lab 34	-12.53	0.04			

lab 4	-12.52	0.08
lab 27	-12.43	0.44
lab 30	-12.43	0.44
lab 26	-12.39	0.60
lab 9	-12.15	1.56
lab 15	-12.12	1.68

Number of results:	13
Mean	-12.53
<b>Robust Mean</b>	<b>-12.54</b>
Standar Deviation	0.23
<b>Robust SD</b>	<b>0.20</b>
<b>Target SD</b>	<b>0.25</b>
Min:	-12.93
Max:	-12.12



Los resultados obtenidos en el periodo del año 2001 al año 2012 han sido “Satisfactorios” ( $|Z| \leq 2$ ), en los rubros de los análisis isotópicos de azúcares y pulpa en las muestras de jugos de

fruta comerciales, enviadas por los organizadores del programa (FIT-PTS), estos se reportan en la **Tabla 3** y **Tabla 4**, en el capítulo **VI.2. Análisis de Resultados**.

Mediante este rubro, se validan las metodologías analíticas desarrolladas, por medio de la evaluación independiente del desempeño técnico del laboratorio.

### V.3. **Evaluación sistemática** (de los factores que tienen influencia en los resultados).

#### **Precisión.**

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

Repetibilidad (de los resultados de mediciones).

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

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

Para los azúcares (sólidos disueltos) el límite de la repetibilidad es 0.21 ‰.

Para la pulpa el límite de la repetibilidad es 0.38 ‰.

Estos resultados son los que ha obtenido el Laboratorio de Isótopos Estables, del Instituto de Geología de la UNAM, a través del tiempo que lleva realizando este tipo de análisis (el promedio histórico de aproximadamente 13 años).

Lo que significa que si una muestra fuese enviada al laboratorio para un análisis de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ , existe una probabilidad del 95.0 % que el nuevo resultado de la muestra sometida estuviera en un intervalo de  $\pm 0.21$  ‰ para sólidos disueltos y de  $\pm 0.38$  ‰ para pulpa.

Reproducibilidad (de los resultados de las mediciones).

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

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

Para los azúcares (sólidos disueltos) el límite de la reproducibilidad es de  $\pm 0.25$  ‰.

Para pulpa el límite de la reproducibilidad es  $\pm 0.68$  ‰. ( $\pm 0.31$  ‰ a partir del 2011).

En este caso los límites de la reproducibilidad son los propuestos y aceptados en el Programa FIT – PTS anteriormente citado.

#### V.4. Diseño del Método de Prueba.

El diseño del método de prueba, para este trabajo y el de la Norma Oficial Mexicana NOM-173-SCFI-2009, se llevó a cabo, siguiendo los lineamientos de la norma ISO/IEC Directives, Part 2. Rules for the structure and drafting of International Standards. Fourth edition, 2001.

El método de prueba, se describe por completo en el numeral 8 de la Norma Oficial Mexicana NOM-173-SCFI-2009, Jugos de frutas preenvasados – Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba. (ANEXO B).

Aquí se describen brevemente los pasos más importantes utilizados en este trabajo y empleados en la Norma Oficial Mexicana NOM-173-SCFI-2009 que considero son:

##### V.4.1. Implementación de la técnica analítica.

- V.4.1.1. Procedimiento para la separación y preparación de azúcares y pulpas.
- V.4.1.2. Combustión y Purificación
- V.4.1.3. Medición en Espectrómetro de Masas.
- V.4.1.4. Normalización de Resultados.
- V.4.1.5. Materiales de Referencia y estándares de trabajo.

##### V.4.1.1. Procedimiento para la separación y preparación de los azúcares y de la pulpa para su análisis isotópico

Para separar físicamente los constituyentes de un jugo, en azúcares y pulpa, se toman 50.0 mL de jugo de fruta y se coloca en un tubo de centrifuga y se somete a una fuerza de al menos 1400 g durante 10 minutos.

##### V.4.1.1.a. Preparación de los azúcares para análisis isotópico.

Los sólidos solubles que son mayoritariamente azúcares después de la centrifugación anterior están contenidos en el sobrenadante, por lo que se decanta este sobrenadante y se colocan 40.0 mL de sobrenadante en un vaso de precipitados.

Se adiciona una solución de hidróxido de calcio al 25.0 %, para ajustar el pH entre 8.5 y 9.0 y se calienta la mezcla a 90.0 °C durante 10 minutos con agitación.

Los ácidos orgánicos, los aminoácidos y otros componentes se precipitan en este paso, para separarlos se centrifuga la solución durante 10 minutos a 1400 g.

Se decanta el sobrenadante y coloca en un vaso de precipitado, acidificando con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.0 M hasta pH = 5.0; esto es aproximadamente cuando la solución cambia de color y se verifica el pH colocando una gota en papel pH, cuidar de no introducir el papel pH en la muestra.

Se guarda en un refrigerador a 4.0 °C durante 12 horas y se decanta el sobrenadante líquido.

Finalmente se toma una alícuota del sobrenadante para el análisis isotópico de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ . La concentración aproximada en °Brix de los sólidos disueltos que contiene principalmente el jugo se mide con un refractómetro.

##### V.4.1.1.b. Preparación de la pulpa para análisis isotópico.

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

La pulpa se lava con agua destilada caliente a 90.0 °C, se coloca en el tubo de centrifuga, y se vuelve a centrifugar por otros 10 minutos a 1400 g. Se decanta el sobrenadante y se desecha; este paso se debe repetir cinco veces.

Se realiza un segundo lavado de la pulpa, con 40.0 mL de acetona, se centrifuga por 10 minutos a 1400 g, se decanta el sobrenadante y se desecha (este paso se debe repetir al menos dos veces). Una vez lavada la pulpa con agua y acetona, ésta se liofiliza ó se puede secar en un horno entre 60.0°C – 80.0°C durante toda la noche.

La pulpa seca se homogeniza, pulverizándola en un mortero de ágata. Finalmente se pesa una alícuota de la pulpa para determinar la  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ .

#### V.4.1.2. Combustión y purificación.

El objetivo de la técnica de combustión es transformar cuantitativamente el carbono proveniente de la materia orgánica (azúcar o pulpa) preparados de acuerdo IV.1.1.1.a. y IV.1.1.1.b. de las muestras de los jugos a bióxido de carbono  $\text{CO}_2$ . Posteriormente se separan los otros productos de la combustión y se purifica el bióxido de carbono  $\text{CO}_2$ , para medir su  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  en el Espectrómetro de Masas de Isótopos Estables.

Para realizar la combustión cuantitativa y purificación de la materia orgánica se emplea un analizador elemental acoplado a un Espectrómetro de Masas de Isótopos Estables este equipo realiza una combustión dinámica completa de la materia orgánica e inorgánica utilizando Helio como gas acarreador y un pulso de oxígeno que produce en la cápsula de estaño utilizada para contener la muestra (pulpa o azúcares) una reacción exotérmica con un punto de inflamación mayor a 1,800 °C. La columna de combustión se encuentra a una temperatura de 1,020 °C y contiene los reactivos necesarios para atrapar los óxidos de azufre formados, seguida de una columna de reducción que contiene cobre electrolítico para convertir los óxidos de nitrógeno formados en gas nitrógeno ( $\text{N}_2$ ), el agua formada en la combustión, se atrapa en una trampa [una columna que contiene perclorato de magnesio  $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ ] y una columna cromatográfica para separar los gases  $\text{CO}_2$  y  $\text{N}_2$  producto de la combustión. Al entrar a través de esta interfase al espectrómetro de masas de relaciones isotópicas es posible medir en una muestra la  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  y  $\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$ .

El analizador elemental en cuestión, permite la introducción simultáneamente del gas utilizado como patrón de trabajo. Los resultados obtenidos mediante esta técnica son confiables, pero para confirmarlo, es necesario analizar en serie con las muestras un conjunto de alícuotas de materiales de referencia para corregir cualquier desviación en la medición así como el uso de estándares de trabajo para monitorear la eficiencia de las columnas de combustión y reducción.

#### V.4.1.3. Medición en Espectrómetro de Masas.

El  $\text{CO}_2$  producto de la combustión de las muestras de azúcares y/o pulpa descrito en los numerales V.1.1.1.a. y V.1.1.1.b., es empleado para la determinación de las relaciones isotópicas de ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) mediante un Espectrómetro de masas Thermo Finnigan MAT 253 (Alemania) para la determinación de relaciones de isótopos estables con las siguientes características y factores de corrección, proporcionadas por el fabricante:

V.4.1.3.a. Capacidad analítica para determinar la  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  en el intervalo de

abundancias naturales en CO<sub>2</sub> con una precisión interna del orden de 0.02 ‰ (es definida aquí como la diferencia entre dos medidas de relaciones isotópicas consecutivas de una muestra de CO<sub>2</sub>) y la precisión externa de 0.05 ‰ por nanoamper de corriente de iones. Durante la operación del espectrómetro, las mesetas de los picos para colector universal CNOS debe ser  $m/\Delta m = 95$  (10% valle).

V.4.1.3.b. Sistema de introducción dual para determinaciones simultáneas entre el gas muestra y el gas de un patrón de trabajo y capaz de realizar las determinaciones isotópicas mediante lecturas simultáneas de las correspondientes intensidades de los haces de iones de las masas moleculares 44 y 45, (<sup>13</sup>C<sup>16</sup>O<sup>16</sup>O y <sup>12</sup>C<sup>16</sup>O<sup>16</sup>O ) suma de cada uno de los gases corregidas por contenido de <sup>17</sup>O (Santrock, et al 1985).

V.4.1.3.c. Correcciones por efecto: de presión, de masas parásitas, efecto de memoria, gas residual, mezcla de gases por cambio de válvulas y por abundancia isotópica, (Mook, W.G. y Grootes, P.M., 1973).

V.4.1.3.d. Calibración del CO<sub>2</sub> utilizado como patrón interno con respecto al patrón internacional VPDB para que resultado de los análisis se obtengan directamente en unidades de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  en la escala VPDB.

#### V.4.1.4. Normalización de Resultados.

Para asegurar y mejorar la precisión de los análisis isotópicos realizados se normalizan estos de acuerdo a la recomendación de la IUPAC de 2005 con patrones internacionales que cubren la escala de valores de las muestras que se están analizando. Para el caso de jugos de fruta, los materiales de referencia que se utilizaron fueron el IAEA-CH7 (polietileno), NBS 22 (aceite) y el IAEA-CH6 (sacarosa).

Para cada conjunto de 20 muestras que se analizan se preparan cinco patrones internacionales: dos para establecer la escala de medición y otros 3 para comprobar la linealidad del sistema de medición. Se calcula estadísticamente una regresión por mínimos cuadrados con los resultados experimentales de los patrones internacionales obtenidos en el espectrómetro de masas. Si el coeficiente de correlación lineal  $R^2$  es menor o igual a 0.99 no se aceptan los resultados de la corrida. Sin embargo cuando la correlación entre los patrones cumple las especificaciones, los valores de su composición isotópica se utilizan para normalizar o corregir las muestras analizadas ajustándolas a la recta calculada con los valores certificados de los patrones.

#### V.4.1.5. Materiales de Referencia y estándares de trabajo.

Los materiales de referencia son de vital importancia para poder detectar, cuantificar, calibrar y estandarizar los resultados que se obtienen en el Espectrómetro de masas. En el ANEXO C se muestra la lista de los materiales que han sido aprobados por el Subcomité de Medidas en Abundancia Isotópica (Subcommittee on Isotope Abundance Measurements, SIAM) de la IUPAC y se adquieren en el Organismo Internacional de Energía Atómica (IAEA International Atomic Energy Agency) o a través del National Institute of Standards and Technology (NIST).

Los materiales de referencia para calibrar el CO<sub>2</sub> y el N<sub>2</sub> que se utilizarán como estándares de trabajo y determinar  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ , la  $\delta^{18}\text{O}_{\text{VPDB}}$  y la  $\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$  son el IAEA-CH-7 (PEF1), NBS-22, IAEA-CH-6 USGS-25 y el USGS-26 normalizados de acuerdo a Tyler Coplen (1988 y 2006). También pueden utilizarse como estándares de trabajo un tanque de CO<sub>2</sub> calibrado o un tanque de N<sub>2</sub>

calibrado, como por ejemplo los fabricados por Oztech Trading Corporation.

Con respecto a los estándares de trabajo, se seleccionaron dos muestras de aminoácidos con valores extremos, que abarcan el intervalo natural de las sustancias orgánicas que se miden generalmente en el laboratorio, estos son la Glicina y la L-Serina (marca Sigma, grado reactivo) que se utilizan cada 10 muestras, alternados para verificar la calidad de la combustión y reducción de las columnas del analizador elemental.

#### V.4.2. Validación del patrón interno.

##### Patrón Interno.

El determinar la variación natural de los azúcares provenientes de una fruta en particular no es suficiente para determinar la autenticidad de la misma, además se requiere tener un gran banco de datos para poder caracterizar una fruta. Actualmente se busca correlacionar el valor de la  $\delta^{13}C_{VPDB}$  de los azúcares con otras moléculas orgánicas generadas por la planta original y que se hayan formado al mismo tiempo, y que indiquen el origen de los azúcares como lo son la pulpa, los ácidos orgánicos, que pueden ser utilizados como patrones internos. (Schmith, 1993; Rossman, 1997; Guillou, 1999). Recientemente las investigaciones relacionadas con detectar autenticidad en productos naturales se han abocado a desarrollar la metodología para poder medir la composición isotópica no sólo de uno, sino de varios patrones internos dentro de un producto (ácidos orgánicos y/o perfil de azúcares).

En el caso de los ácidos orgánicos presentes en las frutas, las normas sanitarias en México permiten su uso (adición) en la industria alimentaria como acidulantes, amortiguadores de pH (ácido cítrico, ácido málico, ácido tartárico y citrato de sodio) y como antioxidantes (Ácido L-ascórbico y sus sales de sodio y calcio) de acuerdo a las B. P. F. (Buenas Prácticas de Fabricación), por lo que realizar un perfil de  $\delta^{13}C_{VPDB}$  de ácidos orgánicos, se vería alterado, pero es otra opción de demostrar la autenticidad de los jugos de fruta.

En un futuro se ve la posibilidad de determinar la  $\delta^{13}C_{VPDB}$  en los azúcares individuales (glucosa, sacarosa y fructosa) mediante un cromatógrafo de líquidos acoplado a una interfase que realiza una combustión por vía húmeda.

##### $^{15}N_{AIR}$ de frutas naturales.

Al observar los análisis isotópicos de carbono y nitrógeno de pulpas provenientes de algunos de los jugos comerciales, se encontró que aunque las  $\delta^{13}C_{VPDB}$  se encontraban dentro del intervalo natural de las frutas de plantas  $C_3$ , en cuanto al nitrógeno ( $N_2$ ), no se pudo analizar su composición isotópica ya que no se detectó su presencia.

Por tanto se procedió a analizar algunos espesantes utilizados por la industria alimentaria, presentados en la **Tabla 12**.

## VI. DESARROLLO EXPERIMENTAL.

Para lograr los objetivos descritos, se realizó el análisis de las relaciones de los isótopos de carbono ( $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ ) en los materiales de referencia, los estándares de trabajo, las muestras comerciales de jugos de fruta preenvasados enviadas por el programa FIT-PTS (Food analysis using Isotopic Techniques – Proficiency Testing Scheme) y los cuatro grupos de muestras utilizadas en este trabajo: muestras auténticas de jugos de frutas de distintas especies botánicas; muestras auténticas de caña de azúcar y jarabe fructosado; muestras de mezclas artificiales de jugos de naranja adulterados en el laboratorio con diferentes concentraciones de azúcares exógenos (caña de azúcar y jarabe fructosado) y jugos de frutas preenvasados que se comercializaban en el mercado nacional en el período de 2002 a 2006.

### VI.1. Calibración (usando patrones o materiales de referencia y estándares de trabajo).

Se llevó a cabo utilizando los materiales de referencia enunciados a continuación: IAEA-CH-7 (PEF1), NBS-22, IAEA-CH-6 USGS-25 y el USGS-26, realizando la determinación de la incertidumbre (parámetro no negativo que caracteriza la dispersión de los valores atribuidos a un mensurando, a partir de la información que se utiliza) de cada uno de ellos. Siguiendo el método de prueba que se aplicó a todas las muestras. Cada vez que se lleva a cabo la medición de un lote de muestras orgánicas (pulpas y azúcares), se colocan al inicio de la corrida estos materiales de referencia. **Tabla 5.**

Posterior a la medición de los materiales de referencia, se seleccionaron dos muestras de aminoácidos con valores extremos, que abarcan el intervalo natural de las sustancias orgánicas que se miden en el laboratorio, éstos aminoácidos se utilizaron como estándares de trabajo (referencias internas). Cada vez que se realiza la medición de un lote de muestras orgánicas, se colocan los aminoácidos (Glicina y L-Serina, marca Sigma, grado reactivo) alternados cada diez muestras, lo que nos permitió verificar la calidad de la columna de combustión y de la columna de reducción del analizador elemental. **Tabla 6.**

### VI.2 Comparaciones (entre laboratorios).

Las muestras (10 jugos de fruta preenvasados comerciales europeos) enviadas por el programa FIT-PTS (Food analysis using Isotopic Techniques – Proficiency Testing Scheme), durante el período en el que se realizó este trabajo experimental (2002\_R1 a 2006\_R3), se analizaron por el mismo método analítico que las muestras auténticas de jugos de fruta, muestras auténticas de edulcorantes exógenos, muestras de mezclas experimentales y muestras de jugos comerciales. Los resultados de estos análisis se presentan en la **Tabla 7** y **Tabla 8.**

### VI.3. Muestras auténticas de jugos de fruta.

Se prepararon en el laboratorio 66 jugos de frutas de 11 diferentes especies botánicas colectadas en diferentes épocas del año y de distintos productores para tener la representatividad de

la producción nacional en el estudio; a cada jugo se le determinó la composición isotópica de carbono ( $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ ) de los azúcares (sólidos disueltos) y de la pulpa (sólidos no solubles). Con los resultados obtenidos se evaluó la variación natural de la  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  de los azúcares y pulpas presentes en los jugos naturales, por efectos climatológicos y de origen botánico de la fruta, así como la correlación entre la composición isotópica de los azúcares y de la pulpa de cada una de las frutas. Con los datos obtenidos se validó el uso de la pulpa como patrón interno mediante un estudio de correlación lineal y estadística multivariable (ANOVA). Los resultados se encuentran en la **Tablas 9, 10 y 11** y **Figuras 1, 2, 3, 4 y 5**.

**Tabla 1.** Descripción de las especies de fruta con la que se prepararon las muestras auténticas de jugos de fruta.

<b>FRUTA</b>	<b>Número de Muestras</b>	<b>Número de Análisis</b>
<b>Durazno</b>	<b>1</b>	<b>2</b>
<b>Guayaba</b>	<b>1</b>	<b>2</b>
<b>Jitomate</b>	<b>1</b>	<b>2</b>
<b>Mandarina</b>	<b>5</b>	<b>10</b>
<b>Mango</b>	<b>2</b>	<b>4</b>
<b>Manzana</b>	<b>1</b>	<b>2</b>
<b>Naranja</b>	<b>24</b>	<b>48</b>
<b>Piña</b>	<b>19</b>	<b>38</b>
<b>Tamarindo</b>	<b>1</b>	<b>2</b>
<b>Toronja</b>	<b>7</b>	<b>14</b>
<b>Uva</b>	<b>4</b>	<b>8</b>
<b>TOTAL</b>	<b>66</b>	<b>132</b>

#### VI.4. Muestras auténticas de edulcorantes exógenos.

Se realizaron, así mismo, 34 análisis isotópicos de carbono ( $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ ) de los dos edulcorantes, utilizados comúnmente en la industria de los jugos: 17 muestras de caña de azúcar y 17 muestras de jarabe fructosado para obtener el intervalo de variación natural de los mismos. Los resultados se encuentran en la **Tabla 13** y **Figura 6**.

**Tabla 2.** Descripción de las muestras auténticas de edulcorantes exógenos.

<b>Edulcorantes Exógenos</b>	<b>Número de Muestras</b>	<b>Número de Análisis</b>
<b>Caña de Azúcar</b>	<b>17</b>	<b>17</b>
<b>Jarabe fructosado</b>	<b>17</b>	<b>17</b>
<b>TOTAL</b>	<b>34</b>	<b>34</b>

A partir de los resultados obtenidos de las muestras auténticas de jugos de frutas y de las muestras auténticas de edulcorantes exógenos, se obtuvieron los valores para introducirlos en la

ecuación 2 (Ec. 2) y así poder determinar en un jugo de frutas el porcentaje de azúcares provenientes de la fruta misma a partir del valor de su composición isotópica de carbono.

Cuando a partir de 2 componentes (azúcares de plantas C<sub>3</sub> y C<sub>4</sub>) se prepara una mezcla es posible calcular el porcentaje % de uno de los componentes en la mezcla si se conoce el valor de la composición isotópica de cada uno de los componentes. Es decir se puede calcular el % de azúcares de plantas C<sub>3</sub> en una mezcla (jugo analizado) mediante la  $\delta^{13}C_{VPDB}$  azúcares auténticos de plantas C<sub>3</sub> y la  $\delta^{13}C_{VPDB}$  azúcares auténticos de plantas C<sub>4</sub>.

$$\%Fruta = \frac{(\delta^{13}C_{azúcares-jugo\_analizado} - \delta^{13}C_{azúcares-auténticos\ planta C_4})}{(\delta^{13}C_{azúcares-auténticos\ planta C_3} - \delta^{13}C_{azúcares-auténticos\ plantas C_4})} * 100$$

(Ec. 2)

Es importante hacer notar que formalmente la relación obtenida en principio es sólo un porcentaje sin unidades, se utiliza % de Fruta, ya que esto es el significado que tiene.

#### VI.5. Muestras de mezclas experimentales.

Para evaluar los resultados que se obtuvieron de la ecuación 2 (Ec. 2) y calcular el error que se introduce al utilizar promedios en lugar de valores específicos de cada edulcorante, se prepararon 16 jugos de naranja adulterados en el laboratorio con caña de azúcar y jarabe fructosado en dos grupos distintos.

En cada grupo se prepararon varias mezclas cuya concentración de azúcares o valor en grados Brix variaban (10.0, 12.0, y 14.0) y otras mezclas tenían aproximadamente el valor en grados Brix del jugo de naranja original, pero que tuvieran diferentes proporciones de azúcares exógenos (desde el 20.0 % hasta 83.3 %, los azúcares exógenos se agregaron en solución acuosa, 36.8 °Brix para el azúcar de caña y 27.2 °Brix para el jarabe fructosado). Estos datos se utilizaron para observar el comportamiento de los resultados y obtener una curva de calibración de autenticidad o adulteración. Los resultados se encuentran en las **Tablas 15 y 16** y en la **Figura 7**.

**Tabla 3.** Descripción de las muestras de mezclas experimentales.

FRUTA	Caña de Azúcar	Grados Brix			Jarabe fructosado	Grados Brix		
		10.0	12.0	14.0		10.0	12.0	14.0
Naranja	☑	1	6	1	☑	1	6	1
<b>TOTAL</b>	<b>1</b>	<b>8</b>			<b>1</b>	<b>8</b>		

#### VI.6. Muestras comerciales de jugos de fruta.

Se analizaron 214 muestras de jugos preenvasados comercialmente de 14 frutas con el fin de analizar si existe un fraccionamiento isotópico asociado a la industrialización de los jugos y conocer

la adulteración que existe en el mercado nacional y así validar la metodología desarrollada. Los resultados se encuentran en la **Tabla 19** y **Figura 8, 9, 10** y **11**.

**Tabla 4.** Descripción de los jugos preenvasados comercialmente por especie de fruta y número de muestras.

<b>JUGO ENVASADO COMERCIAL DE:</b>	<b>Número de muestras:</b>	<b>Número de Análisis</b>
<b>CEREZA</b>	<b>2</b>	<b>2</b>
<b>CIRUELA</b>	<b>2</b>	<b>4</b>
<b>CIRUELA PASA</b>	<b>1</b>	<b>2</b>
<b>DURAZNO</b>	<b>5</b>	<b>10</b>
<b>FRESA</b>	<b>1</b>	<b>2</b>
<b>GUAYABA</b>	<b>13</b>	<b>26</b>
<b>LIMON</b>	<b>2</b>	<b>4</b>
<b>MANDARINA</b>	<b>3</b>	<b>6</b>
<b>MANGO</b>	<b>11</b>	<b>19</b>
<b>MANZANA</b>	<b>46</b>	<b>49</b>
<b>NARANJA</b>	<b>63</b>	<b>119</b>
<b>TAMARINDO</b>	<b>2</b>	<b>4</b>
<b>TORONJA</b>	<b>27</b>	<b>53</b>
<b>UVA</b>	<b>36</b>	<b>37</b>
<b>TOTAL DE JUGOS ANALIZADOS</b>	<b>214</b>	
<b>TOTAL DE ANALISIS REALIZADOS</b>		<b>337</b>

## VII. ANALISIS DE RESULTADOS.

### VII.1. Calibración (usando patrones o materiales de referencia y estándares de trabajo).

Los resultados de la calibración del método, se presentan a continuación en los siguientes materiales de referencia aprobados por la IUPAC: IAEA-CH-7 (PEF1), NBS-22, IAEA-CH-6 USGS-25 y el USGS-26, realizando la determinación de la incertidumbre (parámetro no negativo que caracteriza la dispersión de los valores atribuidos a un mensurando, a partir de la información que se utiliza) de cada uno de ellos. Siguiendo el método de prueba que se aplicó a todas las muestras.

Cada vez que se lleva a cabo la medición de un lote de muestras orgánicas (pulpas y azúcares), se colocan al inicio de la corrida estos materiales de referencia. Se realiza la determinación de la incertidumbre, siguiendo los lineamientos del “Isotope Hydrology Laboratory of Water Resources Programme”, perteneciente al Organismo Internacional de Energía Atómica (IAEA). **Tabla 5.**

**Tabla 5.** Parámetros de evaluación para materiales de referencia.

<b>Materiales de Referencia</b>	<b>USGS25</b> $\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}} (\text{‰})$	<b>USGS26</b> $\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}} (\text{‰})$	<b>PEF1</b> $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}} (\text{‰})$	<b>NBS22</b> $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}} (\text{‰})$	<b>IAEACH6</b> $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}} (\text{‰})$
<b>Resultados Experimentales</b>	-30.33	53.80	-32.14	-30.04	-10.45
	-30.38	53.77	-32.24	-29.99	-10.46
	-30.37	53.77	-32.20	-29.97	-10.46
	-30.43	53.74	-32.18	-29.97	-10.48
	-30.39	53.76	-32.18	-30.02	-10.42
	-30.40	53.76	-32.22	-29.96	-10.46
	-30.32	53.80	-32.25	-29.92	-10.46
	-30.40	53.75	-32.24	-29.93	-10.46
	-30.40	53.76	-32.22	-29.95	-10.46
	-30.41	53.75	-32.17	-30.01	-10.45
	-30.38	53.77	-32.19	-29.99	-10.41
	-30.37	53.77	-32.19	-29.99	-10.48
	-30.36	53.82	-32.11	-30.04	-10.40
	-30.41	53.72	-32.14	-30.04	-10.45
	-30.41	53.72	-32.16	-30.02	-10.45
	-30.39	53.76	-32.13	-30.12	-10.40
	-30.41	53.75	-32.15	-30.03	-10.45
	-30.34	53.78	-32.17	-30.01	-10.45

	-30.42	53.75	-32.16	-30.02	-10.45
	-30.42	53.70	-32.11	-30.01	-10.46
	-30.33	53.79	-32.15	-30.03	-10.46
	-30.41	53.75	-32.19	-29.98	-10.40
	-30.41	53.77	-32.20	-30.03	-10.35
	-30.40	53.74	-32.19	-29.99	-10.45
	-30.41	53.62	-32.14	-30.04	-10.45
	-30.42	53.73	-32.14	-30.04	-10.45
	-30.41	53.70	-32.14	-30.06	-10.44
	-30.45	53.73	-32.15	-30.03	-10.45
<b>Determinación de la incertidumbre</b>					
	<b>USGS25</b>	<b>USGS26</b>	<b>PEF1</b>	<b>NBS22</b>	<b>IAEACH6</b>
<b>Valor del Certificado</b>	-30.41	53.75	-32.15	-30.03	-10.45
<b>1<math>\sigma</math> del certificado</b>	0.27	0.24	0.09	0.08	0.07
<b>X Experimental</b>	-30.39	53.75	-32.17	-30.01	-10.44
<b><math>\sigma</math> Experimental</b>	0.03	0.04	0.04	0.04	0.03
<b>MAX</b>	-30.32	53.82	-32.11	-29.92	-10.35
<b>MIN</b>	-30.45	53.62	-32.25	-30.12	-10.48
<b>Diferencia</b>	0.13	0.20	0.14	0.20	0.13
<b>N</b>	28	28	28	28	28
<b>'u<sub>c</sub></b>	0.25	0.25	0.20	0.20	0.20
<b>Ese</b>	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
<b>c-ese</b>	0.05	0.05	0.04	0.04	0.04
<b>u_lab</b>	0.05	0.05	0.04	0.04	0.04
<b>Indicador de Concordancia (aceptado si el valor es <math>\leq 0.2</math>)</b>	0.1	0.0	0.2	0.2	0.1
<b>X experimental – Valor Certificado</b>	-0.02	0.00	0.02	-0.02	-0.01

Interpretación de los parámetros de evaluación, enumerados en la **Tabla 5**:

- Valor del Certificado: Es el valor de la relación isotópica que se encuentra descrito en el certificado del NIST o de la IAEA, así como la desviación estándar  $\sigma$ .
- $\sigma$ : desviación estándar descrita en el certificado del NIST o de la IAEA.
- n: es el número de muestras considerado.
- $u_c$ : es el valor de la incertidumbre combinada, con que cualquier laboratorio que mide  $\delta^{13}C_{VPDB}$  en el mundo debe reportar.
- ese: (error estándar estimado)  $\sigma/n^2$ .
- c-ese: es el cociente de la incertidumbre combinada entre el número de muestras al cuadrado ( $u_c/n^2$ ).
- $u_{lab}$ : valores máximos de “ese” y “c-ese”, como un indicativo del valor de la incertidumbre combinada del valor promedio.
- Indicador de concordancia (si el valor es  $\leq 2$ ) = Valor Absoluto (Valor Promedio Experimental - Valor del certificado) /  $\sqrt{(u_{lab}^2 + \sigma \text{ del certificado}^2)}$ .
- Diferencia del Promedio Experimental y el Valor del certificado. El cual debe ser menor a 0.2 ‰.

Como se observa en la **Tabla 5**, los resultados de los cinco materiales de referencia cumplen con la condición del indicador de concordancia que indica que el valor absoluto del resultado debe ser menor o igual a 0.2 en el caso del valor de la  $\delta^{13}C_{VPDB}$  y menor o igual a 0.25 en el caso del valor de la  $\delta^{15}N_{AIR}$ , que son los valores de la incertidumbre combinada con el que cualquier laboratorio que mide relaciones isotópicas de carbono y nitrógeno, debe reportar.

Por lo que el Laboratorio de Isótopos Estables del Instituto de Geología de la UNAM, cumple con lo establecido para la incertidumbre combinada ( $u_c$ ), para la calibración del método isotópico.

Posterior a la medición de los materiales de referencia, se colocan dos muestras de aminoácidos con valores extremos, que abarcan el intervalo natural de las sustancias orgánicas que se miden en el laboratorio, éstos aminoácidos se utilizaron como estándares de trabajo (referencias internas). Cada vez que se realiza la medición de un lote de muestras orgánicas, se colocan los aminoácidos (Glicina y L-Serina, marca Sigma, grado reactivo) alternados cada diez muestras, lo que permite verificar la calidad de la columna de combustión y de la columna de reducción del analizador elemental. Se realiza la determinación de la incertidumbre, siguiendo los lineamientos del “Isotope Hydrology Laboratory of Water Resources Programme” perteneciente al Organismo Internacional de Energía Atómica. **Tabla 6**.

**Tabla 6.** Parámetros de evaluación para estándares de trabajo (referencias internas):

Estándares de Trabajo (Referencias Internas)	Glicina Sigma (grado reactivo)		L-Serina Sigma (grado reactivo)		Jugo de Mandarina (Muestra Auténtica)		
	$\delta^{15}N_{AIR}$ (‰)	$\delta^{13}C_{VPDB}$ (‰)	$\delta^{15}N_{AIR}$ (‰)	$\delta^{13}C_{VPDB}$ (‰)	$\delta^{13}C_{VPDB}$ (‰) azúcares	$\delta^{13}C_{VPDB}$ (‰) pulpa	$\delta^{15}N_{AIR}$ (‰) pulpa
Resultados Experimentales	1.39	-42.85	-7.99	-6.76			
	1.63	-42.69	-7.81	-6.66			
	1.39	-42.86	-7.85	-6.69			

	1.40	-42.82	-7.86	-6.95			
	1.48	-42.89	-8.01	-6.79			
	1.25	-42.91	-7.75	-6.79			
	1.30	-42.73	-7.97	-6.88			
	1.62	-42.90	-7.92	-6.85			
	1.56	-42.77	-7.97	-6.88			
	1.42	-42.84	-7.94	-6.68	-28.34	-28.62	3.46
	1.34	-42.90	-7.92	-6.77	-28.34	-27.99	3.56
	1.42	-42.99	-8.06	-6.73	-28.31	-28.24	3.26
	1.47	-42.82	-7.89	-6.73	-28.33	-28.13	3.30
	1.45	-42.84	-7.88	-6.66	-28.34	-28.05	3.34
	1.44	-42.93	-7.89	-6.67	-28.35	-28.24	3.43
<b>Determinación de la Incertidumbre</b>							
	<b>Glicina, Sigma</b>		<b>L-Serina Sigma</b>		<b>Jugo de Mandarina</b>		
	$\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$	$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$	$\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$	$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$	$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$	$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$	$\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$
<b>1<math>\sigma</math> propuesto</b>	0.25	0.20	0.25	0.20	0.21	0.38	0.25
<b>Promedio</b>	1.44	-42.85	-7.91	-6.77	-28.33	-28.21	3.39
<b><math>\sigma</math> Experimental</b>	0.11	0.08	0.08	0.09	0.01	0.22	0.11
<b>MAX</b>	1.63	-42.69	-7.75	-6.66	-28.31	-27.99	3.56
<b>MIN</b>	1.25	-42.99	-8.06	-6.95	-28.35	-28.62	3.26
<b>Diferencia</b>	0.38	0.30	0.31	0.29	0.04	0.63	0.30
<b>N</b>	15	15	15	15	6	6	6
<b>'u<sub>c</sub></b>	0.25	0.20	0.25	0.20	0.20	0.20	0.25
<b>Ese</b>	0.03	0.02	0.02	0.02	0.01	0.09	0.05
<b>c-ese</b>	0.06	0.05	0.06	0.05	0.08	0.08	0.10
<b>u_lab</b>	0.06	0.05	0.06	0.05	0.08	0.09	0.10

Por los valores obtenidos y reportados en la **Tabla 6**, se tiene una repetibilidad para los estándares de trabajo utilizados que son las siguientes: Glicina de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}} = -42.85 \pm 0.08$  y de  $\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}} = 1.4 \pm 0.11$  y para la L - Serina de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}} = -6.77 \pm 0.09$  y de  $\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}} = -7.91 \pm 0.08$ .

Así mismo se muestra la repetibilidad obtenida en el laboratorio de los resultados del análisis de una muestra de jugo de mandarina realizada por triplicado, la cual es de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  azúcar =  $-28.33 \pm 0.01$ ; de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  pulpa =  $-28.21 \pm 0.22$  y de  $\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}} = 3.39 \pm 0.11$ .

## VII.2 Comparaciones (entre laboratorios).

Las muestras de 10 jugos de fruta preenvasados comerciales enviadas por el programa FIT-PTS (Food analysis using Isotopic Techniques – Proficiency Testing Scheme), durante el período en el que se realizó este trabajo experimental (2002\_R1 a 2006\_R3), se analizaron por el mismo método

analítico que las muestras de jugos y de azúcares exógenos. Los resultados de estos análisis, así como de los precedentes y posteriores se presentan en la **Tabla 7** y **Tabla 8**.

Mediante este rubro, se validan las metodologías analíticas desarrolladas, por medio de la evaluación independiente del desempeño técnico del laboratorio.

**Tabla 7.** Resultados de los análisis de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  en azúcares, realizados en el Laboratorio de Isótopos Estables del Instituto de Geología de la UNAM.

Período	Muestra	$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ azúcar	Z-score	Tarjet SD	Media Robusta	Diferencia del resultado vs tarjet value
PTS_2001_R1	Jugo de Piña	-12.91	-0.44	0.25	-12.80	-0.11
PTS_2002_R1	Jugo de Naranja	-25.20	0.00	0.25	-25.22	0.02
PTS_2002_R3	Jugo de Manzana	-25.84	0.52	0.25	-25.97	0.13
PTS_2003_R1	Jugo de Piña	-13.34	-0.23	0.25	-13.28	-0.06
PTS_2003_R3	Jugo de Uva	-26.19	0.26	0.25	-26.25	0.06
PTS_2004_R1	Jugo de Uva	-26.18	-0.10	0.25	-26.15	-0.03
PTS_2004_R3	Jugo Multifrutas	-25.18	-0.51	0.25	-25.05	-0.13
PTS_2005_R1	Jugo de Piña	-25.59	-0.60	0.25	-25.44	-0.15
PTS_2005_R3	Jugo de Manzana	-26.61	-0.08	0.25	-26.59	-0.02
PTS_2006_R1	Jugo de Uva	-26.11	-0.10	0.25	-26.09	-0.02
PTS_2006_R3	Jugo de Piña	-12.66	-0.48	0.25	-12.54	-0.12
PTS_2007_R1	Jugo de Uva	-26.10	-0.41	0.25	-26.00	-0.10
PTS_2007_R3	Jugo Frutas	-24.04	-0.20	0.25	-23.98	-0.06
PTS_2008_R1	Jugo de Naranja	-25.96	-0.68	0.25	-25.79	-0.17
PTS_2008_R3	Jugo Multifrutas	-27.35	-0.53	0.25	-27.22	-0.13
PTS_2010_R1	Jugo de Uva	-24.77	-0.16	0.25	-24.73	-0.04
PTS_2011_R1	Jugo de Uva con SO <sub>2</sub>	-25.21	-0.95	0.25	-24.97	-0.24
PTS_2011_R2	Jugo de Naranja	-25.15	-0.24	0.25	-25.08	-0.07
PTS_2012_R3	Jugo de Piña	-13.02	-0.37	0.25	-12.93	-0.09

**Tabla 8.** Resultados de los análisis de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  en pulpa, realizados en el Laboratorio de Isótopos Estables del Instituto de Geología de la UNAM.

Período	Muestra	$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ pulpa	Z-score	Tarjet SD	Media Robusta	Diferencia del resultado vs tarjet value
PTS_2001_R1	Jugo de Piña	-13.61	0.11	0.68	-13.68	0.07
PTS_2002_R1	Jugo de Naranja	-26.40	-0.13	0.68	-26.28	-0.12
PTS_2002_R3	Jugo de Manzana	N/A				
PTS_2003_R1	Jugo de Piña	-14.70	-0.37	0.68	-14.45	-0.25
PTS_2003_R3	Jugo de Uva	N/A				
PTS_2004_R1	Jugo de Uva	-25.69	0.30	0.68	-25.90	0.21
PTS_2004_R3	Jugo multifrutas	-26.14	0.13	0.68	-26.23	0.09
PTS_2005_R1	Jugo de Piña	-26.14	0.12	0.68	-26.22	0.08

PTS_2005_R3	Jugo de Manzana	N/A				
PTS_2006_R1	Jugo de Uva	N/A				
PTS_2006_R3	Jugo de Piña	-13.15	0.11	0.68	-13.22	0.07
PTS_2007_R1	Jugo de Uva	-25.78	0.46	0.68	-26.09	0.31
PTS_2007_R3	Jugo Frutas	N/A		0.68		
PTS_2008_R1	Jugo de Naranja	-27.21	-0.70	0.68	-26.74	-0.47
PTS_2008_R3	Jugo multifrutas	N/A				
PTS_2010_R1	Jugo de Uva	N/A				
PTS_2011_R1	Jugo de Uva con SO <sub>2</sub>	N/A				
PTS_2011_R2	Jugo de Naranja	-25.36	-1.04	0.31	-24.98	-0.38
PTS_2012_R3	Jugo de Piña	-13.53	0.72	0.31	-13.75	0.22

Nota: N/A = No Aplica, por ser jugos clarificados.

### VII.3. Muestras auténticas de jugos de fruta.

Mediante los resultados de la composición isotópica de carbono ( $\delta^{13}C_{VPDB}$ ), de azúcares y pulpa de jugos de 66 muestras de 11 especies botánicas diferentes (**Tabla 9.**) preparados en el laboratorio, se evaluó la variación natural de la  $\delta^{13}C_{VPDB}$  de los jugos naturales por efectos climatológicos y de origen botánico de la fruta, así como la relación entre la composición isotópica de los azúcares y de la pulpa de cada una de las frutas. En adelante nos referiremos a jugos naturales a estos jugos auténticos preparados a partir de frutas naturales en el laboratorio. También se prepararon jugos de piña que son plantas CAM y cuya adulteración no puede detectarse utilizando su composición isotópica del carbono, como se explicó anteriormente sin embargo se analizaron su pulpa y azúcares para poder generalizar los resultados de los jugos de frutas de plantas C<sub>3</sub> a plantas CAM.

**Tabla 9.** Resultados de la composición isotópica de carbono ( $\delta^{13}C_{VPDB}$ ), de azúcares y pulpa de jugos de fruta naturales de diferentes especies botánicas preparados en el laboratorio y datos que se utilizan para los tratamientos estadísticos (Correlación y Análisis de Variancia).

Muestra	Fruta	$\delta^{13}C_{VPDB}$ azúcar	$\delta^{13}C_{VPDB}$ pulpa	Diferencia ( $\delta^{13}C_{VPDB}$ pulpa - $\delta^{13}C_{VPDB}$ azúcar)	( $\delta^{13}C_{VPDB}$ Azúcares) <sup>2</sup>	( $\delta^{13}C_{VPDB}$ Pulpa) <sup>2</sup>
1	Naranja	-26.02	-25.78	0.24	677.04	664.61
2	Naranja	-25.44	-25.50	-0.06	647.19	650.25
3	Naranja	-26.81	-26.73	0.08	718.78	714.49
4	Naranja	-24.54	-25.09	-0.55	602.21	629.51
5	Naranja	-26.13	-26.14	-0.01	682.78	683.30
6	Naranja	-25.32	-25.27	0.05	641.10	638.57
7	Naranja	-25.07	-25.42	-0.35	628.50	646.18
8	Naranja	-26.25	-26.29	-0.04	689.06	691.16
9	Naranja	-26.27	-26.29	-0.02	690.11	691.16

10	Naranja	-27.35	-27.73	-0.38	747.93	768.95
11	Naranja	-27.36	-27.75	-0.39	748.47	770.06
12	Naranja	-27.72	-28.09	-0.37	768.54	789.05
13	Naranja	-27.65	-28.49	-0.84	764.78	811.68
14	Naranja	-27.07	-27.66	-0.59	732.78	765.08
15	Naranja	-26.50	-27.18	-0.68	702.25	738.75
16	Naranja	-26.52	-27.04	-0.52	703.31	731.16
17	Naranja	-26.64	-27.09	-0.45	709.69	733.87
18	Naranja	-26.14	-26.92	-0.78	683.30	724.69
19	Naranja	-25.87	-26.62	-0.75	669.26	708.62
20	Naranja	-25.77	-26.33	-0.56	664.09	693.27
21	Naranja	-25.83	-26.39	-0.56	667.19	696.43
22	Naranja	-25.77	-26.06	-0.29	664.09	679.12
23	Naranja	-26.62	-26.81	-0.19	708.62	718.78
24	Naranja	-27.04	-26.74	0.30	731.16	715.03
Promedio Naranja = $\hat{y}_i$		<b>-26.32</b>	<b>-26.64</b>	<b>-0.32</b>		
Desviación estándar (Naranja) = $s_i$		<b>0.80</b>	<b>0.88</b>	<b>0.08</b>		
25	Mandarina	-27.39	-27.1	0.29	750.21	734.41
26	Mandarina	-28.30	-28.42	-0.12	800.89	807.70
27	Mandarina	-28.30	-28.42	-0.12	800.89	807.70
28	Mandarina	-28.39	-28.27	0.12	805.99	799.19
29	Mandarina	-27.32	-28.09	-0.77	746.38	789.05
Promedio Mandarina = $\hat{y}_i$		<b>-27.94</b>	<b>-28.06</b>	<b>-0.12</b>		
Desviación estándar (Mandarina) = $s_i$		<b>0.48</b>	<b>0.50</b>	<b>0.36</b>		
30	Toronja	-25.82	-25.24	0.58	666.67	637.06
31	Toronja	-25.82	-25.07	0.75	666.67	628.50
32	Toronja	-26.87	-26.84	0.03	722.00	720.39
33	Toronja	-26.13	-26.64	-0.51	682.78	709.69
34	Toronja	-25.98	-25.77	0.21	674.96	664.09
35	Toronja	-25.98	-25.77	0.21	674.96	664.09
36	Toronja	-26.73	-27.23	-0.50	714.49	741.47
Promedio Toronja = $\hat{y}_i$		<b>-26.19</b>	<b>-26.08</b>	<b>0.11</b>		
Desviación estándar (Toronja) = $s_i$		<b>0.40</b>	<b>0.17</b>	<b>0.45</b>		
37	Manzana	-25.91	-26.27	-0.36	671.33	690.11
38	Uva	-26.41	-26.63	-0.22	697.49	709.16
39	Uva	-26.18	-26.26	-0.08	685.39	663.58
40	Uva	-24.74	-24.85	0.11	612.07	592.92
41	Uva	-27.5	-27.48	0.02	756.25	755.15
Promedio Uva = $\hat{y}_i$		<b>-26.21</b>	<b>-26.31</b>	<b>-0.10</b>		

Desviación estándar (Uva) = $s_i$		<b>0.98</b>	<b>0.95</b>	<b>0.09</b>		
42	Tamarindo	-28.1	-28.78	-0.68	789.61	828.29
43	Jitomate	-28.02	-28.62	-0.60	785.12	819.10
44	Guayaba	-27.66	-27.93	-0.27	765.08	780.08
45	Mango	-27.99	-28.46	-0.47	783.44	809.97
46	Mango	-28.75	-29.21	-0.46	826.56	853.22
47	Durazno	-27.53	-28.14	-0.61	757.90	791.86
48	Piña	-12.18	-12.65	-0.47	148.35	160.02
49	Piña	-13.68	-13.98	-0.30	187.14	195.44
50	Piña	-13.68	-13.98	-0.30	187.14	195.44
51	Piña	-12.92	-13.19	-0.27	166.93	173.98
52	Piña	-12.74	-13.45	-0.71	162.31	180.90
53	Piña	-13.62	-13.78	-0.16	185.50	189.89
54	Piña	-12.28	-12.95	-0.67	150.80	167.70
55	Piña	-12.75	-13.70	-0.95	162.56	187.69
56	Piña	-12.23	-12.82	-0.59	149.57	164.35
57	Piña	-12.24	-12.62	-0.38	149.82	159.26
58	Piña	-12.64	-12.99	-0.35	159.77	168.74
59	Piña	-12.73	-13.42	-0.69	162.05	180.10
60	Piña	-12.69	-13.63	-0.94	161.04	185.78
61	Piña	-12.30	-12.93	-0.63	151.29	167.18
62	Piña	-12.16	-13.06	-0.90	147.87	170.56
63	Piña	-12.17	-12.96	-0.79	148.11	167.96
64	Piña	-12.16	-12.91	-0.75	147.87	166.67
65	Piña	-13.82	-14.08	-0.26	190.99	198.25
66	Piña	-12.74	-13.45	-0.71	162.31	180.90
Promedio Piña = $\hat{y}$		<b>-12.72</b>	<b>-13.29</b>	<b>-0.57</b>		
Desviación estándar (Piña) = $s_i$		<b>0.56</b>	<b>0.45</b>	<b>0.24</b>		
Promedio ( $C_3$ y CAM) = $\hat{y}_i$		-22.66	-22.99	-0.34		
Desviación estándar ( $C_3$ y CAM) = $s_i$		6.38	6.24	0.37		
Promedio ( $C_3$ ) = $\hat{y}_i$		<b>-26.67</b>	<b>-26.89</b>	<b>-0.24</b>		
Desviación estándar ( $C_3$ ) = $s_i$		<b>1.00</b>	<b>1.12</b>	<b>0.37</b>		
Valor Mínimo (CAM)		-13.82	-14.08			
Valor Máximo (CAM)		-12.16	-12.62			
Valor Mínimo ( $C_3$ )		<b>-28.75</b>	<b>-29.21</b>			
Valor Máximo ( $C_3$ )		<b>-24.54</b>	<b>-24.35</b>			

Repetibilidad (de los resultados de mediciones).

Los intervalos y la repetibilidad de los resultados de los análisis de la composición isotópica de carbono de los azúcares y pulpa de los jugos de 11 frutas elaborados en el Laboratorio de Isótopos Estables del Instituto de Geología de la UNAM: Naranja, Mandarina, Toronja, Manzana, Uva, Tamarindo, Jitomate, Guayaba, Mango, Durazno (plantas C<sub>3</sub>) y Piña (plantas CAM), son los siguientes:

( $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}} = - 24.54 \text{ ‰ a } - 27.72 \text{ ‰}$ ), para los azúcares de la naranja y una repetibilidad menor o igual a 0.21 ‰.

( $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}} = - 25.09 \text{ ‰ a } - 28.49 \text{ ‰}$ ), para la pulpa de la naranja y una repetibilidad menor o igual a 0.38 ‰.

( $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}} = - 24.54 \text{ ‰ a } - 28.75 \text{ ‰}$ ), para los azúcares de las frutas C<sub>3</sub> y una repetibilidad menor o igual a 0.21 ‰.

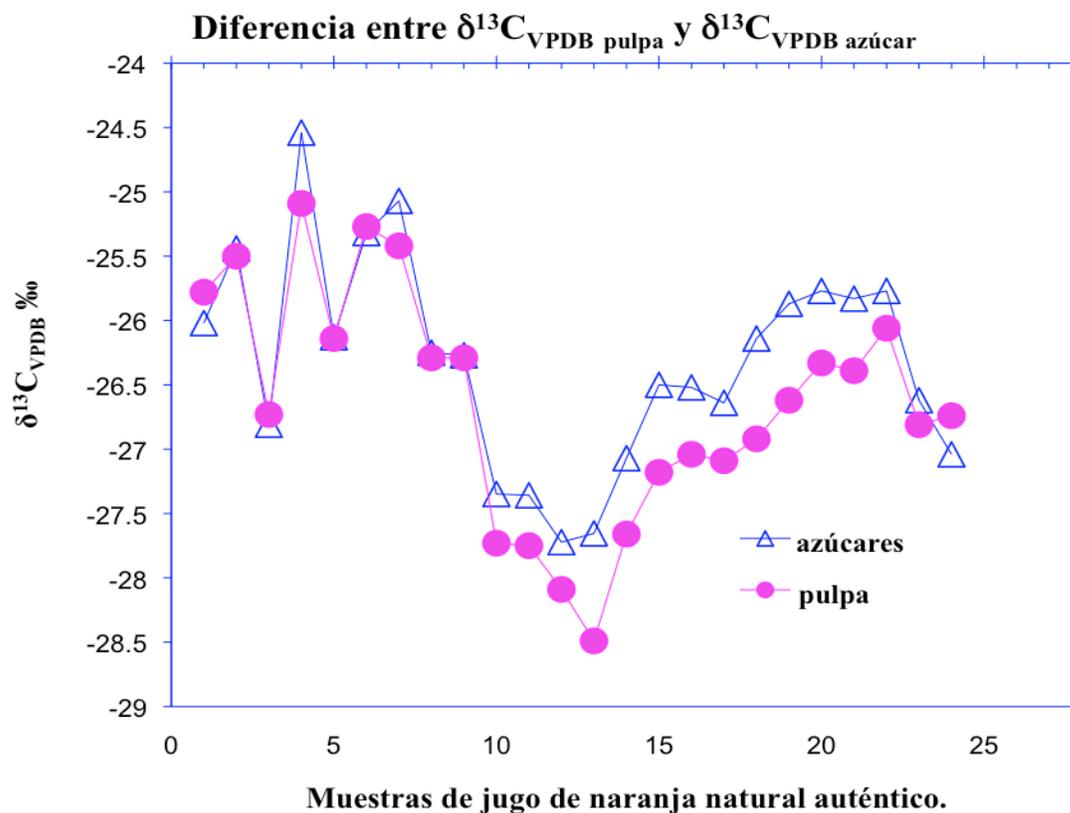
( $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}} = - 24.35 \text{ ‰ a } - 29.21 \text{ ‰}$ ), para la pulpa de las frutas C<sub>3</sub> y una repetibilidad menor o igual a 0.38 ‰.

( $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}} = - 12.16 \text{ ‰ a } - 13.82 \text{ ‰}$ ), para los azúcares de las frutas CAM y una repetibilidad menor o igual a 0.21 ‰.

( $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}} = - 12.62 \text{ ‰ a } - 14.08 \text{ ‰}$ ), para la pulpa de las frutas CAM y una repetibilidad menor o igual a 0.38 ‰.

Diferencia entre  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  pulpa y  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  azúcar .

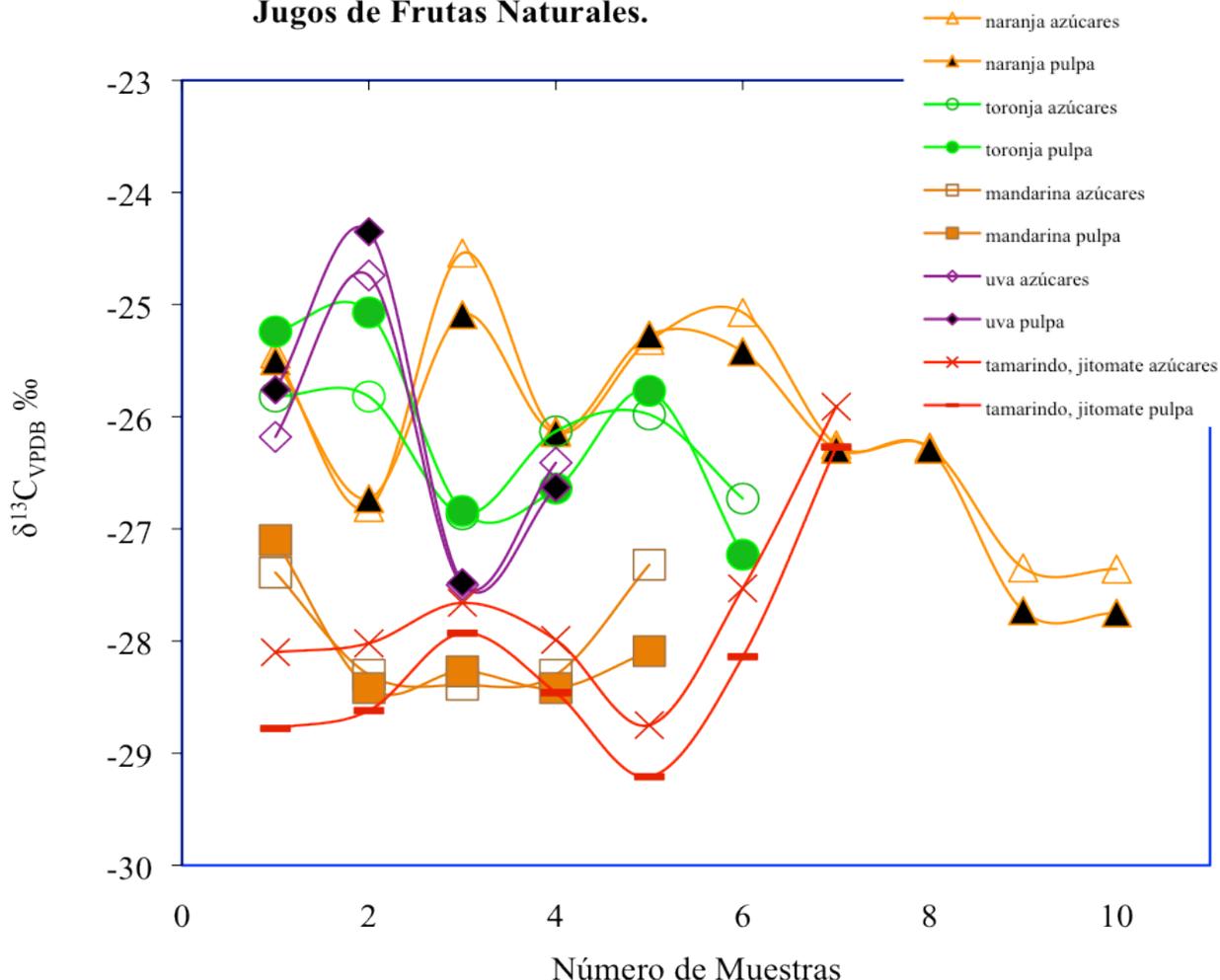
En la **Figura 1**, se muestra gráficamente la diferencia entre la composición isotópica de pulpa y azúcar para jugos de naranja auténticos. Puede observarse que tanto la variación natural de la composición isotópica de la pulpa de las naranjas como la de sus azúcares, es del orden de 4.0 ‰, mientras que la diferencia entre ambos compuestos es prácticamente constante con valor promedio para este caso de - 0.32 ‰. En la quinta columna de la **Tabla 9**, se incluye esta diferencia.



**Figura 1.** Composición isotópica de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  de azúcares y pulpa de muestras de jugo de naranja.

En la **Figura 2**, ahora se muestran las diferencias de la composición isotópica entre azúcares y pulpa para las demás de las especies botánicas de las frutas analizadas. Puede observarse el mismo comportamiento que en el caso de los jugos de naranja o sea una variación natural del 4.0 ‰ en la composición isotópica de la pulpa y los azúcares, que disminuye a 0.39 ‰ cuando se toma en cuenta la diferencia entre la composición isotópica de ambos componentes. Por tanto podemos generalizar que para todas las especies de frutas analizadas la variación entre azúcares y pulpa es menor de 0.4 ‰, un (1) orden de magnitud menor que el de la variación natural, de tal manera que el uso de esta diferencia aumenta la precisión del método.

## Diferencias de la composición isotópica de pulpa y azúcares de Jugos de Frutas Naturales.



**Figura 2.** Diferencias de la composición isotópica de pulpa y azúcares de jugos naturales preparados en el laboratorio por especie botánica.

Por otro lado observamos que el valor de la diferencia entre la composición isotópica de los componentes (pulpa y azúcares) de las frutas es característica de la especie botánica, siendo estas diferencias en unos casos positiva mientras que en otros es negativa (**Tabla 9**). Esta diferencia depende del tipo y cantidad de compuestos orgánicos (aceites esenciales, ácidos orgánicos no volátiles y compuestos fenólicos) que estén contenidos en la pulpa y cuyos valores de  $\delta^{13}C_{VPDB}$  en promedio son de -30.0 ‰, más negativos que los valores de la composición isotópica de los azúcares. (Wagner, S., Vreca, P. Leis, A. and Boechzelt, H., 2008).

Validación del patrón interno.

Es necesario ahora validar estadísticamente el uso de la pulpa como patrón interno, demostrando que existe una correlación lineal mayor de 0.99 entre ella y los azúcares. Y mediante el

análisis de variancia demostrar que dentro de un nivel de confianza del 95.0 %, los valores de la composición isotópica de la pulpa y azúcares de las muestras son indistinguibles.

a. Distribución Normal.

Asumiendo que los tres grupos de jugos de la **Tabla 9** (naranja, plantas C<sub>3</sub> y plantas C<sub>3</sub> + CAM) tienen una distribución normal y cumplen con una distribución “t” es posible, utilizando la desviación estándar ( $\sigma$ ) de cada conjunto asociarles una probabilidad de error al realizar una toma de decisión, como se describe en la **Tabla 10**.

**Tabla 10.** Probabilidad de error en las poblaciones, donde: No.: es el número de muestras de jugos;  $\bar{X}$ : promedio de las diferencia de la  $\delta^{13}C_{VPDB}$  pulpa menos la  $\delta^{13}C_{VPDB}$  azúcar;  $\sigma$ : desviación estándar de las diferencia de la  $\delta^{13}C_{VPDB}$  pulpa menos la  $\delta^{13}C_{VPDB}$  azúcar.

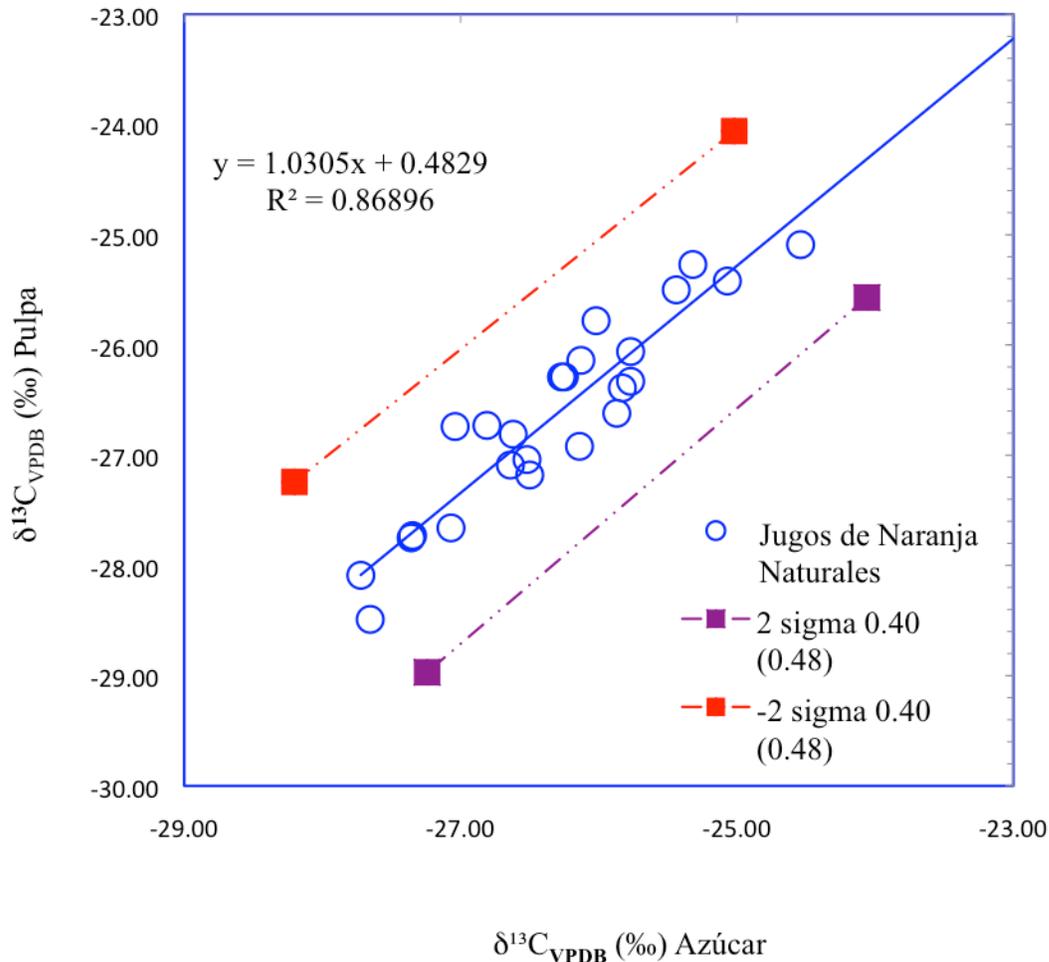
Límite	Probabilidad de Error	Jugos de naranja Auténticos	Jugos de plantas C <sub>3</sub> Auténticos	Jugos de plantas C <sub>3</sub> y CAM Auténticos
No.		24	36	66
$\bar{X}$		-0.32	-0.24	-0.34
$\sigma$		$\pm 0.08$	$\pm 0.37$	$\pm 0.37$
$\bar{X} + \sigma$	1 en 6	-0.40	-0.61	-0.71
$\bar{X} + 2\sigma$	1 en 44	-0.48	-0.98	-1.08
$\bar{X} + 3\sigma$	1 en 770	-0.56	-1.35	-1.45
$\bar{X} + 4\sigma$	1 en 25000	-0.64	-1.72	-1.82

b. Correlación entre la  $\delta^{13}C_{VPDB}$  pulpa y la  $\delta^{13}C_{VPDB}$  azúcar.

La correlación entre la composición isotópica de carbono de la pulpa y la composición isotópica de los azúcares (sólidos disueltos) para los “jugos de naranja auténticos”, “jugos de frutas naturales de plantas C<sub>3</sub>”, y “jugos de frutas naturales de plantas C<sub>3</sub> y CAM” de la **Tabla 9**, se muestran en las **Figuras 3, 4 y 5**. En cada uno de los casos se muestran con líneas punteadas  $\bar{X} \pm 2\sigma$  donde  $\sigma$  es el valor de la repetibilidad de la técnica analítica para cada grupo.

Para el caso de los jugos de naranja naturales la correlación se encuentra representada gráficamente en la **Figura 3**, y es de 0.86896 ( $R^2$ ).

### Jugos de Naranja Naturales

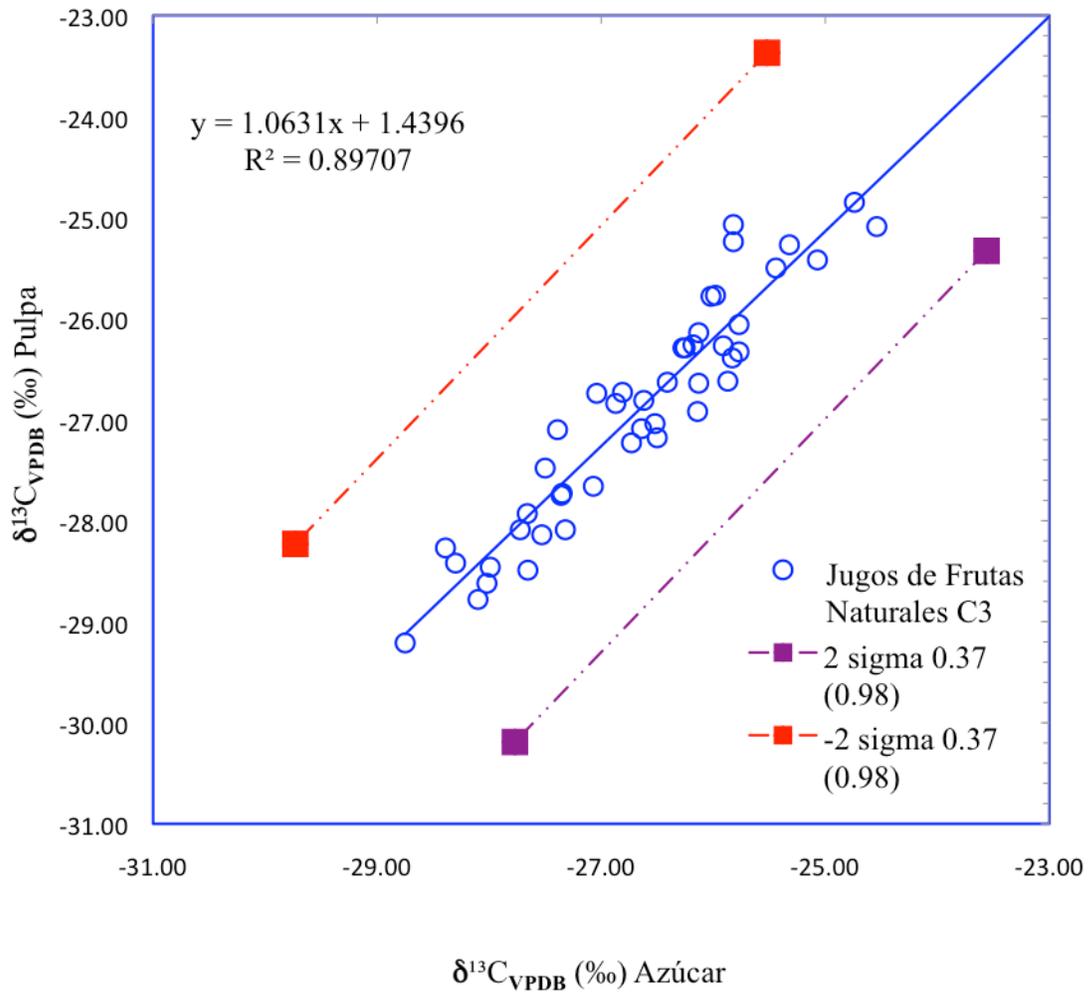


**Figura 3.** Composición isotópica entre  $\delta^{13}C_{VPDB}$  pulpa y  $\delta^{13}C_{VPDB}$  azúcares para jugos de naranja naturales.

Ahora la correlación lineal entre la composición isotópica de la pulpa y la de los azúcares para los jugos de todas las frutas  $C_3$  se muestra en la **Figura 4**, y es de  $R^2 = 0.89707$ .

Es importante señalar que los valores anteriores son menores al de lo especificado ( $R^2 = 0.99$ ) para tener una correlación lineal, esto se debe a que la escala que se está considerando es pequeña, aproximadamente de 5.0 ‰. Nótese que para ambas gráficas que todas las muestras se encuentran dentro de las especificaciones estadísticas de  $2\sigma$ . Adviértase que también la ordenada al origen (b) no es cero debido a la diferencia de la composición isotópica de la pulpa y los azúcares ( $\delta^{13}C_{VPDB}$  pulpa -  $\delta^{13}C_{VPDB}$  azúcares) discutida anteriormente.

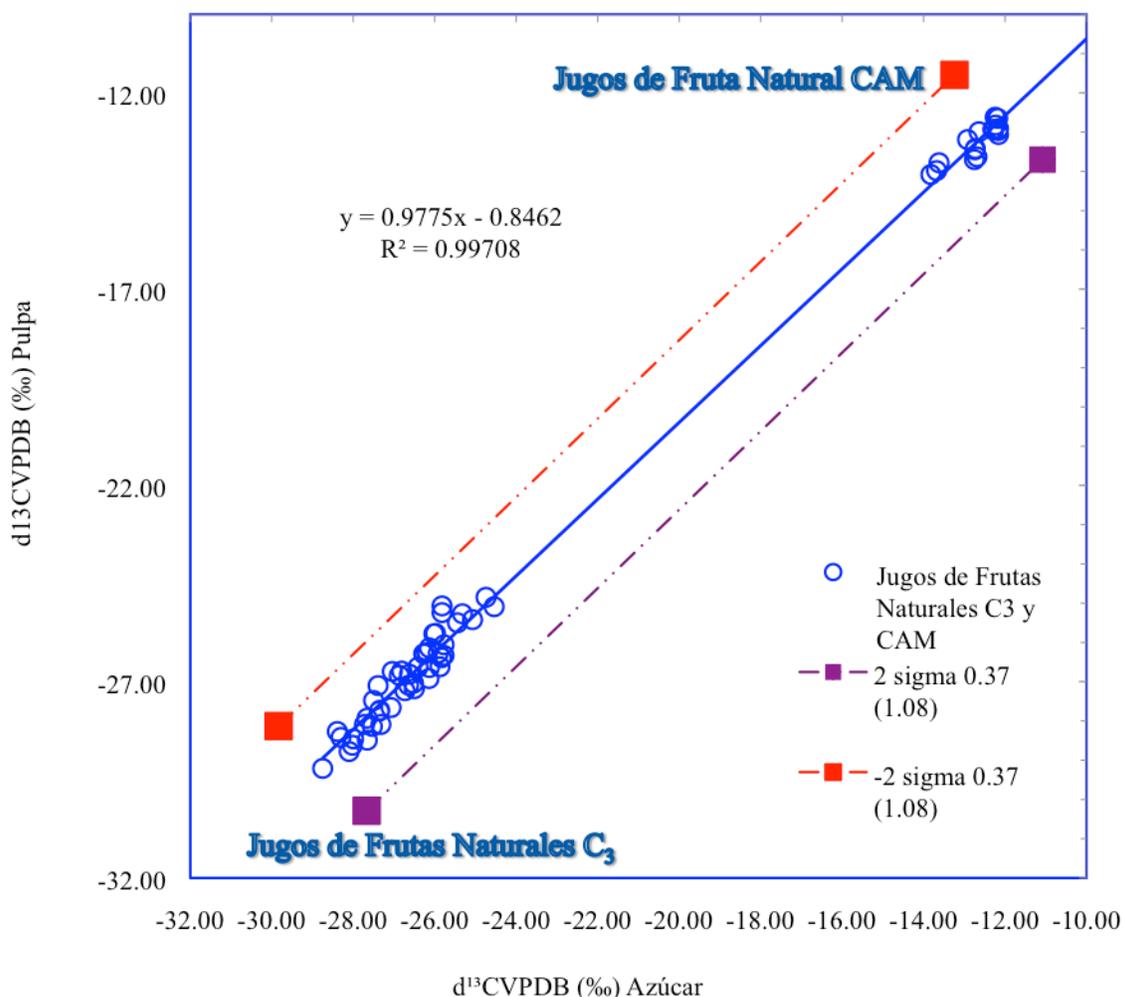
### Jugos de Frutas Naturales C<sub>3</sub>



**Figura 4.** Composición isotópica entre  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  pulpa y  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  azúcares para jugos de fruta naturales de plantas C<sub>3</sub>.

Finalmente en la **Figura 5**, se incluyen la composición isotópica de jugos de piña para mostrar la correlación entre los componentes en la escala completa del sistema que se estudia, que es la composición isotópica de plantas C<sub>3</sub> y plantas CAM. Nótese que para este caso la correlación entre la pulpa y azúcares de jugos de plantas C<sub>3</sub> y jugos de plantas CAM es de  $R^2 = 0.99708$ .

### Jugos de Frutas Naturales C3 y CAM



**Figura 5.** Composición isotópica de la  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  pulpa y de la  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  azúcares de los jugos de frutas naturales C<sub>3</sub> ( $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  azúcares = - 28.75 a - 24.54) y jugos de piña naturales CAM ( $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  azúcares = - 13.82 a - 12.16) preparados en el Laboratorio.

#### c. Análisis de variancia.

Ahora para completar la validación del uso de la composición isotópica de la pulpa como patrón interno se demuestra estadísticamente, mediante el análisis de variancia (ANOVA) que no hay una diferencia significativa entre la composición isotópica de la pulpa y la de los azúcares (sólidos disueltos) en las frutas auténticas (hipótesis nula). Calculando para ambos conjuntos las diferencias entre grupos y las diferencias intra grupo de tal manera que la relación entre estos dos parámetros se define como la distribución “F de Snedecor”:

$$F = \frac{MS(Tr)}{MSE}$$

El valor de esta función depende tanto de los grados de libertad como del nivel de significancia dentro de la cual se aplica la hipótesis. El valor de F obtenido experimentalmente de las muestras se contrasta con el valor de la distribución teórica y si es menor se acepta la hipótesis.

En el análisis de variancia se utilizaron los datos de  $\delta^{13}C_{VPDB}$  de la pulpa y la  $\delta^{13}C_{VPDB}$  de los azúcares de 66 muestra de jugos naturales (**Tabla 9**). Se calcularon las sumas de los cuadrados, las medias cuadráticas y los grados de libertad de los dos grupos de datos y se obtuvo lo siguiente. (Millar, I., Freund, J., 1989).

Cálculos para el Análisis de Variancia:

**Tabla 11.** Cálculos e interpretación del Análisis de Variancia para la relación isotópica de carbono ( $\delta^{13}C_{VPDB}$ ), de azúcares y pulpa de jugos de fruta naturales preparados en el laboratorio y el correspondiente tratamiento estadístico (ANOVA).

Descripción	$\delta^{13}C_{VPDB}$ azúcar	$\delta^{13}C_{VPDB}$ pulpa	Diferencia ( $\delta^{13}C_{VPDB}$ pulpa - $\delta^{13}C_{VPDB}$ azúcar)	( $\delta^{13}C_{VPDB}$ Azúcares) <sup>2</sup>	( $\delta^{13}C_{VPDB}$ Pulpa) <sup>2</sup>
Promedio = $\hat{y}_i$	-22.66	-22.99	-0.34		
Desviación estándar = $\sigma_i$	6.38	6.24	0.37		
$T_i$ = Sumatoria	-1495.25	-1516.45		36560.80	37411.39
T = Suma Total	-3011.70			73972.19	
n =	66	Número de eventos			
k =	2	Número de Tratamientos			
$C = T^2 / (kn)$	68714.84	Término de Corrección			
$SST = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^n y_{ij}^2 - C$	5257.35	Suma Total de cuadrados			
$SS(Tr) = \frac{\sum_{i=1}^k T_i^2}{n} - C$	3.40	Suma de Cuadrados entre Tratamientos			
$SSE = SST - SS(Tr)$	5253.95	Suma de Cuadrados de los Errores			
$MS(Tr) = SS(Tr) / (k-1)$	3.40	Media Cuadrada de los Tratamientos			
$MSE = SSE / k(n-1)$	39.80	Media Cuadrada de los Errores			

MS(Tr) / MSE =	0.08	F		
nk - 1 =	131	Grados de libertad totales		
Análisis de Variancia de Jugos Naturales Preparados en el Laboratorio (ANOVA)				
Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrada	F
Tratamientos	(k-1) = 1	SS(Tr) = 3.40	MS(Tr) = SS(Tr)/(k-1) = 3.40	MS(Tr)/MSE = 0.08
Error	k(n-1) = 130	SSE = 5253.95	MSE = SSE/k(n-1) = 39.80	
Total	(nk - 1) = 131	SST = 5257.35		
F <sub>0.05</sub> = 3.93				

Hipótesis nula: $\delta^{13}C_{VPDB}$ (azúcares) = $\delta^{13}C_{VPDB}$ (pulpa)
Hipótesis alterna: $\delta^{13}C_{VPDB}$ (azúcares) $\neq$ $\delta^{13}C_{VPDB}$ (pulpa)
Nivel de significancia: $\alpha = 0.05$

De tal manera que si establecemos un nivel de significancia de 0.05, la  $F_{0.05} = 3.93$  que se obtiene de la tabla estadística correspondiente, es mayor que la obtenida a partir de los datos experimentales ( $F = 0.08$ ) y por tanto se puede asegurar con el 95.0 % de confianza que la hipótesis nula es válida es decir que para una muestra auténtica, no hay una diferencia significativa entre los valores isotópicos  $\delta^{13}C_{VPDB}$  de sus azúcares y los valores  $\delta^{13}C_{VPDB}$  de su pulpa. Esto significa que para el caso de adulteración de los azúcares, la pulpa puede usarse como indicador de la autenticidad.

Una vez probada esta hipótesis, el valor de  $\delta^{13}C_{VPDB}$  azúcares auténticos  $C_3$ , que se encuentra en el denominador de por la ecuación 2, se sustituye por la expresión  $(\delta^{13}C_{VPDB}$  pulpa -  $(\delta^{13}C_{VPDB}$  pulpa -  $\delta^{13}C_{VPDB}$  azúcares auténticos  $C_3$ )) y se obtiene la ecuación 3 (Ec. 3):

$$\%Fruta = \frac{(\delta^{13}C_{azúcares-jugo\_analizado} - \delta^{13}C_{azúcares-auténticos plantas C_4})}{[\delta^{13}C_{pulpa-jugo\_analizado} - (\delta^{13}C_{pulpa} - \delta^{13}C_{azúcares\_auténticos plantas C_3}) - (\delta^{13}C_{azúcares-auténticos plantas C_4})]} \times 100$$

(Ec. 3)

$\delta^{15}N_{AIR}$  de frutas naturales.

Al observar los análisis isotópicos de carbono y nitrógeno de pulpas provenientes de algunos de los jugos comerciales, se encontró que aunque las  $\delta^{13}C_{VPDB}$  se encontraban dentro del intervalo

natural de las frutas de plantas C<sub>3</sub>, en cuanto al nitrógeno (N<sub>2</sub>), no se pudo analizar su composición isotópica ya que no se detectó su presencia.

Sin embargo los valores de  $\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$  obtenidos históricamente por el Laboratorio de Isótopos Estables del Instituto de Geología de la UNAM, en los frutos y productos del campo de origen nacional se encuentran en un intervalo entre 3.0 ‰ a 7.0 ‰. Por tanto se procedió a analizar algunos espesantes utilizados por la industria alimentaria, presentados en la **Tabla 12**.

**Tabla 12.** Resultados de las relaciones isotópicas de espesantes utilizados en la industria alimentaria.

Descripción	$\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$ ‰	$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ ‰
H17 Estabilizante KHVF	No Contiene	-19.60
H 16 Indica Gum LL	-1.0	-20.89
Almidón Modificado Novation 33005	No Contiene	-25.49
Almidón Purity 87	No Contiene	-26.04
Almidón modificado Nacional 13905	No Contiene	-11.59

Estos análisis muestran claramente que aunque algunos espesantes tienen valores de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  de plantas C<sub>3</sub> el valor de su composición isotópica de N<sub>2</sub> ( $\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$ ) muestra que no contienen nitrógeno en su molécula. Por tanto para validar completamente el uso de la pulpa como patrón interno se determinó que el análisis de la  $\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$  de la pulpa debe ser detectable y tener un valor mayor a cero.

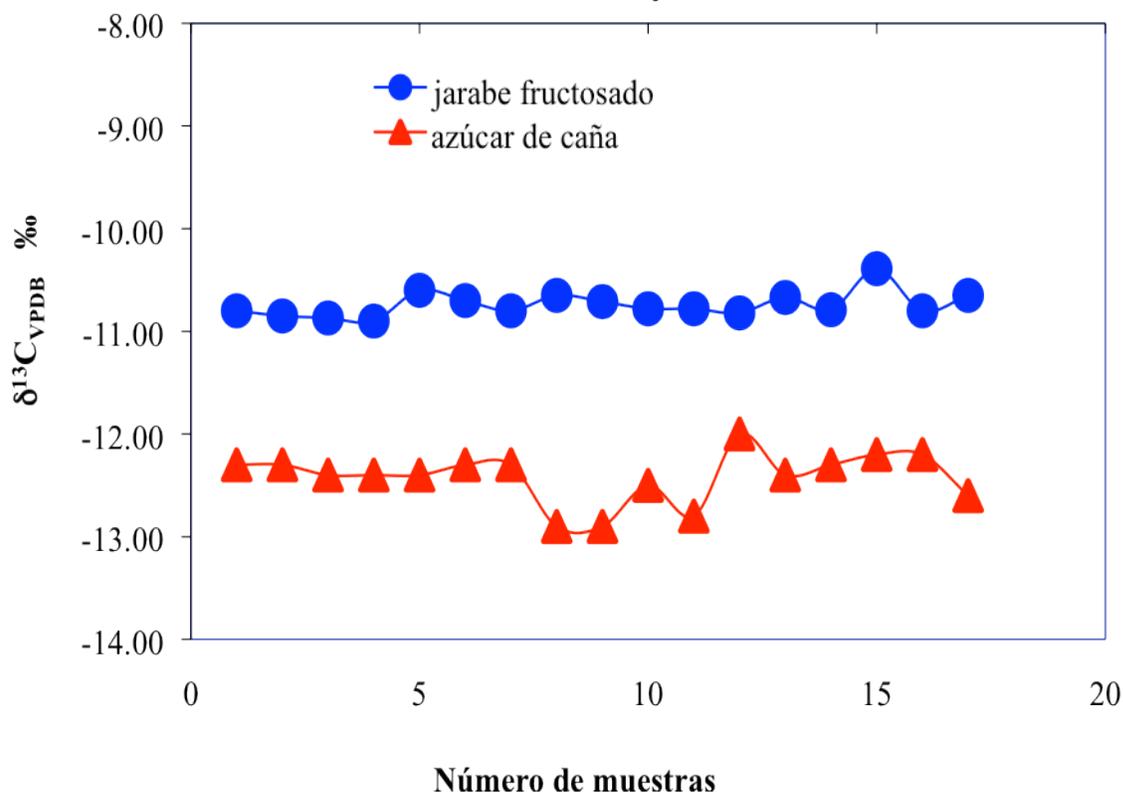
#### VII.4. Muestras auténticas de edulcorantes exógenos.

Los resultados de los análisis de la composición isotópica de carbono ( $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ ), de los dos edulcorantes utilizados comúnmente en la industria de los jugos: 17 muestras de azúcar de caña y 17 muestras de jarabe fructosado para obtener el intervalo de variación natural de los mismos. Los resultados se encuentran en la **Tabla 13** y **Figura 6**.

**Tabla 13.** Resumen de los análisis isotópicos de los edulcorantes exógenos (azúcar de caña y jarabe fructosado).

Edulcorante Exógeno	Determinaciones de $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$	Media ( $\mu$ ) $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ ‰	Desviación estándar ( $\sigma$ ) $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$	Valor Mínimo	Valor Máximo
Azúcar de Caña	17	-12.32	0.0922	-12.50	-12.00
Jarabe fructosado	17	-10.59	0.1229	-10.77	-10.39
Total como mezcla	34	-11.45	0.1075	-12.50	-10.39

## Composición Isotópica de Azúcar de caña y Jarabe fructosado.



**Figura 6.** Composición isotópica de adulterantes exógenos (azúcar de caña y jarabe fructosado).

En la **Figura 6**, se observa que la variación natural de la composición isotópica de los edulcorantes exógenos (plantas  $C_4$ ) es mucho menor que el de las frutas (plantas  $C_3$ ). Los valores promedio obtenidos son de  $\delta^{13}C_{VPDB} = -10.59$  ‰ para el jarabe fructosado y  $\delta^{13}C_{VPDB} = -12.32$  ‰ para la caña de azúcar.

Es importante hacer notar que en la ecuación 3, los valores de las composiciones isotópicas a substituir son los específicos de cada edulcorante y de cada pulpa y azúcar del jugo de fruta correspondiente. Sin embargo para generalizar los resultados y ser utilizados en la Norma NOM-173-SCFI-2009, debido a que no es posible saber cuál azúcar exógeno se utilizó en la industria, se utilizará el valor de  $-11.45$  ‰ como la  $\delta^{13}C_{VPDB}$  promedio (Azúcar de Caña/Jarabe fructosado) promedio de los azúcares provenientes de plantas  $C_4$ . En cuanto a la composición isotópica de la diferencia de la pulpa con los azúcares auténticos de plantas  $C_3$  se utilizará también el valor promedio obtenido que es el valor de  $\delta^{13}C_{VPDB}$  de  $-0.24$  ‰. El uso de estos promedios introduce un error en el cálculo del porcentaje (%) de fruta, que será evaluado posteriormente.

$$\%Fruta = \frac{\delta^{13}C_{azúcares\_jugo\_analizado} - (-11.45)}{(\delta^{13}C_{pulpa\_jugo\_analizado} + 0.24) - (-11.45)} \times 100$$

(Ec. 4)

## VII.5. Muestras de mezclas experimentales.

Aplicación de las mezclas experimentales realizadas en el laboratorio.

Para evaluar el comportamiento de mezclas adulteradas y calcular el error que se introduce al utilizar promedios en lugar de valores específicos de cada edulcorante, se prepararon 16 jugos de naranja adulterados en el laboratorio con caña de azúcar y jarabe fructosado en dos grupos distintos. En cada grupo se prepararon 3 mezclas cuya concentración de azúcares o valor en grados Brix variaban (10.0, 12.0, y 14.0) y otras 5 mezclas que tenían aproximadamente el valor de 12.0 °Brix, pero con diferentes proporciones de los azúcares exógenos utilizados (desde el 20.0 % hasta 83.3 %).

Las mezclas adulteradas se hicieron con jugo de naranja auténtico (13.0 °Brix), preparado en el laboratorio y la adición de una solución de azúcar de caña de 36.8 °Brix en el primer tratamiento y una solución de jarabe fructosado de 27.2 °Brix para el segundo tratamiento. Las soluciones se prepararon utilizando material volumétrico clase A y las mediciones de grados Brix se midieron con un refractómetro de mano marca ATAGO (Japón) modelo ATC-1E (°Brix 0.0 ≈ 32.0 con resolución de °Brix ± 0.2). **Tabla 14.**

**Tabla 14.** Proceso de elaboración de las mezclas adulteradas, relacionando % Fruta (Autenticidad) y °Brix de las mezclas con los edulcorantes exógenos.

% Fruta (Porcentaje de Autenticidad)	mL de jugo de naranja	mL de solución de Azúcar de Caña de 36.8 °Brix añadida	°Brix de la mezcla	mL de solución de Jarabe fructosado de 27.2 °Brix añadida	°Brix de la mezcla
80.0	61.54	5.4	10.0	7.35	10.0
66.7	61.54	10.9	12.0	14.70	12.0
57.0	61.54	16.3	14.0	22.05	14.0
50.0	46.15	16.3	12.0	22.05	12.0
41.6	38.46	19.0	12.0	25.70	12.0
33.3	30.77	21.7	12.2	29.40	12.0
25.0	23.08	24.5	12.0	33.10	12.2
16.7	15.38	27.2	12.0	36.76	12.2

Realizado este proceso, las mezclas se trataron como muestras normales de jugos para la obtención de las  $\delta^{13}C_{VPDB}$  de pulpa y azúcar y la  $\delta^{15}N_{AIR}$  en pulpa.

Los valores obtenidos de las composiciones isotópicas, se utilizaron para analizar el comportamiento de un jugo de fruta auténtico (naranja) adulterado en el laboratorio y obtener una curva de calibración de mezclas.

Los resultados se encuentran en la **Tablas 15 y 16 y Figura 7.**

**Tabla 15.** Resultados de la composición isotópica de carbono ( $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ ), de azúcares y pulpa de jugos de naranja adulterados ex profeso con azúcar de caña, preparados en el laboratorio de Isótopos Estables, para analizar el comportamiento de las muestras adulteradas.

Mezclas realizadas con jugo de Naranja auténtico y Azúcar de Caña	$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ pulpa	$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ azúcares	% de Fruta usando la Fórmula de la (Ec. 3)	% de Fruta usando la Fórmula de la NOM-173	Diferencia en % Fruta	°Brix Mezcla	Error °Brix	$\sigma$
Naranja original = 13.0 °Brix	-26.29	-26.27	<b>100.00</b>	<b>100.00</b>	0.00	13.0	0.0	0.0
Naranja 80.0 % + caña. 10.0 °Brix	-26.29	-23.08	<b>77.13</b>	<b>79.66</b>	-2.52	10.0	-0.3	1.8
Naranja 66.6 % + caña. 12.0 °Brix	-26.29	-21.06	<b>62.65</b>	<b>65.82</b>	-3.17	12.0	-0.4	2.2
Naranja 57.0 % + caña. 14.0 °Brix	-26.29	-19.68	<b>52.76</b>	<b>56.37</b>	-3.61	14.0	-0.5	2.6
Naranja 50.0 % + caña. 12.0 °Brix	-26.29	-18.73	<b>45.95</b>	<b>49.86</b>	-3.91	12.0	-0.5	2.8
Naranja 41.6 % + caña. 12.0 °Brix	-26.29	-17.48	<b>36.99</b>	<b>41.30</b>	-4.31	12.0	-0.5	3.0
Naranja 33.3 % + caña. 12.0 °Brix	-26.29	-16.48	<b>29.82</b>	<b>34.45</b>	-4.63	12.2	-0.6	3.3
Naranja 25.0 % + caña. 12.0 °Brix	-26.29	-15.31	<b>21.43</b>	<b>26.44</b>	-5.00	12.0	-0.6	3.5
Naranja 16.7 % + caña. 12.0 °Brix	-26.29	-14.20	<b>13.48</b>	<b>18.84</b>	-5.36	12.0	-0.6	3.8
Azúcar de Caña utilizada		-12.32						

$\bar{X}$ = Promedio					-4.07		-0.49	2.87
$\sigma$ = Desviación Estándar					0.95		0.13	0.67

En la cuarta columna de la **Tabla 15**, se muestra el porcentaje de fruta que se obtuvo a partir de la ecuación 3 (**Ec. 3**), utilizando los valores específicos de las mezclas es decir - 12.32 ‰ para  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  azúcar de caña auténtico C4 y - 0.02 ‰ para la  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  de la diferencia ( $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  pulpa -  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  azúcares auténticos C3), para obtener los valores de la quinta columna se utilizó la ecuación 4 (**Ec. 4**), la cual está presente en la NOM-173, pero ahora substituyendo los valores promedio es decir - 11.45 ‰ para  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  azúcares auténticos C4 y - 0.24 ‰ para la diferencia  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  pulpa -  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  azúcares auténticos C3.

Obteniendo valores de % de fruta menores a los esperados con los valores específicos.

La sexta columna muestra la diferencia en % de fruta debida al uso de valores promedio en lugar de valores específicos de la especie botánica.

Al adulterar un jugo auténtico con azúcar de caña, los valores obtenidos de la  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  azúcares (Columna 3) se vuelven menos negativos, esto es se alejan de la huella isotópica de las plantas C3 y se acercan a la huella isotópica de las plantas C4. Mientras que el valor de la  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  pulpa, permanece constante.

**Tabla 16.** Resultados de la relación isotópica de carbono ( $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ ), de azúcares y pulpa de jugos de naranja adulterados ex profeso con jarabe fructosado, preparados en el laboratorio de Isótopos Estables, para analizar el comportamiento de las muestras adulteradas.

Mezcla realizadas con jugo de Naranja y Jarabe fructosado.	$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ pulpa	$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ azúcares	% de Fruta usando la Fórmula de ( <b>Ec. 3</b> )	% de Fruta usando la Fórmula NOM-173	Diferencia en % Fruta	°Brix Mezcla	Error °Brix	$\sigma$
Naranja original = 13.0 °Brix	-26.29	-26.27	<b>100.00</b>	<b>100.00</b>	0.00	13.0	0.0	0.0
Naranja 80.0 % + Jarabe. 10.0 °Brix	-26.29	-22.78	<b>77.74</b>	<b>77.60</b>	0.14	10.0	0.0	0.1
Naranja 66.6 % + Jarabe. 12.0 °Brix	-26.29	-20.61	<b>63.90</b>	<b>62.74</b>	1.16	12.0	0.1	0.8
Naranja 57.0 % + Jarabe. 14.0 °Brix	-26.29	-19.02	<b>53.76</b>	<b>51.85</b>	1.91	14.0	0.3	1.4
Naranja 50.0 % + Jarabe. 12.0 °Brix	-26.29	-17.94	<b>46.88</b>	<b>44.45</b>	2.42	12.0	0.3	1.7

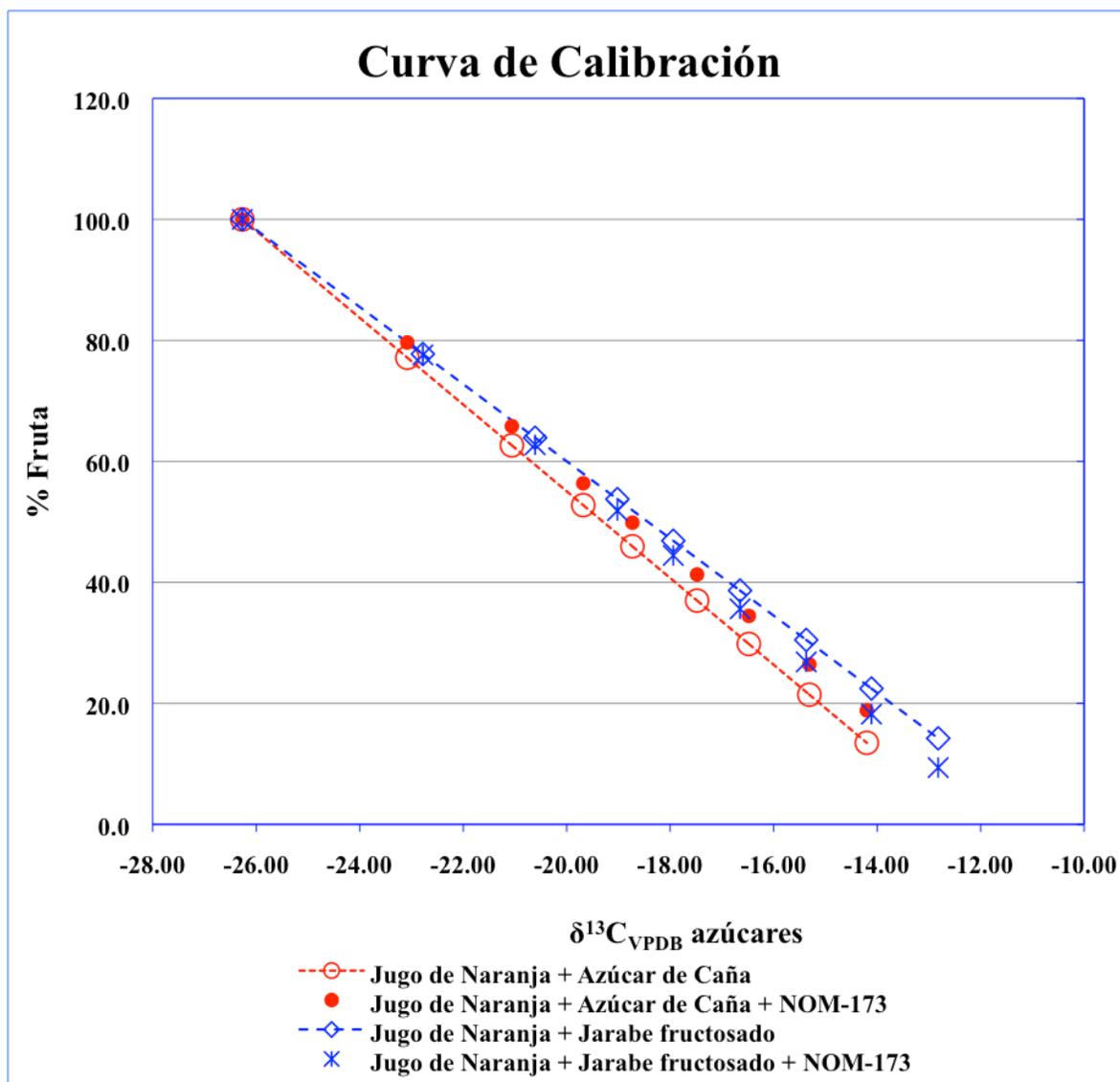
Naranja 41.6 % + Jarabe. 12.0 °Brix	-26.29	-16.65	<b>38.65</b>	<b>35.62</b>	3.03	12.0	0.4	2.1
Naranja 33.3 % + Jarabe. 12.0 °Brix	-26.29	-15.37	<b>30.48</b>	<b>26.85</b>	3.64	12.2	0.4	2.6
Naranja 25.0 % + Jarabe. 12.0 °Brix	-26.29	-14.11	<b>22.45</b>	<b>18.22</b>	4.23	12.2	0.5	3.0
Naranja 16.7 % + Jarabe. 12.0 °Brix	-26.29	-12.82	<b>14.22</b>	<b>9.38</b>	4.84	12.0	0.6	3.4
Jarabe fructosado utilizado		-10.59						
X = Promedio					2.67		0.33	1.89
$\sigma$ = Desviación Estándar					1.58		0.19	1.12

Siguiendo el criterio de la **Tabla 15**, en la cuarta columna de la **Tabla 16**, se muestra el porcentaje de fruta que se obtuvo a partir de la ecuación 3 (**Ec. 3**), utilizando los valores específicos de las mezclas es decir - 10.59 ‰ para  $\delta^{13}C_{VPDB}$  jarabe fructosado auténtico C4 y - 0.02 ‰ para la  $\delta^{13}C_{VPDB}$  de la diferencia ( $\delta^{13}C_{VPDB}$  pulpa -  $\delta^{13}C_{VPDB}$  azúcares auténticos C3), para obtener los valores de la quinta columna se utilizó la ecuación 4 (**Ec. 4**), la cual está presente en la NOM-173, pero ahora substituyendo los valores promedio es decir - 11.45 ‰ para  $\delta^{13}C_{VPDB}$  azúcar auténticos C4 y - 0.24 ‰ para la diferencia  $\delta^{13}C_{VPDB}$  pulpa -  $\delta^{13}C_{VPDB}$  azúcares auténticos C3.

Obteniendo valores de % de fruta menores a los esperados con los valores específicos.

La sexta columna muestra la diferencia en % de fruta debida al uso de valores promedio en lugar de valores específicos de la especie botánica.

Al adulterar un jugo auténtico con jarabe fructosado, los valores obtenidos de la  $\delta^{13}C_{VPDB}$  azúcares (Columna 3) se vuelven menos negativos, esto es se alejan de la huella isotópica de las plantas C<sub>3</sub> y se acercan a la huella isotópica de las plantas C<sub>4</sub>. Mientras que el valor de la  $\delta^{13}C_{VPDB}$  pulpa, permanece constante.



**Figura 7.** Representación gráfica del comportamiento de las muestras de jugo de naranja auténtico con adiciones de edulcorantes exógenos en diferentes concentraciones, en relación al porcentaje de fruta, utilizando las ecuaciones 2, 3 y la ecuación presentada en la NOM-173.

En la **Figura 7.** puede observarse como la diferencia entre el valor real de  $\delta^{13}C_{VPDB}$  y el valor calculado de  $\delta^{13}C_{VPDB}$  con valores isotópicos promedios para los azúcares auténticos  $C_4$  y para el valor de  $\delta^{13}C_{VPDB}$  de la diferencia (pulpa - azúcares auténticos  $C_3$ ) aumenta a medida que el porcentaje de adulteración aumenta.

Esta diferencia o error introducido para un intervalo de autenticidad del 80.0 % al 16.7 % tiene un valor promedio de - 4.07 % en el caso de adulterar con caña de azúcar y de 2.67 % en el caso de adulterar con jarabe fructosado.

El valor máximo de esta diferencia o error es de - 5.36 % en la adulteración del 83.3 % con caña de azúcar.

Estos casos los explicaré de la siguiente manera:

Jugo de naranja al 80.0 % y jugo de naranja al 16.7 % con adición de solución azúcar de caña (36.8 °Brix) con un valor de  $\delta^{13}C_{VPDB} = -12.32 \text{ ‰}$  :

Adulteración del 20.0 %:

Promedio de la  $\delta^{13}C_{VPDB}$  de los edulcorantes exógenos = - 11.45

$$\%Fruta = \frac{-26.29 - (-11.45)}{-23.08 - (-0.24) - (-11.45)} \times 100 \quad \%Fruta = 79.66$$

$\delta^{13}C_{VPDB}$  del edulcorante exógeno conocido = - 12.32

$$\%Fruta = \frac{-26.29 - (-12.32)}{-23.08 - (-0.02) - (-12.32)} \times 100 \quad \%Fruta = 77.13$$

Diferencia negativa = - 2.52 %

Adulteración del 83.3 %:

Promedio de la  $\delta^{13}C_{VPDB}$  de los edulcorantes exógenos = - 11.45

$$\%Fruta = \frac{-14.20 - (-11.45)}{-23.08 - (-0.24) - (-11.45)} \times 100 \quad \%Fruta = 18.84$$

$\delta^{13}C_{VPDB}$  del edulcorante exógeno conocido = - 12.32

$$\%Fruta = \frac{-14.20 - (-12.32)}{-23.08 - (-0.02) - (-12.32)} \times 100 \quad \%Fruta = 13.48$$

Diferencia negativa = - 5.36 %

Jugo de naranja al 80.0 % y jugo de naranja al 16.7 % con adición de solución de jarabe fructosado (27.2 °Brix) con un valor de  $\delta^{13}C_{VPDB} = -10.59 \text{ ‰}$  :

Adulteración del 20.0 %:

Promedio de la  $\delta^{13}C_{VPDB}$  de los edulcorantes exógenos = - 11.45

$$\%Fruta = \frac{-26.29 - (-11.45)}{-22.78 - (-0.24) - (-11.45)} \times 100 \quad \%Fruta = 77.60$$

$\delta^{13}C_{VPDB}$  del edulcorante exógeno conocido = - 10.59

$$\%Fruta = \frac{-26.29 - (-10.59)}{-22.78 - (-0.02) - (-10.59)} \times 100 \quad \%Fruta = 77.74$$

Diferencia positiva = 0.14 %

Adulteración del 83.3 %:

Promedio de la  $\delta^{13}C_{VPDB}$  de los edulcorantes exógenos = - 11.45

$$\%Fruta = \frac{-12.82 - (-11.45)}{-17.94 - (-0.24) - (-11.45)} \times 100 \quad \%Fruta = 9.38$$

$\delta^{13}C_{VPDB}$  del edulcorante exógeno conocido = - 10.59

$$\%Fruta = \frac{-12.82 - (-10.59)}{-17.94 - (-0.02) - (-10.59)} \times 100 \quad \%Fruta = 14.22$$

Diferencia positiva = 4.84 %

Cabe hacer notar que existen también jugos clarificados (carentes de pulpa, debido al método de producción en la industria, principalmente uva y manzana) para los cuales se debe substituir en el denominador de la ecuación 3 (Ec. 3), la referencia general de autenticidad o sea la diferencia entre la composición isotópica promedio de los azúcares de plantas  $C_3$  y de los azúcares de las plantas  $C_4$ , obteniendo así la ecuación 5 (Ec. 5):

$$\%Fruta = \frac{\delta^{13}C_{azúcares\_jugo\_analizado} + 11.45}{-14.55} \times 100$$

(Ec. 5)

El error o diferencia de % de fruta entre el valor real y el valor obtenido por esta ecuación se puede calcular utilizando para este ejercicio los resultados de  $\delta^{13}C_{VPDB}$  de azúcares y pulpa de los jugos de uva auténticos de las muestras 40 y 41 de la **Tabla 17**.

**Tabla 17.** Comparación de % Fruta, en un jugo, utilizando las diferentes ecuaciones.

Muestra	$\delta^{13}C_{VPDB}$ Azúcares	$\delta^{13}C_{VPDB}$ Pulpa	Diferencia ( $\delta^{13}C_{VPDB}$ Azúcares - $\delta^{13}C_{VPDB}$ Pulpa)	% Fruta con (Ec. 2)	% Fruta con (Ec. 4)	% Fruta con (Ec. 5)
Uva 40	- 24.74	- 24.85	- 0.11	100.00	100.99	91.34
Uva 41	- 27.50	- 27.48	0.02	100.00	101.65	110.31

Interpretación de los resultados de la **Tabla 17**.

Caso jugo de uva auténtico preparado en el laboratorio (evento 40):

Utilizando la ecuación 4 (**Ec. 4**), con el valor promedio de la diferencia de la  $\delta^{13}C_{VPDB}$  azúcares menos la  $\delta^{13}C_{VPDB}$  pulpa = - 0.24

$$\%Fruta = \frac{-24.74 - (-11.45)}{-24.85 - (-0.24) - (-11.45)} \times 100 \qquad \%Fruta = 100.99$$

Utilizando la ecuación 5 (**Ec. 5**), para jugos clarificados:

$$\%Fruta = \frac{-24.74 - (-11.45)}{-14.55} \times 100 \qquad \%Fruta = 91.34$$

Caso jugo de uva auténtico preparado en el laboratorio (evento 41):

Utilizando la ecuación 4 (**Ec. 4**), con el valor promedio de la diferencia de la  $\delta^{13}C_{VPDB}$  azúcares menos la  $\delta^{13}C_{VPDB}$  pulpa = - 0.24

$$\%Fruta = \frac{-27.50 - (-11.45)}{-27.48 - (-0.24) - (-11.45)} \times 100 \qquad \%Fruta = 101.65$$

Utilizando la ecuación 5 (**Ec. 5**), para jugos clarificados:

$$\%Fruta = \frac{-27.50 - (-11.45)}{-14.55} \times 100 \qquad \%Fruta = 110.31$$

Esto implica que el error o diferencia para jugos clarificados puede ser hasta de  $\pm 10.0$  % de contenido de fruta, ya que en el caso de los valores de las  $\delta^{13}C_{VPDB}$  Azúcares C3 del extremo mínimo del intervalo natural, la diferencia será positiva y en el extremo máximo del intervalo natural, la diferencia será negativa como lo observamos en los casos anteriores.

Cabe mencionar que con el fin de utilizar la misma terminología y sistemas de medición que la industria dedicada a la producción de jugos, se relaciona el porcentaje (%) de fruta obtenido con los métodos isotópicos con el parámetro de grados Brix (°Brix) de la fruta mediante la ecuación 6 (Ec. 6), (que esta presente en la NOM-173):

$$^{\circ}\text{Brix}_{\text{de Fruta}} = ^{\circ}\text{Brix}_{\text{Producto}} * \frac{\% \text{Fruta}}{100} \quad (\text{Ec. 6})$$

De tal manera que tenemos las siguientes equivalencias para un producto (jugo de fruta auténtico o jugo de fruta preenvasado) con un contenido de 12.0 °Brix:

**Tabla 18.** Equivalencias entre unidades.

Equivalencias		
% Fruta	$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}} \text{‰}$	°Brix
5.0	0.73	0.6
10.0	1.45	1.2

La equivalencia entre el per mil (‰), de la composición isotópica  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  y el porcentaje de fruta se calcula mediante regla de 3 simple, si - 14.55 ‰ corresponde a la referencia de autenticidad o sea al 100.0 % de fruta a cuanto corresponde el 5.0 % de fruta. También se puede obtener esta equivalencia directamente con la ecuación 4 (Ec. 4) y la equivalencia a °Brix con la ecuación 6 (Ec. 6). Nótese que el criterio de 2  $\sigma$  (0.98 ‰) calculado en la **Tabla 10** para plantas  $\text{C}_3$  corresponde al 6.74 % de fruta.

#### VII.6. Muestras comerciales de jugos de fruta.

En la **Tabla 19** y **Figura 8**, se muestran los resultados del porcentaje de fruta de 214 muestras de jugos envasados comercialmente, obtenidos a partir de los resultados de los análisis de la  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  de sus azúcares y pulpas, utilizando la ecuación 4 (Ec. 4) para los jugos con pulpa y la ecuación 5 (Ec. 5) para los jugos clarificados (indicados “Sin Pulpa”), en la cuarta columna [ $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  (‰) pulpa].

**Tabla 19.** Resultados de la relación isotópica de carbono ( $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ ), de azúcares y pulpa de jugos de fruta preenvasados y comercializados en el mercado nacional en el período de 2002 a 2006 de 14 diferentes especies botánicas.

Clave	Fruta del Jugo Preenvasado Comercializado	$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ (%) azúcares	$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ (‰) pulpa	% de Fruta en el Jugo, utilizando la (Ec. 4) y la (Ec. 5)
FOT 01	Cereza	-13.55	Sin Pulpa	14.43
FOT 02	Cereza	-13.18	Sin Pulpa	11.89
FOT 03	Ciruela	-24.04	-31.26	62.79
FOT 04	Ciruela	-23.88	-31.69	60.69
FOT 05	Ciruela Pasa	-24.17	-31.67	62.17
FOT 06	Durazno	-27.53	-28.14	94.98
FOT 07	Durazno	-15.42	-25.99	26.86
FOT 08	Durazno	-13.34	-26.12	12.68
FOT 09	Durazno	-13.06	-24.42	12.19
FOT 10	Durazno	-11.64	-23.09	1.60
FOT 11	Fresa	-11.11	-26.40	0.00
FOT 12	Guayaba	-13.26	-25.95	12.28
FOT 13	Guayaba	-13.09	-26.94	10.43
FOT 14	Guayaba	-12.94	-26.23	9.92
FOT 15	Guayaba	-12.93	-26.27	9.83
FOT 16	Guayaba	-12.83	-25.52	9.64
FOT 17	Guayaba	-12.66	-26.46	7.93
FOT 18	Guayaba	-12.63	-25.89	8.04
FOT 19	Guayaba	-12.61	-25.64	8.04
FOT 20	Guayaba	-12.33	-28.87	4.98
FOT 21	Guayaba	-12.17	-25.41	5.07
FOT 22	Guayaba	-12.01	-25.71	3.86
FOT 23	Guayaba	-11.94	-25.56	3.41
FOT 24	Guayaba	-11.91	-27.27	2.86
FOT 25	Limón	-12.71	-25.06	9.10
FOT 26	Limón	-12.28	-23.85	6.57
FOT 27	Mandarina	-22.75	-27.13	70.98
FOT 28	Mandarina	-20.60	-27.33	56.76
FOT 29	Mandarina	-20.13	-26.85	55.50
FOT 30	Mango	-13.17	-16.37	33.33
FOT 31	Mango	-13.47	-17.73	30.98
FOT 32	Mango	-14.24	-26.24	18.56
FOT 33	Mango	-13.38	-27.05	12.18
FOT 34	Mango	-13.04	Sin Pulpa	10.93
FOT 35	Mango	-12.81	-26.52	8.88
FOT 36	Mango	-12.05	-20.41	6.52

<b>FOT 37</b>	<b>Mango</b>	<b>-12.35</b>	<b>-26.45</b>	<b>5.91</b>
<b>FOT 38</b>	<b>Mango</b>	<b>-12.28</b>	<b>-26.40</b>	<b>5.46</b>
<b>FOT 39</b>	<b>Mango</b>	<b>-10.55</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>0.00</b>
<b>FOT 40</b>	<b>Mango</b>	<b>-10.56</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>0.00</b>
<b>FOT 41</b>	<b>Manzana</b>	<b>-25.97</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>99.79</b>
<b>FOT 42</b>	<b>Manzana</b>	<b>-25.01</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>93.20</b>
<b>FOT 43</b>	<b>Manzana</b>	<b>-24.73</b>	<b>-26.47</b>	<b>87.02</b>
<b>FOT 44</b>	<b>Manzana</b>	<b>-24.68</b>	<b>-26.45</b>	<b>86.81</b>
<b>FOT 45</b>	<b>Manzana</b>	<b>-24.39</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>88.93</b>
<b>FOT 46</b>	<b>Manzana</b>	<b>-24.39</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>88.93</b>
<b>FOT 47</b>	<b>Manzana</b>	<b>-21.50</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>69.07</b>
<b>FOT 48</b>	<b>Manzana</b>	<b>-21.46</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>68.80</b>
<b>FOT 49</b>	<b>Manzana</b>	<b>-22.66</b>	<b>-27.94</b>	<b>67.01</b>
<b>FOT 50</b>	<b>Manzana</b>	<b>-21.41</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>68.45</b>
<b>FOT 51</b>	<b>Manzana</b>	<b>-21.37</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>68.18</b>
<b>FOT 52</b>	<b>Manzana</b>	<b>-21.30</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>67.70</b>
<b>FOT 53</b>	<b>Manzana</b>	<b>-21.23</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>67.22</b>
<b>FOT 54</b>	<b>Manzana</b>	<b>-19.82</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>57.53</b>
<b>FOT 55</b>	<b>Manzana</b>	<b>-19.70</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>56.70</b>
<b>FOT 56</b>	<b>Manzana</b>	<b>-19.65</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>56.36</b>
<b>FOT 57</b>	<b>Manzana</b>	<b>-19.15</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>52.92</b>
<b>FOT 58</b>	<b>Manzana</b>	<b>-19.00</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>51.89</b>
<b>FOT 59</b>	<b>Manzana</b>	<b>-18.63</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>49.35</b>
<b>FOT 60</b>	<b>Manzana</b>	<b>-18.56</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>48.87</b>
<b>FOT 61</b>	<b>Manzana</b>	<b>-18.13</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>45.91</b>
<b>FOT 62</b>	<b>Manzana</b>	<b>-17.93</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>44.54</b>
<b>FOT 63</b>	<b>Manzana</b>	<b>-17.71</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>43.02</b>
<b>FOT 64</b>	<b>Manzana</b>	<b>-17.48</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>41.44</b>
<b>FOT 65</b>	<b>Manzana</b>	<b>-17.04</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>38.42</b>
<b>FOT 66</b>	<b>Manzana</b>	<b>-17.03</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>38.35</b>
<b>FOT 67</b>	<b>Manzana</b>	<b>-16.92</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>37.59</b>
<b>FOT 68</b>	<b>Manzana</b>	<b>-16.69</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>36.01</b>
<b>FOT 69</b>	<b>Manzana</b>	<b>-16.55</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>35.05</b>
<b>FOT 70</b>	<b>Manzana</b>	<b>-16.13</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>32.16</b>
<b>FOT 71</b>	<b>Manzana</b>	<b>-16.12</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>32.10</b>
<b>FOT 72</b>	<b>Manzana</b>	<b>-15.94</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>30.86</b>
<b>FOT 73</b>	<b>Manzana</b>	<b>-15.50</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>27.84</b>
<b>FOT 74</b>	<b>Manzana</b>	<b>-15.48</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>27.70</b>
<b>FOT 75</b>	<b>Manzana</b>	<b>-14.51</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>21.03</b>

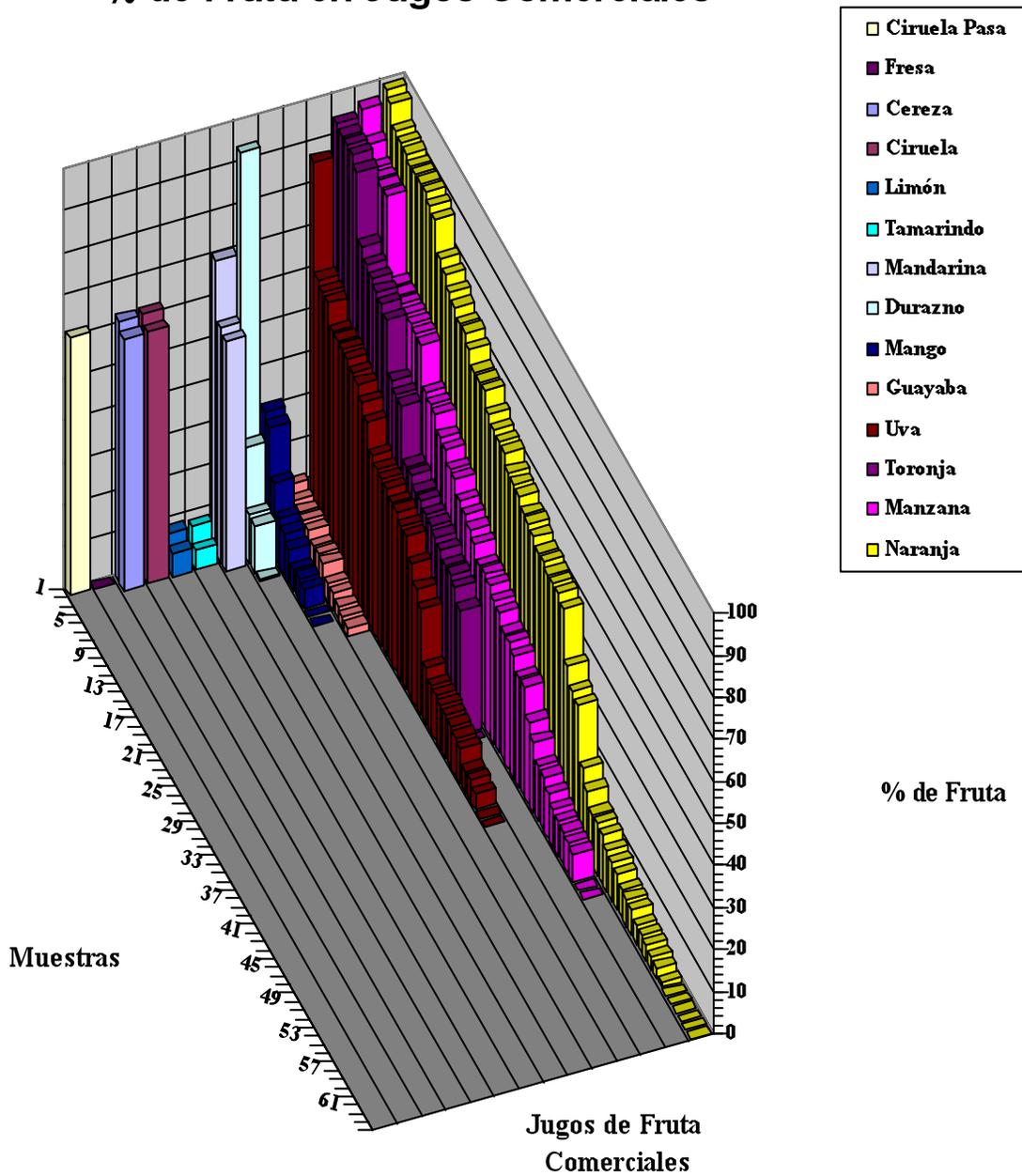
<b>FOT 76</b>	<b>Manzana</b>	<b>-14.11</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>18.28</b>
<b>FOT 77</b>	<b>Manzana</b>	<b>-13.56</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>14.50</b>
<b>FOT 78</b>	<b>Manzana</b>	<b>-13.48</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>13.95</b>
<b>FOT 79</b>	<b>Manzana</b>	<b>-13.20</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>12.03</b>
<b>FOT 80</b>	<b>Manzana</b>	<b>-12.92</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>10.10</b>
<b>FOT 81</b>	<b>Manzana</b>	<b>-12.81</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>9.35</b>
<b>FOT 82</b>	<b>Manzana</b>	<b>-12.75</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>8.93</b>
<b>FOT 83</b>	<b>Manzana</b>	<b>-12.66</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>8.32</b>
<b>FOT 84</b>	<b>Manzana</b>	<b>-12.59</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>7.84</b>
<b>FOT 85</b>	<b>Manzana</b>	<b>-10.83</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>0.00</b>
<b>FOT 86</b>	<b>Manzana</b>	<b>-11.02</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>0.00</b>
<b>FOT 87</b>	<b>Naranja</b>	<b>-26.28</b>	<b>-26.02</b>	<b>100.00</b>
<b>FOT 88</b>	<b>Naranja</b>	<b>-26.26</b>	<b>-26.18</b>	<b>98.93</b>
<b>FOT 89</b>	<b>Naranja</b>	<b>-25.92</b>	<b>-26.56</b>	<b>94.27</b>
<b>FOT 90</b>	<b>Naranja</b>	<b>-26.28</b>	<b>-27.08</b>	<b>93.45</b>
<b>FOT 91</b>	<b>Naranja</b>	<b>-25.71</b>	<b>-26.53</b>	<b>93.08</b>
<b>FOT 92</b>	<b>Naranja</b>	<b>-24.94</b>	<b>-25.84</b>	<b>92.21</b>
<b>FOT 93</b>	<b>Naranja</b>	<b>-25.19</b>	<b>-26.12</b>	<b>92.15</b>
<b>FOT 94</b>	<b>Naranja</b>	<b>-25.19</b>	<b>-26.12</b>	<b>92.15</b>
<b>FOT 95</b>	<b>Naranja</b>	<b>-24.92</b>	<b>-25.84</b>	<b>92.07</b>
<b>FOT 96</b>	<b>Naranja</b>	<b>-26.21</b>	<b>-27.45</b>	<b>90.89</b>
<b>FOT 97</b>	<b>Naranja</b>	<b>-25.79</b>	<b>-27.21</b>	<b>89.63</b>
<b>FOT 98</b>	<b>Naranja</b>	<b>-23.51</b>	<b>-25.86</b>	<b>82.32</b>
<b>FOT 99</b>	<b>Naranja</b>	<b>-23.04</b>	<b>-25.59</b>	<b>80.60</b>
<b>FOT 100</b>	<b>Naranja</b>	<b>-23.22</b>	<b>-26.23</b>	<b>78.36</b>
<b>FOT 101</b>	<b>Naranja</b>	<b>-23.47</b>	<b>-26.84</b>	<b>76.90</b>
<b>FOT 102</b>	<b>Naranja</b>	<b>-23.04</b>	<b>-26.67</b>	<b>74.97</b>
<b>FOT 103</b>	<b>Naranja</b>	<b>-23.04</b>	<b>-26.67</b>	<b>74.97</b>
<b>FOT 104</b>	<b>Naranja</b>	<b>-22.34</b>	<b>-26.11</b>	<b>73.09</b>
<b>FOT 105</b>	<b>Naranja</b>	<b>-22.49</b>	<b>-27.08</b>	<b>69.57</b>
<b>FOT 106</b>	<b>Naranja</b>	<b>-22.22</b>	<b>-26.72</b>	<b>69.44</b>
<b>FOT 107</b>	<b>Naranja</b>	<b>-21.85</b>	<b>-26.18</b>	<b>69.47</b>
<b>FOT 108</b>	<b>Naranja</b>	<b>-21.88</b>	<b>-27.06</b>	<b>65.80</b>
<b>FOT 109</b>	<b>Naranja</b>	<b>-21.57</b>	<b>-26.99</b>	<b>64.13</b>
<b>FOT 110</b>	<b>Naranja</b>	<b>-19.77</b>	<b>-24.30</b>	<b>63.56</b>
<b>FOT 111</b>	<b>Naranja</b>	<b>-21.20</b>	<b>-26.76</b>	<b>62.70</b>
<b>FOT 112</b>	<b>Naranja</b>	<b>-19.92</b>	<b>-25.30</b>	<b>60.11</b>
<b>FOT 113</b>	<b>Naranja</b>	<b>-19.73</b>	<b>-25.16</b>	<b>59.35</b>
<b>FOT 114</b>	<b>Naranja</b>	<b>-20.18</b>	<b>-26.09</b>	<b>58.67</b>

<b>FOT 115</b>	<b>Naranja</b>	<b>-19.85</b>	<b>-26.12</b>	<b>56.34</b>
<b>FOT 116</b>	<b>Naranja</b>	<b>-19.87</b>	<b>-26.21</b>	<b>56.13</b>
<b>FOT 117</b>	<b>Naranja</b>	<b>-20.08</b>	<b>-26.92</b>	<b>54.93</b>
<b>FOT 118</b>	<b>Naranja</b>	<b>-19.34</b>	<b>-26.06</b>	<b>53.13</b>
<b>FOT 119</b>	<b>Naranja</b>	<b>-19.34</b>	<b>-26.06</b>	<b>53.13</b>
<b>FOT 120</b>	<b>Naranja</b>	<b>-19.20</b>	<b>-26.09</b>	<b>52.08</b>
<b>FOT 121</b>	<b>Naranja</b>	<b>-19.20</b>	<b>-26.09</b>	<b>52.08</b>
<b>FOT 122</b>	<b>Naranja</b>	<b>-19.36</b>	<b>-26.51</b>	<b>51.70</b>
<b>FOT 123</b>	<b>Naranja</b>	<b>-18.88</b>	<b>-26.08</b>	<b>49.97</b>
<b>FOT 124</b>	<b>Naranja</b>	<b>-17.24</b>	<b>-26.20</b>	<b>38.63</b>
<b>FOT 125</b>	<b>Naranja</b>	<b>-16.60</b>	<b>-26.15</b>	<b>34.47</b>
<b>FOT 126</b>	<b>Naranja</b>	<b>-16.36</b>	<b>-25.95</b>	<b>33.31</b>
<b>FOT 127</b>	<b>Naranja</b>	<b>-14.51</b>	<b>-26.31</b>	<b>20.26</b>
<b>FOT 128</b>	<b>Naranja</b>	<b>-12.30</b>	<b>-15.68</b>	<b>19.02</b>
<b>FOT 129</b>	<b>Naranja</b>	<b>-13.40</b>	<b>-25.86</b>	<b>13.31</b>
<b>FOT 130</b>	<b>Naranja</b>	<b>-13.36</b>	<b>-25.68</b>	<b>13.20</b>
<b>FOT 131</b>	<b>Naranja</b>	<b>-13.13</b>	<b>-24.72</b>	<b>12.44</b>
<b>FOT 132</b>	<b>Naranja</b>	<b>-13.06</b>	<b>-26.08</b>	<b>10.83</b>
<b>FOT 133</b>	<b>Naranja</b>	<b>-12.94</b>	<b>-26.04</b>	<b>10.05</b>
<b>FOT 134</b>	<b>Naranja</b>	<b>-12.87</b>	<b>-26.77</b>	<b>9.13</b>
<b>FOT 135</b>	<b>Naranja</b>	<b>-12.40</b>	<b>-23.50</b>	<b>7.73</b>
<b>FOT 136</b>	<b>Naranja</b>	<b>-12.53</b>	<b>-25.79</b>	<b>7.41</b>
<b>FOT 137</b>	<b>Naranja</b>	<b>-12.42</b>	<b>-25.00</b>	<b>7.03</b>
<b>FOT 138</b>	<b>Naranja</b>	<b>-12.11</b>	<b>-23.19</b>	<b>5.51</b>
<b>FOT 139</b>	<b>Naranja</b>	<b>-11.99</b>	<b>-21.35</b>	<b>5.33</b>
<b>FOT 140</b>	<b>Naranja</b>	<b>-12.05</b>	<b>-23.72</b>	<b>4.80</b>
<b>FOT 141</b>	<b>Naranja</b>	<b>-11.10</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>0.00</b>
<b>FOT 142</b>	<b>Naranja</b>	<b>-11.91</b>	<b>-24.93</b>	<b>3.35</b>
<b>FOT 143</b>	<b>Naranja</b>	<b>-11.70</b>	<b>-22.91</b>	<b>2.14</b>
<b>FOT 144</b>	<b>Naranja</b>	<b>-11.66</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>1.44</b>
<b>FOT 145</b>	<b>Naranja</b>	<b>-12.70</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>8.59</b>
<b>FOT 146</b>	<b>Naranja</b>	<b>-12.66</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>8.32</b>
<b>FOT 147</b>	<b>Naranja</b>	<b>-12.03</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>3.99</b>
<b>FOT 148</b>	<b>Naranja</b>	<b>-13.31</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>12.78</b>
<b>FOT 149</b>	<b>Naranja</b>	<b>-12.13</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>4.67</b>
<b>FOT 150</b>	<b>Tamarindo</b>	<b>-12.96</b>	<b>-28.08</b>	<b>8.95</b>
<b>FOT 151</b>	<b>Tamarindo</b>	<b>-12.32</b>	<b>-27.27</b>	<b>5.42</b>
<b>FOT 152</b>	<b>Toronja</b>	<b>-26.36</b>	<b>-26.83</b>	<b>95.45</b>
<b>FOT 153</b>	<b>Toronja</b>	<b>-26.42</b>	<b>-27.07</b>	<b>94.39</b>

<b>FOT 154</b>	<b>Toronja</b>	<b>-26.42</b>	<b>-27.07</b>	<b>94.39</b>
<b>FOT 155</b>	<b>Toronja</b>	<b>-26.51</b>	<b>-27.24</b>	<b>93.95</b>
<b>FOT 156</b>	<b>Toronja</b>	<b>-24.63</b>	<b>-25.49</b>	<b>92.30</b>
<b>FOT 157</b>	<b>Toronja</b>	<b>-22.96</b>	<b>-26.28</b>	<b>76.38</b>
<b>FOT 158</b>	<b>Toronja</b>	<b>-22.91</b>	<b>-26.70</b>	<b>73.98</b>
<b>FOT 159</b>	<b>Toronja</b>	<b>-22.33</b>	<b>-26.18</b>	<b>72.68</b>
<b>FOT 160</b>	<b>Toronja</b>	<b>-22.25</b>	<b>-26.29</b>	<b>71.62</b>
<b>FOT 161</b>	<b>Toronja</b>	<b>-21.99</b>	<b>-26.11</b>	<b>70.74</b>
<b>FOT 162</b>	<b>Toronja</b>	<b>-21.66</b>	<b>-25.97</b>	<b>69.17</b>
<b>FOT 163</b>	<b>Toronja</b>	<b>-20.12</b>	<b>-26.52</b>	<b>56.63</b>
<b>FOT 164</b>	<b>Toronja</b>	<b>-20.01</b>	<b>-26.68</b>	<b>55.33</b>
<b>FOT 165</b>	<b>Toronja</b>	<b>-19.89</b>	<b>-26.64</b>	<b>54.70</b>
<b>FOT 166</b>	<b>Toronja</b>	<b>-18.06</b>	<b>-26.88</b>	<b>42.18</b>
<b>FOT 167</b>	<b>Toronja</b>	<b>-17.91</b>	<b>-26.57</b>	<b>42.06</b>
<b>FOT 168</b>	<b>Toronja</b>	<b>-17.57</b>	<b>-26.44</b>	<b>40.18</b>
<b>FOT 169</b>	<b>Toronja</b>	<b>-17.57</b>	<b>-26.44</b>	<b>40.18</b>
<b>FOT 170</b>	<b>Toronja</b>	<b>-17.51</b>	<b>-26.78</b>	<b>38.92</b>
<b>FOT 171</b>	<b>Toronja</b>	<b>-17.26</b>	<b>-26.33</b>	<b>38.43</b>
<b>FOT 172</b>	<b>Toronja</b>	<b>-17.21</b>	<b>-26.54</b>	<b>37.57</b>
<b>FOT 173</b>	<b>Toronja</b>	<b>-17.14</b>	<b>-26.72</b>	<b>36.69</b>
<b>FOT 174</b>	<b>Toronja</b>	<b>-16.75</b>	<b>-26.40</b>	<b>34.89</b>
<b>FOT 175</b>	<b>Toronja</b>	<b>-16.75</b>	<b>-26.40</b>	<b>34.89</b>
<b>FOT 176</b>	<b>Toronja</b>	<b>-16.42</b>	<b>-25.93</b>	<b>33.76</b>
<b>FOT 177</b>	<b>Toronja</b>	<b>-16.90</b>	<b>-29.16</b>	<b>30.36</b>
<b>FOT 178</b>	<b>Toronja</b>	<b>-12.22</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>5.29</b>
<b>FOT 179</b>	<b>Uva</b>	<b>-25.54</b>	<b>-27.26</b>	<b>87.79</b>
<b>FOT 180</b>	<b>Uva</b>	<b>-20.66</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>63.30</b>
<b>FOT 181</b>	<b>Uva</b>	<b>-20.52</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>62.34</b>
<b>FOT 182</b>	<b>Uva</b>	<b>-20.45</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>61.86</b>
<b>FOT 183</b>	<b>Uva</b>	<b>-19.73</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>56.91</b>
<b>FOT 184</b>	<b>Uva</b>	<b>-19.72</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>56.84</b>
<b>FOT 185</b>	<b>Uva</b>	<b>-19.70</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>56.70</b>
<b>FOT 186</b>	<b>Uva</b>	<b>-19.67</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>56.49</b>
<b>FOT 187</b>	<b>Uva</b>	<b>-19.47</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>55.12</b>
<b>FOT 188</b>	<b>Uva</b>	<b>-19.39</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>54.57</b>
<b>FOT 189</b>	<b>Uva</b>	<b>-19.06</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>52.30</b>
<b>FOT 190</b>	<b>Uva</b>	<b>-18.66</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>49.55</b>
<b>FOT 191</b>	<b>Uva</b>	<b>-17.77</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>43.44</b>
<b>FOT 192</b>	<b>Uva</b>	<b>-17.57</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>42.06</b>

<b>FOT 193</b>	<b>Uva</b>	<b>-17.53</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>41.79</b>
<b>FOT 194</b>	<b>Uva</b>	<b>-17.48</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>41.44</b>
<b>FOT 195</b>	<b>Uva</b>	<b>-17.30</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>40.21</b>
<b>FOT 196</b>	<b>Uva</b>	<b>-17.29</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>40.14</b>
<b>FOT 197</b>	<b>Uva</b>	<b>-17.09</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>38.76</b>
<b>FOT 198</b>	<b>Uva</b>	<b>-17.02</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>38.28</b>
<b>FOT 199</b>	<b>Uva</b>	<b>-16.38</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>33.88</b>
<b>FOT 200</b>	<b>Uva</b>	<b>-15.78</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>29.76</b>
<b>FOT 201</b>	<b>Uva</b>	<b>-15.38</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>27.01</b>
<b>FOT 202</b>	<b>Uva</b>	<b>-13.58</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>14.64</b>
<b>FOT 203</b>	<b>Uva</b>	<b>-13.23</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>12.23</b>
<b>FOT 204</b>	<b>Uva</b>	<b>-13.18</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>11.89</b>
<b>FOT 205</b>	<b>Uva</b>	<b>-13.17</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>11.82</b>
<b>FOT 206</b>	<b>Uva</b>	<b>-13.13</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>11.55</b>
<b>FOT 207</b>	<b>Uva</b>	<b>-13.03</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>10.86</b>
<b>FOT 208</b>	<b>Uva</b>	<b>-12.92</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>10.10</b>
<b>FOT 209</b>	<b>Uva</b>	<b>-12.84</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>9.55</b>
<b>FOT 210</b>	<b>Uva</b>	<b>-12.34</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>6.12</b>
<b>FOT 211</b>	<b>Uva</b>	<b>-12.32</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>5.98</b>
<b>FOT 212</b>	<b>Uva</b>	<b>-12.13</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>4.67</b>
<b>FOT 213</b>	<b>Uva</b>	<b>-11.08</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>0.00</b>
<b>FOT 214</b>	<b>Uva</b>	<b>-10.94</b>	<b>Sin Pulpa</b>	<b>0.00</b>

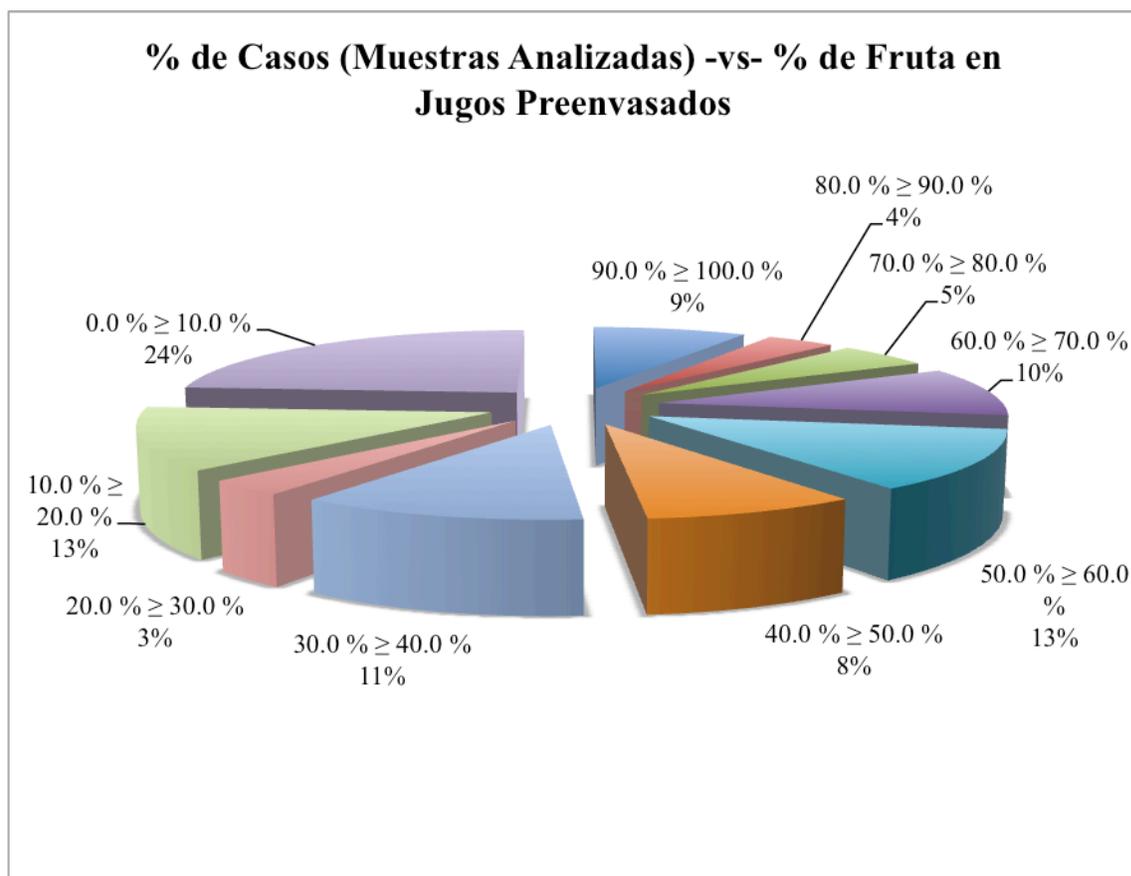
## % de Fruta en Jugos Comerciales



**Figura 8.** Porcentaje de fruta en base al análisis de la composición isotópica de carbono ( $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ ), de 214 muestras de jugos de frutas preenvasados clasificados por especie botánica (14), comercializados en el mercado nacional en el período de 2002 a 2006.

Como puede observarse en la **Figura 8**, la autenticidad de los jugos de fruta preenvasados que se comercializaron en el país (de 2002 a 2006), simplemente no estaba presente.

Además se hizo un comparativo entre el porcentaje de fruta en los jugos preenvasados en el período de 2002 a 2006, tomando en cuenta el porcentaje de casos (muestras analizadas), que describo en la **Figura 9**.

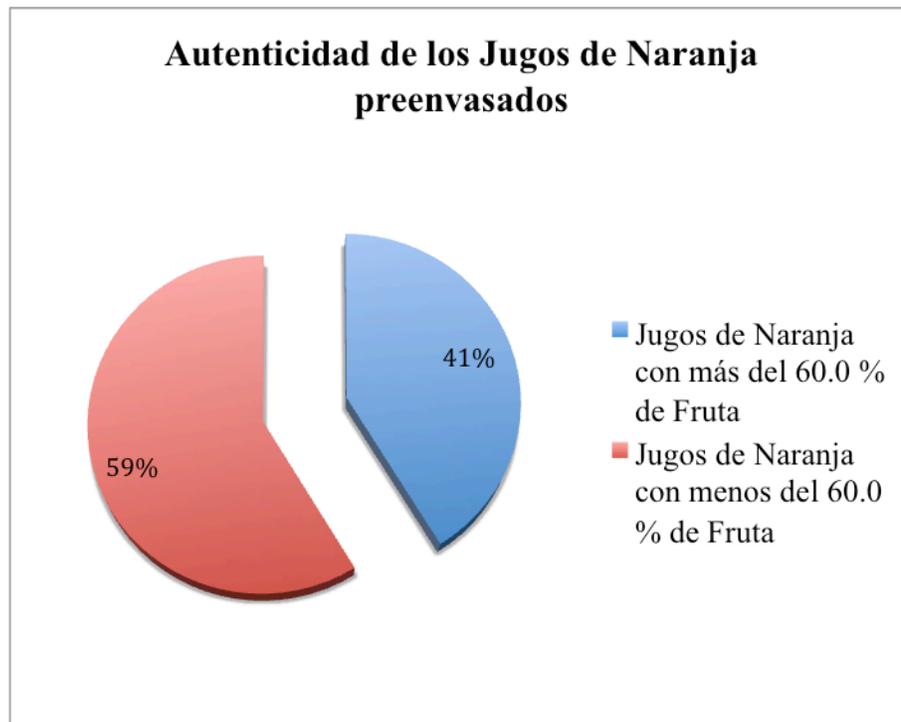


**Figura 9.** Porcentaje de fruta en base al análisis de la relación isotópica de carbono ( $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ ), del 100% (214 muestras) de jugos de frutas preenvasados, que se determinaron y se encontraban en el mercado nacional en el período de 2002 a 2006.

Al analizar esta distribución, lamentablemente se encontró que solo el 9.0 % de las muestras analizadas podría considerarse jugos preenvasados al 100.0 % (auténticos), mientras que el 91.0 % restante no cumplía con esta condición que se presumía en el etiquetado.

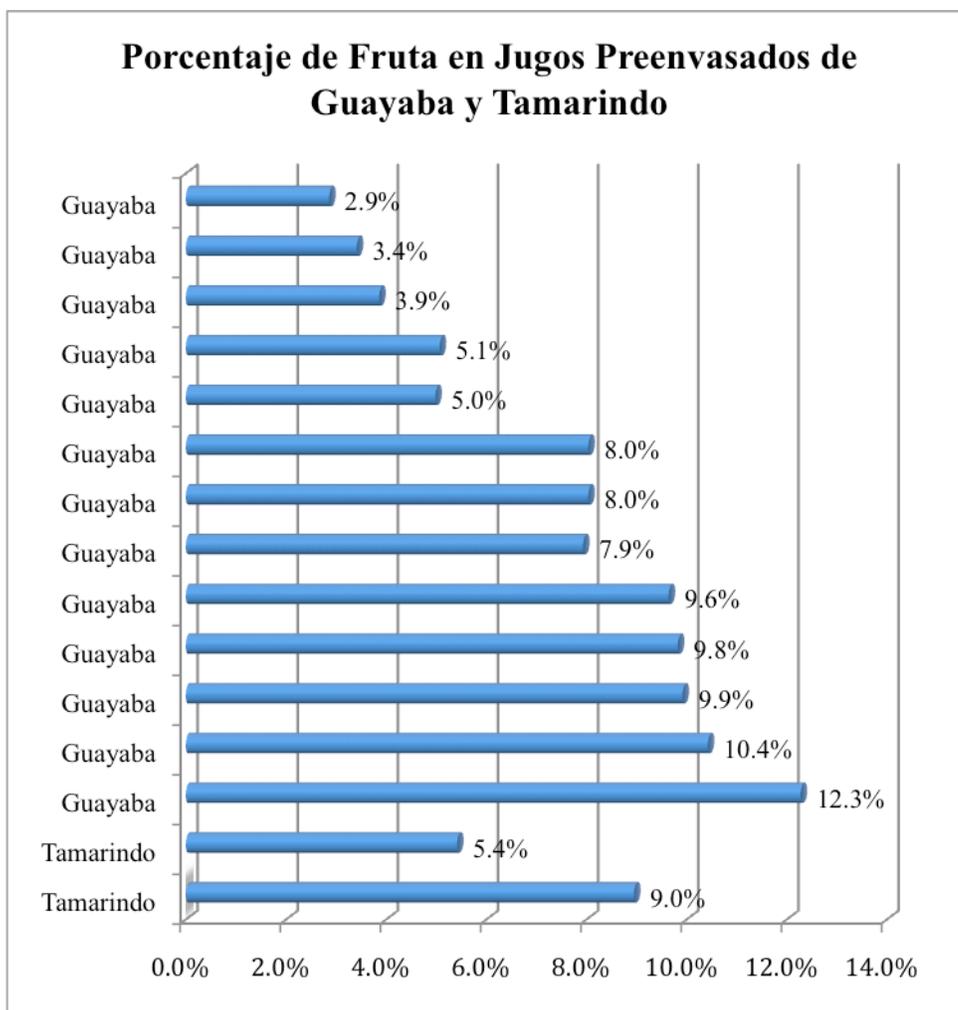
Por último, tomando tres ejemplos por especie botánica se encuentra lo siguiente:

En el caso de los jugos preenvasados de naranja se puede observar la siguiente distribución de “Autenticidad”: el 59.0 % de los jugos de naranja preenvasados contenían menos del 60.0 % de jugo de fruta (naranja), **Figura 10**.



**Figura 10.** Autenticidad de los jugos de naranja preenvasados antes de que la norma del método de prueba fuera aceptado.

Por otra parte visualizamos que la autenticidad de los jugos preenvasados de tamarindo y guayaba eran menores del 13.0 % de fruta, como se describe en la **Figura 11**.



**Figura 11.** “Autenticidad” de los jugos de guayaba y tamarindo preenvasados antes de que el método de prueba de la Norma NOM-173 fuera aceptado.

## VIII. CRITERIOS DE AUTENTICIDAD.

Los criterios que se establecieron con el objeto de asegurar la autenticidad de un jugo preenvasado etiquetado como 100.0 % jugo, son:

- a. La  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  en pulpa se debe encontrar en el intervalo natural de plantas  $\text{C}_3$  (- 28.50 ‰ – 24.00 ‰).
- b. La diferencia numérica de ( $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  en pulpa -  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  en azúcares) debe ser menor que 1.0 ‰ (criterio de  $\bar{X} + 2\sigma$ ) y los valores de la  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  en azúcares y en pulpa encontrarse en los intervalos de las plantas  $\text{C}_3$ . En este caso, al aplicar la ecuación 4, puede resultar un valor de 98.0 % o inclusive mayor al 100.0 %.
- c. Si la diferencia numérica de ( $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  en pulpa -  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  en azúcares) es mayor que 1.0 ‰ se puede aplicar la ecuación 4 (Ec. 4), para determinar el % azúcares (sólidos disueltos) de la fruta el cual podrá tener un error hasta del 5.0 %.
- d. Si la  $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$  en pulpa no se encuentra en el intervalo de plantas  $\text{C}_3$  y/o no tiene el valor correspondiente ( $\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}$ ) de la presencia de nitrógeno entonces la pulpa no se puede utilizar como patrón interno y no se podrá emplear la ecuación 3. Ya que implica la adición de espesantes (derivados de la celulosa).
- e. Para jugos clarificados (sin pulpa) se emplea la ecuación 5 para determinar el % de azúcares de la fruta el cual podrá tener hasta un error del 10.0 % de fruta.

El criterio de  $\bar{X} + 2\sigma = 0.98$  ‰, se aproximó a la unidad (1.00 ‰), para efectos prácticos y proporciona una zona de seguridad en la toma de decisión de la autenticidad (nivel de confianza del 95.0 %) de caracterizar a un jugo preenvasado como no auténtico (falsos negativos).

### Reporte de resultados.

En el caso de la Norma, para el reporte de resultados se empleará el formato sugerido en la NMX—EC-17025-IMNC-2000 “Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración”.

## IX. CONCLUSIONES

El esfuerzo de este trabajo, así como el del Laboratorio de Isótopos Estables del Instituto de Geología de la UNAM, ha cumplido con su objetivo al ser aprobado como método de prueba de la Norma Oficial Mexicana NOM-173-SCFI-2009 para determinar la autenticidad de los jugos preenvasados de fruta.

Por otro lado cabe hacer hincapié que la aprobación de dicha norma apoya a los esfuerzos internacionales para promover y proteger a la industria de jugos de frutas en México y mejorar la calidad de los productos que se ofrecen al consumidor final.

En el 2008, el Proyecto de Norma PROY-NOM-173-SCFI-2008, se publicó en idioma inglés en el Diario Oficial de la Federación (3 de diciembre de 2008) para su consulta pública nacional e internacional, siendo la base legal para las exportaciones e importaciones de jugos de fruta preenvasados.

El impacto que ha tenido la implementación del método isotópico como método de prueba de la NOM-173-SCFI-2009 puede apreciarse al realizar el comparativo de los estudios de calidad de jugos de frutas preenvasados (autenticidad como criterio principal), realizados por la Procuraduría Federal del Consumidor (PROFECO) y publicados en la Revista del Consumidor, proporcionando la siguiente información:

- a) Revista del Consumidor, número 309 (noviembre de 2002). De las 31 marcas analizadas más del 50 %, no podían ser consideradas jugos de frutas.
- b) Revista del Consumidor, número 354 (agosto de 2006). De 44 marcas analizadas, el 70.0 % de los jugos sustituye parte de los azúcares de la fruta por azúcares de otro origen (aquí se enfatizó la necesidad de una NOM que corrigiera el desorden y evitara los abusos que se presentaban).
- c) Revista del Consumidor, número 425 (julio de 2012). De 28 marcas de jugo de naranja, uva y manzana comercializadas en todo el país; todas cumplieron con lo exigido en la NOM-173-SCFI-2009, al poder ser considerados como jugos (con algunas desviaciones tolerables).

Por lo que puedo decir que este esfuerzo realizado de tener un método de prueba para determinar la autenticidad de los jugos preenvasados ha visto resultados positivos en beneficio de los consumidores finales.

Para desalentar las prácticas fraudulentas y lucrativas que implican el deterioro de la calidad en un producto, en este caso los jugos de frutas preenvasados, es necesario estar alerta de la revisión y vigencia de la Norma Oficial Mexicana NOM-173-SCFI-2009 (Ya que las normas oficiales mexicanas deberán ser revisadas cada 5 años a partir de la fecha de su entrada en vigor, debiendo notificarse al secretariado técnico de la Comisión Nacional de Normalización los resultados de la revisión, dentro de los 60 días naturales posteriores a la terminación del período quinquenal correspondiente. De no hacerse la notificación, las normas perderán su vigencia y las dependencias que las hubieren expedido deberán publicar su cancelación en el Diario Oficial de la Federación. La Comisión podrá solicitar a la dependencia dicha cancelación).

Se considera finalmente la importancia de continuar con los estudios de calidad y desarrollar la metodología alterna de isótopos estables para caracterizar individualmente cada uno de los azúcares (perfil de azúcares) presentes en los jugos de fruta natural auténticos y así mejorar la sensibilidad del método; ya que con esta metodología pueden detectarse cantidades mínimas de adulterantes ( $\cong 5.0\%$ ) en jugos de frutas de plantas  $C_3$  (Day, 2011) y adulteración en jugos de fruta de plantas CAM (González, 1999).

El método analítico desarrollado en este trabajo para determinar la autenticidad de un jugo de fruta cuenta con características superiores al utilizado en la Norma Oficial Mexicana NOM-173-SCFI-2009 las cuales se restringieron por razones políticas y económicas. El uso de la composición isotópica de la pulpa como patrón interno permite obtener una precisión y capacidad de detección de adulteración menor al  $5.0\%$ , e incluso es posible no solo documentar la autenticidad de un jugo, sino obtener el porcentaje de fruta contenida, siempre y cuando se conozcan todos los compuestos que estén presentes en los jugos.

## X. BIBLIOGRAFIA.

- A Laboratory Quality Handbook of Best Practices. Edited by Donald C, Singer. ASQ American Society for Quality, 2001.
- 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
- Bricout, J. and Koziat, J. Control of the Authenticity of Orange Juice by Isotopic Analysis. *J. Agric. Food Chem.* 1987, 35, 758-760.
- Chang, T.-L., and Li, W. 1990, A calibrated measurement of the atomic weight of carbon. *Chinese Science Bulletin*, v. 35, p. 290-296.
- Cienfuegos Edith, Casar Isabel y Morales Pedro, (1998). "Carbon isotopic composition of Mexican honey". *Journal of Apicultural Research* 36(3/4): 169 - 179
- CODEX STAN 247-2005 Norma General del Codex para Zumos (Jugos) y Néctares de Frutas.
- Coplen, T. B, Brand W. A., Gehre M., Gröning M., Meijer-Harro A. J., Toman B., Verkouteren, R. M. After two decades a second anchor for the VPDB  $\delta^{13}\text{C}$  scale, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2006, 20: 3165-3166.
- Coplen, T. B, Brand W. A., Gehre, M., Gröning, M., Meijer-Harro, A. J., Toman, B., Verkouteren, R. M. New Guidelines for  $\delta^{13}\text{C}$  Measurements, *Analytical Chemistry* 2006, 78: 2439-2441.
- Coplen, Tyler. Normalization of oxygen and hydrogen isotope data, *Chemical Geology* (Isotope Geoscience Section), 1988, 72: 293-297.
- Craig Harmon. (1953). The geochemistry of stable carbon isotopes. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 3: 53 – 92.
- Craig, Harmon. Isotopic Standards for Carbon and Oxygen and correction factors for mass – spectrometric analysis of carbon dioxide, *Geochimica et Cosmochimica Acta* 1957, 12: 133–149.
- Day, M. P., Correia P., Hammond D. A.  $^{13}\text{C}$ -IRIS ( $^{13}\text{C}$ - Isotope Relation of Individual Sugars): An Improved Method to detect the addition of low levels of  $\text{C}_4$ -Derived Sugars to Juices. *J. Of AOAC International* (2001) 84, 3, 957-963.
- DesMaris, D. J. and Hayes, J.M. (1976). Tube cracker for opening glass Sealed ampoules under vacuum. *Analytical Chem.* 48: 1651 – 1652.
- Doner, L. W., Ajie, H. O., Sternberg, L. S. L., Milburn, J. M., DeNiro, M. J. And Hicks, K. B. Detecting Sugar Beet Syrups in Orange Juice by D/H and ( $^{18}\text{O}$  /  $^{16}\text{O}$ ) Analysis of Sucrose. *J. Agric. Food Chem.* 1987, 35, 610-612.
- Eichholz, G. G., Poston, J. W. Principles of Nuclear Radiation Detection. Ann Arbor Science Publishers. Third Printing, 1985.
- Elflein L., Raezke K. P. Improved detection of honey adulteration by measuring differences between  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  stable carbon isotope ratios of protein and sugar compounds with a combination of elemental analyzer - isotope ratio mass spectrometry and liquid chromatography - isotope ratio mass. *Apidologie* (2008) 39-574-587.
- EURACHEM / CITAC Guide\* Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement Second Edition. QUAM:2000.1

- EURACHEM Guide. The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, EURACHEM, United Kingdom, First English Edition 1998.
- Fruit and vegetable juices - Determination of the stable carbon isotope ratio ( $^{13}\text{C} / ^{12}\text{C}$ ) of sugars from fruit juices – Method using isotope ratio mass spectrometry. European Prestandard. ENV 12140. October 1996.
- Fruit and vegetable juices - Determination of the stable carbon isotope ratio ( $^{13}\text{C} / ^{12}\text{C}$ ) in the pulp of fruit juices – Method using isotope ratio mass spectrometry. European Prestandard. ENV 13070. May 1998.
- Fruit and vegetable juices - Determination of the stable oxygen isotope ratio ( $^{18}\text{O} / ^{16}\text{O}$ ) of water from fruit juices – Method using isotope ratio mass spectrometry. European Prestandard. ENV 12141. October 1996.
- González J., Remaud G., Jamin E., Naulet N., Martin G.G. Specific Natural Isotope Profile Studied by Isotope Ratio Mass Spectrometry (SNIP-IRMS):  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  Ratios of Fructose, Glucose, and Sucrose for Improved Detection of Sugar addition to Pineapple juices and Concentrates. *J. Agric. Food Chem.* (1999), 47, 2316-2321.
- Gonzalez, J., Jamin, E., Remaud, G., Martin, Y-L., Martin, G.G. and Martin, M. L. Authentication of Lemon Juices and Concentrates by a Combined Multi-isotope Approach Using SNIF-NMR and IRMS. *J. Agric. Food Chem.* 1998, 46, 2200-2205.
- Guillou C., Koziat J., Rossmann A., Martin G. J. Determination of the  $^{13}\text{C}$  content of organic acid and sugars in fruit juices: an inter-comparison study. *Analytica Chimica Acta*, 388 (1999)137-143.
- Handbook of indices of Food Quality and Authenticity. Woodhead Publishing, 1997.
- ISO 10012-2, QUALITY assurance requirements for measuring equipment-Part 2: Guidelines for control of measurement processes.
- ISO/IEC 17025:1999, General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
- ISO/IEC Directives, Part 2. Rules for the structure and drafting of International Standards. Fourth edition, 2001.
- ISO/TR 10017, Guidance on statistical techniques for ISO 9001-1994, First edition 1999-09-01.
- Jamin, E., Gonzalez, J., Remaud, G., Naulet, N. and Martin, G. G. Detection of Exogenous Sugar or Acids Addition in Pineapple Juices and Concentrates by  $^{13}\text{C}$  IRMS Analysis. *J. Agric. Food Chem.* 1997, 45, 3961-3967.
- Jamin, E., Gonzalez, J., Remaud, G., Naulet, N., Martin, G.G., Weber, D., Rossmann, A., Schmidt, H.-L. Improved detection of sugar addition to apple juices and concentrates using internal standard  $^{13}\text{C}$  IRMS Analysis. *Analytica Chimica Acta*, 347 (1997) 359-368.
- Koziat, J., Rossmann, A., Martin, G. J., Ashurst, P. R. Determination of carbon-13 content of sugars of fruit and vegetables juices, A European inter-laboratory comparison. *Analytica Chimica Acta*, 271 (1993) 31-38.
- LEY FEDERAL SOBRE METROLOGÍA Y NORMALIZACIÓN. Nueva Ley publicada en el Diario Oficial de la Federación el 1º de julio de 1992. TEXTO VIGENTE. Última reforma publicada DOF 09-04-2012
- McCrea J. M. “On the Isotopic Chemistry of Carbonates and Paleotemperature Scale”. *The Journal of Chemical Physics* 1950 Vol. 18, No. 6 June, pp 849-857.

- Miller, I. – Freund, J. E., Probabilidad y Estadística para Ingenieros. Tercera Edición. Prentice Hall Hispanoamericana. 1989. Pag. 364 – 413.
- NMX-EC-17025-IMNC-2000, Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración. 2000-12-20.
- Reglamento de Control Sanitario de Productos y Servicios VII.1
- Rosman, K. J. R., and Taylor, P. D. P., 1998. Isotopic compositions of the elements, 1997: Pure and Applied Chemistry, v.70, p. 217-235.
- Rossmann, A., Koziat, J., Martin, G. J., Dennis, M. J. Determination of carbon-13 content of sugars and pulp from fruit juices by isotope-ratio mass spectrometry (internal reference method), A European inter-laboratory comparison. *Analytica Chimica Acta*, 340 (1997) 21-29.
- Rossmann, A., Koziat, J., Martin, G. J., Dennis, M. J. Determination of carbon-13 content of sugars and pulp from fruit juices by isotope-ratio mass spectrometry (internal reference method), A European inter-laboratory comparison. *Analytica Chimica Acta*, 340 (1997) 21-29.
- Revista del Consumidor, numero 309 publicada por PROFECO. Noviembre de 2002.
- Revista del Consumidor, numero 354 publicada por PROFECO. Agosto de 2006. Pag. 28 – 37.
- Revista del Consumidor, numero 425 publicada por PROFECO. Julio de 2012. Pag. 40 – 47.
- Schmidt H. L., Butzenlencher M., Rossmann A., Schwarz S., Kexel H., Kempe K. Inter- and intramolecular isotope correlations in organic compounds as a criterion for authenticity identification and origin assignment. *Z Lebensm Unters Forsh* 196 (1993) 105-110.
- Simpkins, W. A., Patel, G., Harrison, M., Goldberg, D. Stable carbon isotope ratio analysis of Australian orange juices. *Food Chemistry* 70 (2000) 385-390.
- Troughton, J. H. Carbon isotope fraction in plants. Proc. 8th Conf., Ratio carbon dating, Wellington 1972. 2. pp 39-57.
- Vocabulario Internacional de Metrología - Conceptos fundamentales y generales, y términos asociados (VIM)..JCGM 200:2008. 1ª Edición en español, 2008. Traducción al español del VIM-3ª. Marzo 2009.
- Wada, E., et al eds. Kyoto University Press., Kyoto. Environmental effects on carbon isotope fractionation in terrestrial plants. *Stable isotopes in the biosphere*. (1995) 78 – 91.
- Wagner, S., Vreca, P. Leis, A. and Boechzelta, H., Carbon isotope ratio analysis of authentic and commercial Essentials oils of lemon balm. *Natural Products Communications*. Volume 3, Issue 7, 2008, Pages 1165 – 1170.

## XI. ANEXOS.

### A) DEFINICIONES.

Normalización: es el proceso mediante el cual se regulan las actividades desempeñadas por los sectores tanto privado como público, en materia de salud, medio ambiente, seguridad al usuario, información comercial, prácticas de comercio, industrial y laboral a través del cual se establecen la terminología, la clasificación, las directrices, las especificaciones, los atributos, las características, los métodos de prueba o las prescripciones aplicables a un producto, proceso o servicio. Los principios básicos en el proceso de normalización son: representatividad, consenso, consulta pública, modificación y actualización.

Norma Oficial Mexicana (NOM): es la regulación técnica de observancia obligatoria expedida por las dependencias normalizadoras competentes a través de sus respectivos Comités Consultivos Nacionales de Normalización, conforme al artículo 40 de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización (LFMN), la cual establece reglas, especificaciones, atributos, directrices, características o prescripciones aplicables a un producto, proceso, instalación, sistema, actividad, servicio o método de producción u operación, así como aquellas relativas a terminología, simbología, embalaje, marcado o etiquetado.

Norma Mexicana (NMX): la que elabore un organismo nacional de normalización, ó la Secretaria de Economía en ausencia de ellos, conforme el artículo 54 de la LFMN, la cual prevé para uso común y repetido reglas, especificaciones, atributos, métodos de prueba, directrices, características o prescripciones aplicables a un producto, proceso, instalación, sistema, actividad, servicio o método de producción u operación, así como aquellas relativas a terminología, embalaje, marcado o etiquetado.

Validación: confirmación del cumplimiento de los requisitos particulares para un uso específico propuesto, por medio de un examen y aporte de evidencia objetiva. (EURACHEM Guide. The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, EURACHEM, United Kingdom, First English Edition 1998.)

Las técnicas utilizadas para la determinación del desempeño de un método puede ser una o una combinación de las siguientes:

- ✚ Calibración (usando patrones o materiales de referencia).
- ✚ Comparación (de resultados alcanzados por otros métodos).
- ✚ Comparaciones (entre laboratorios).
- ✚ Evaluación sistemática (de los factores que tienen influencia en los resultados).
- ✚ Evaluación de la incertidumbre de los resultados (con base en el conocimiento científico de los principios teóricos del método y de la experiencia práctica).

Intervalo y Exactitud: el intervalo y exactitud de los valores que se pueden obtener de los métodos validados (por ejemplo: la incertidumbre de los resultados, el límite de detección, la selectividad del método, la linealidad, el límite de repetibilidad y/o reproducibilidad, la consistencia

contra influencias externas y/o la sensibilidad cruzada contra interferencias de la matriz del elemento de ensayo/muestra), deben ser relevantes con las necesidades de los clientes, como se evaluaron para el uso propuesto. (NMX-EC-17025-IMNC-2000).

Incertidumbre de medida: parámetro no negativo que caracteriza la dispersión de los valores atribuidos a un mensurando , a partir de la información que se utiliza.

Estimación de la incertidumbre de medición: un laboratorio de calibración o de ensayos, que realiza sus propias calibraciones debe tener y aplicar un procedimiento para estimar la incertidumbre de medición para todas las calibraciones y tipos de calibración. (EURACHEM Guide. The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, EURACHEM, United Kingdom, First English Edition 1998).

Precisión: proximidad entre las indicaciones o los valores medidos obtenidos en mediciones repetidas de un mismo objeto, o de objetos similares, bajo condiciones especificadas.

Condición de repetibilidad: condición de medición, dentro de un conjunto de condiciones que incluye el mismo procedimiento de medida , los mismos operadores, el mismo sistema de medida, las mismas condiciones de operación y el mismo lugar, así como mediciones repetidas del mismo objeto o de un objeto similar en un periodo corto de tiempo.

Condición de reproducibilidad: condición de medición, dentro de un conjunto de condiciones que incluye diferentes lugares, operadores, sistemas de medida y mediciones repetidas de los mismos objetos u objetos similares.

Sensibilidad: cambio de respuesta instrumental, depende de cada mensurando pero puede obtenerse a través de la curva de calibración.

- B) NORMA OFICIAL MEXICANA: NOM-173-SCFI-2009, - Jugos de frutas preenvasados – Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba. 28 de Agosto de 2009.

En la siguiente liga podemos localizar el archivo de la Norma NOM-173-SCFI-2009, en su versión pdf (nom173scfi09mod.pdf).

<http://www.economia-noms.gob.mx/noms/>

### C) MATERIALES DE REFERENCIA.

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

<b>Materiales de Referencia</b>	<b><math>\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}</math> (‰) <math>\pm \sigma</math></b>	<b><math>\delta^{15}\text{N}_{\text{AIR}}</math> (‰) <math>\pm \sigma</math></b>
NBS-19 Carbonato de calcio	+1,95	
L-SVEC Carbonato de Litio	-46,6	
NBS-18 Carbonato de calcio	-5,01 $\pm$ 0,06	
IAEA-CO-1 Carbonato de calcio	+2,49 $\pm$ 0,06	
IAEA-CO-8 Carbonato de calcio	-5,76 $\pm$ 0,06	
IAEA-CO-9 Carbonato de bario	-47,32 $\pm$ 0,06	
NBS-22 Aceite	-30,03 $\pm$ 0,09	
IAEA-CH7 Poliuretano	-32,15 $\pm$ 0,1	
USGS24 Grafito	-16,05 $\pm$ 0,07	
IAEA-CH6 Sacarosa	-10,45 $\pm$ 0,09	
USGS40 Acido-L Glutámico	-26,39 $\pm$ 0,08	-4,52 $\pm$ 0,12
USGS41 Acido-L Glutámico	+37,63 $\pm$ 0,1	+47,57 $\pm$ 0,22
IAEA-CH3 Celulosa	-24,72 $\pm$ 0,08	
IAEA-600 Cafeína	-27,77 $\pm$ 0,09	+1,00 $\pm$ 0,2
IAEA-601 Acido Benzoico	-28,81 $\pm$ 0,09	
IAEA-602 Acido Benzoico	-28,85 $\pm$ 0,09	
IAEA-N1 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		+0,43 $\pm$ 0,07
IAEA-N2 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		+20,32 $\pm$ 0,09
IAEA-NO-3 KNO <sub>3</sub>		+4,69 $\pm$ 0,09
USGS32 KNO <sub>3</sub>		+180
USGS34 KNO <sub>3</sub>		-1,8 $\pm$ 0,2
USGS35 KNO <sub>3</sub>		+2,7 $\pm$ 0,2
USGS25 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		-30,25 $\pm$ 0,38
USGS26 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		+53,62 $\pm$ 0,25

## SECRETARIA DE ECONOMIA

**Resolución por la que se modifican los numerales 2, 3.10, 9 y 10; y se adiciona el numeral 5.1.4 de la Norma Oficial Mexicana NOM-173-SCFI-2009, Jugos de frutas preenvasados-Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba, publicada el 28 de agosto de 2009.**

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

RESOLUCION POR LA QUE SE MODIFICAN LOS NUMERALES 2, 3.10, 9 Y 10; Y SE ADICIONA EL NUMERAL 5.1.4 DE LA NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-173-SCFI-2009, JUGOS DE FRUTAS PREENVASADOS-DENOMINACIONES, ESPECIFICACIONES FISICOQUIMICAS, INFORMACION COMERCIAL Y METODOS DE PRUEBA, PUBLICADA EN EL DIARIO OFICIAL DE LA FEDERACION EL 28 DE AGOSTO DE 2009.

CHRISTIAN TUREGANO ROLDAN, Director General de Normas y Presidente del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Seguridad al Usuario, Información Comercial y Prácticas de Comercio, con fundamento en lo dispuesto por los artículos 34 fracciones II, XIII y XXXI de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; 38 fracción II, 39 fracción V, 51 segundo y tercer párrafos de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 19 fracciones I, XIV y XV del Reglamento Interior de la Secretaría de Economía y,

### CONSIDERANDO

Que el día 28 de agosto de 2009, se publicó en el Diario Oficial de la Federación la norma oficial mexicana NOM-173-SCFI-2009, Jugos de frutas preenvasados - Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba;

Que es obligación del Gobierno Federal implementar los instrumentos regulatorios que faciliten la protección del consumidor, previendo mecanismos que faciliten la expresión de la información comercial;

Que los párrafos segundo y tercero del artículo 51 de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización permiten la modificación de las normas oficiales mexicanas sin seguir el procedimiento para su elaboración, siempre que no se creen nuevos requisitos o procedimientos o bien se incorporen especificaciones más estrictas;

Que el 15 de febrero de 2011, el Comité Consultivo Nacional de Normalización de Seguridad al Usuario, Información Comercial y Prácticas de Comercio, que coordina la Secretaría de Economía aprobó la presente modificación;

Que la Modificación se sometió al proceso de mejora regulatoria previsto por la Ley Federal de Procedimiento Administrativo; indicando que dicha modificación no afecta a la industria actualmente establecida, y resulta comercialmente menos restrictiva para llevar a cabo la regulación de los jugos de fruta preenvasados, obteniéndose la exención de Manifestación de Impacto Regulatorio por parte de la Comisión Federal de Mejora Regulatoria el día 18 de febrero de 2011.

Que los lineamientos generales del gobierno procuran minimizar los impactos adversos que puedan derivarse del cumplimiento a las regulaciones que la sociedad requiere, he tenido a bien expedir la siguiente:

**RESOLUCION POR LA QUE SE MODIFICAN LOS NUMERALES 2, 3.10, 9 Y 10; Y SE ADICIONA EL NUMERAL 5.1.4 DE LA NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-173-SCFI-2009, JUGOS DE FRUTAS PREENVASADOS - DENOMINACIONES, ESPECIFICACIONES FISICOQUIMICAS, INFORMACION COMERCIAL Y METODOS DE PRUEBA, PUBLICADA EN EL DIARIO OFICIAL DE LA FEDERACION EL 28 DE AGOSTO DE 2009**

**ARTICULO UNICO.-** Se modifican los numerales 2, 3.10, 9 y 10; y se adiciona el numeral 5.1.4 de la norma oficial mexicana NOM-173-SCFI-2009, Jugos de frutas preenvasados-Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 28 de agosto de 2009, para quedar como sigue:

### 2. Referencias

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

...

NOM-051-SCFI/SSA1-2010

Especificaciones generales de etiquetado para alimentos y bebidas no alcohólicas preenvasados-Información comercial y sanitaria, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 5 de abril de 2010.

...

3...

### 3.10 Producto preenvasado

Los jugos de frutas, que son colocados en un envase de cualquier naturaleza, en ausencia del consumidor, y la cantidad de producto contenido en él no puede ser alterada, a menos que el envase sea abierto o modificado perceptiblemente.

3.11...

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

6...

## 9. Información comercial

Las etiquetas de los productos objeto de esta norma deben cumplir con las disposiciones de etiquetado establecidas en la NOM-051-SCFI/SSA1-2010, indicada en el apartado de referencias, así como con las disposiciones específicas establecidas en esta norma.

## 10. Verificación y Vigilancia

Esta Norma Oficial Mexicana no es certificable, y su cumplimiento será verificado y vigilado por la Secretaría de Economía, la Procuraduría Federal del Consumidor y la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios, en el ámbito de sus respectivas atribuciones.

11...

## TRANSITORIOS

**PRIMERO.-** La presente modificación entrará en vigor el 2 de junio de 2011.

**SEGUNDO.-** Publíquese de conformidad con el artículo 4o. de la Ley Federal de Procedimiento Administrativo.

México, D.F., a 21 de febrero de 2011.- El Director General de Normas y Presidente del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Seguridad al Usuario, Información Comercial y Prácticas de Comercio, **Christian Turégano Roldán.-** Rúbrica.

### **Resolución por la que se otorga licencia para continuar separado del ejercicio de sus funciones, al ciudadano Adrián Talamantes Lobato, corredor público número 14 en la plaza del Estado de Jalisco.**

Al margen un sello con el Escudo Nacional, que dice: Estados Unidos Mexicanos.- Secretaría de Economía.- Subsecretaría de Competitividad y Normatividad.- Dirección General de Normatividad Mercantil.- Dirección de Correduría Pública.

La Secretaría de Economía, a través de la Dirección de Correduría Pública adscrita a la Dirección General de Normatividad Mercantil, con fundamento en el artículo 20 fracción XV y último párrafo, del Reglamento Interior de esta Dependencia, en respuesta a la petición del licenciado Adrián Talamantes Lobato, Corredor Público número 14 en la plaza del Estado de Jalisco, en la que solicita licencia para continuar separado de sus funciones como Corredor Público, da a conocer la siguiente resolución:

Con fundamento en los artículos 15, fracción VIII, de la Ley Federal de Correduría Pública, 64 del Reglamento de la Ley Federal de Correduría Pública, así como 20, fracción XV del Reglamento Interior de la Secretaría de Economía, y en virtud de que la licencia debe ser previa a la separación temporal del Corredor Público, la Secretaría de Economía ha resuelto otorgarle licencia para continuar separado del ejercicio de sus funciones como Corredor Público número 14 en la Plaza del Estado de Jalisco, a partir del 6 de abril de 2011, por un plazo de cinco años, siendo ésta renunciable conforme lo señala la citada ley.

En razón de lo anterior, el sello oficial a su cargo continuará bajo la guarda y custodia del Colegio de Corredores Públicos de la Plaza del Estado de Jalisco, Asociación Civil, en cumplimiento a lo dispuesto por el artículo 29 del Reglamento de la Ley Federal de Correduría Pública. Asimismo, el archivo de pólizas y actas, libros de registro autorizados e índice respectivo seguirán bajo la guarda y custodia del licenciado Alejandro Moreno Pérez, Corredor Público número 11 de la Plaza del Estado de Jalisco, con quien tiene celebrado Convenio de Suplencia, en cumplimiento a lo dispuesto por los artículos 59 y 60 del mencionado Reglamento.

México, D.F., a 28 de febrero de 2011.- El Director de Correduría Pública, **Ernesto Alcaraz Vásquez Mellado**.- Rúbrica.