

MÉTODOS ISOTÓPICOS DE $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ Y $\delta^{18}\text{O}_{\text{VSMOW}}$ COMO INDICADORES DE AUTENTICIDAD EN EL TEQUILA

Pedro Morales Puente¹, Edith Cienfuegos Alvarado¹, Francisco Javier Otero¹ y Rafael Ayala Magdaleno²

¹ Instituto de Geología, UNAM, ² Allied Domecq

Circuito de la Investigación s/n Ciudad Universitaria, México, D.F. C.P. 04510

Teléfono 5622 4325, fax 5622 4318, mopuente@servidor.unam.mx; edithca@servidor.unam.mx

Allied Domecq Los Reyes Edo. 5326 3411 Mex; rafael_ayala@adsw.com

Resumen: El Tequila, hasta hace poco tiempo no contaba con un método analítico irrefutable para determinar su autenticidad. Recientemente ha sido desarrollada una avanzada tecnología basada en la Espectrometría de Masas de Isótopos Estables de Oxígeno y Carbono que tiene la capacidad de identificar las diferencias asociadas con los diferentes orígenes botánicos, por lo que es capaz de distinguir adulteraciones de los componentes genuinos.

Con esta metodología analítica es posible distinguir entre alcoholes elaborados por fermentación del agave *Tequilana Weber var Azul*, de otros alcoholes como son los derivados de la caña de azúcar, de fructuosa o dextrosa provenientes del maíz

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente la autenticidad del Tequila se realiza a través de una verificación directa realizada por el CRT mediante actividades de inspección permanente en las empresas productoras que lo solicitan a fin de que se les otorgue la certificación de autenticidad; con esta verificación muestran el cabal cumplimiento con la norma del Tequila, lo cual les permite el uso de la contraseña del CRT que es el símbolo para reconocer tanto en el mercado nacional como internacional que el producto ha sido certificado. La importancia de los resultados alcanzados en este trabajo permitirán ahora que mediante el muestreo y análisis del producto que se puedan comprobar las posibles adulteraciones en el producto final y de esta manera se podrá reforzar de manera inequívoca la autenticidad del producto.

En el presente trabajo, se mostrará que con la metodología analítica desarrollada es ahora posible distinguir entre alcoholes elaborados por fermentación del agave *Tequilana Weber variedad Azul*, de otros alcoholes como son los derivados del azúcar de caña ó de alcoholes derivados de jarabes de fructuosa ó dextrosa obtenidas del maíz, con una precisión tal que es posible establecer con gran certidumbre la categoría del Tequila 100% y también permite evaluar el porcentaje de mezclas entre los alcoholes de agave y los alcoholes de azúcar de caña, de una manera que no es posible realizar con otros métodos.

Definición de Adulteración

Un alimento o bebida alcohólica deberá de ser considerado como no auténtico (adulterado), si cualquiera de los siguientes aspectos se detectan durante el proceso de evaluación de un producto.

- Si cualquiera de sus componentes ha sido omitido en forma total o parcial.
- Si cualquiera de sus componentes ha sido substituido en forma total o parcial.
- Si se ha encubierto de algún modo, algún daño, o si existe alguna inferioridad en cualquiera de sus cualidades.
- Si le ha sido agregado, o mezclado, o empacado, cualquier componente extraño con tal de aumentar su peso bruto, o de reducir su calidad, o su fuerza, o aparentar un valor mayor o mejor del que realmente tiene.

La Norma Oficial del Tequila NOM-006-SCFI-1994 establece los siguientes parámetros para la evaluación de calidad: El por ciento alcohol volumen, contenido de metanol, contenido de furfural, contenido de alcoholes superiores, contenido de aldehídos, extracto seco y contenido de metales pesados.

La norma oficial de Tequila indica cuales son la características para la clasificación y las categorías del Tequila. Las categorías se definen de acuerdo al porcentaje de los azúcares provenientes del agave que se utilizan en la elaboración del Tequila, por lo que el tequila se puede clasificar en una de

las categorías siguientes:

El "Tequila 100% de agave" o "Tequila 100% puro de agave" y "Tequila" que es aquel producto que se obtiene de la destilación y rectificación de mostos, en cuya formulación se han adicionado hasta una proporción no mayor del 49% de azúcares distintos a los derivados de la molienda

Las especificaciones para las materias primas marcas por la norma [1] son:

Que el agave que se utilice como materia prima para la elaboración de Tequila, debe ser maduro, de la especie *Tequilana weber*, variedad azul, y haber sido cultivado en la región geográfica descrita en la Declaración de la Denominación de Origen. Y para el uso de azúcares, se menciona que los (azúcares provenientes del agave *Tequilana weber*, variedad azul) son susceptibles de ser enriquecidos por otros azúcares hasta en una proporción no mayor del 49%, en la medida de que se trate del "Tequila", sin que se permitan las mezclas (de alcoholes) en frío.

Con respecto a la garantía de **Autenticidad del Tequila**, la norma establece solamente requisitos de administración de materia prima para garantizar la autenticidad. Primeramente la norma se refiere a los requisitos de autenticidad de la materia prima. Entre otros el requerimiento para los agaves dice:

El productor de Tequila debe demostrar, en todo momento, que el producto no ha sido adulterado en las operaciones unitarias durante su elaboración, particularmente a partir de la formulación de los mostos. La prueba admisible para tales efectos consiste en un balance de materias primas y materiales que determine la participación mayoritaria o total de los azúcares procedentes del agave, así como en el cálculo de eficiencias de cada operación unitaria y del total de las etapas del proceso de elaboración.

2. FUNDAMENTOS DE LA METODOLOGÍA

2.1 Abundancias isotópicas del carbono y oxígeno.

El carbono es un bioelemento muy importante en la biosfera y por definición es la parte esencial de todos los compuestos orgánicos, contribuyendo así a las propiedades físicas y químicas de los compuestos. El carbono se encuentra en la naturaleza como una mezcla de dos isótopos estables y uno radiactivo (cuya abundancia natural relativa es para ^{12}C : 99.7587 % atómico, ^{13}C :

0.0374 % atómico y ^{14}C : radioactivo producto de reacciones nucleares en la estratosfera que por baja abundancia en la naturales se reporta de otro forma).

El oxígeno es un bioelemento muy importante en los grupos funcionales de la mayoría de los compuestos orgánicos contribuyendo así a las propiedades físicas y químicas de los compuestos. El oxígeno se encuentra en la naturaleza como una mezcla de tres isótopos estables (cuya abundancia natural relativa es para ^{16}O : 99.7587 % atómico, ^{17}O : 0.0374 % atómico y ^{18}O : 0.2039 % atómico).

2.2 Descripción de los diferentes tipos de origen.

Las plantas se pueden clasificar en tres grandes grupos dependiendo del proceso fotosintético que utilizan para fijar el CO_2 atmosférico. Las plantas tipo C_3 utilizan ciclo de Calvin, las plantas tipo C_4 siguen el ciclo de Hatch Slack, y las plantas denominadas CAM. Entre el grupo de plantas C_3 y C_4 existe una diferencia considerable en la proporción de isótopos estables ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) contenidos en las plantas y sus productos.

El grupo mayoritario de plantas del reino vegetal, es el de las plantas tipo C_3 que utilizan ciclo de Calvin, en ellas las plantas fijan el CO_2 atmosférico por una reacción (obscura) catalizada por la ribulosa-1, 5-difosfato (RUDP) formando dos moléculas de 3-fosfoglicerato, es decir con tres carbonos, al cual deben su nombre y esta sustancia es posteriormente convertida en glucosa. A este ciclo pertenecen la mayoría de los frutales y a una gran cantidad de arbustos y matorrales con secreciones dulces, vid, etc. Estudios realizados en estas plantas se han observado valores de $\delta^{13}\text{C}$ se presentan en un intervalo de -22 a -33 ‰

Otro grupo de plantas llamadas C_4 siguen el ciclo de Hatch Slack, de formación de glucosa, el CO_2 se fija por una reacción catalizada por la enzima fosfoenolpiruvato-carboxilasa (PEP-carboxilasa) y los primeros productos de fijación del CO_2 son ácidos dicarboxílicos de cuatro carbonos (oxaloacético, málico y aspártico) a los cuales se les da el nombre de plantas C_4 . Al cual pertenecen plantas como los pastos tropicales, caña de azúcar, maíz, sorgo, algodón. De este tipo de plantas se derivan sustancias hechas por el hombre como azúcar y jarabe de maíz con alto contenido de fructuosa o dextrosa. Estudios realizados en estas plantas se han observado valores de $\delta^{13}\text{C}$ se presentan en un intervalo de -10 a -20 ‰

El tercer grupo de las plantas es denominado ciclo CAM (Crasulacean Acid Metabolism). Estas plantas presentan una combinación de los ciclos mencionados anteriormente que se realiza interiormente, iniciándose con la primera fijación del CO₂ es catalizada por la enzima PEP-carboxilasa. Muchas especies de plantas CAM pueden tomar CO₂ durante periodos de oscuridad con tomas ligeras en periodos de luz, y en algunas estaciones del año pueden depender totalmente de la toma de CO₂ durante periodos de luz es por eso que la δ¹³C se puede expandir en el intervalo desde -12 hasta -30 ‰. Las especies que fijan CO₂ durante la noche tienen su δ¹³C similar a las plantas C₄. Como es el caso de la especie *Tequilana weber*, variedad azul.

La mayoría de los compuestos orgánicos contienen uno o muy pocos átomos de oxígeno con la excepción de los carbohidratos. Es generalmente aceptado que el enriquecimiento de oxígeno 18 en la celulosa de los árboles relativos al agua por el proceso de la biosíntesis es igual a 27 ± 4‰ [2]. También se asume que el valor para la celulosa de δ¹⁸O_{VSMOW} es la expresión del equilibrio de los isótopos del agua y el grupo carbonil que puede ocurrir en cualquier posición de la molécula durante la biosíntesis de los carbohidratos [2], [3], sugirió varios efectos que contribuyen al valor de δ¹⁸O_{VSMOW} de la celulosa como el primer paso de la reacción fotosintética de carboxilación pudiendo ser que el valor de δ¹⁸O_{VSMOW} del dióxido de carbono (41‰) es la contribución mayoritaria en los carbonatos. En general existe poca variación de δ¹⁸O entre los diferentes tipos procesos fotosintéticos. Sin embargo, donde se genera un fraccionamiento isotópico apreciable es durante los procesos de fermentación, debido a de los diferentes tipos de azúcares como es al caso de los derivados de maíz o a los derivados caña con respecto a los de la especie *Tequilana weber*, variedad azul.

3. RESULTADOS

La unidad de reporte δ¹³C_{VPDB} es la forma para expresar las relaciones isotópicas de carbono ¹³C/¹²C. La unidad de reporte δ¹⁸O_{VPDB} es la forma para expresar las relaciones isotópicas de ¹⁸O/¹⁶O del CO₂, ambas determinaciones obtenidas mediante Espectrometría de Masas de Isótopos Estables.

Estas relaciones isotópicas se determinan simultáneamente comparando una muestra de CO₂

con respecto a las relaciones isotópicas de carbono ¹³C/¹²C y oxígeno ¹⁸O/¹⁶O de un CO₂ proveniente de una reacción ácida con el patrón internacional PDB (Pee Dee Belemnite Limestone) el cual es un carbonato de origen marino de la formación cretácica Peedee en Carolina del Sur [4].

La unidad de reporte δ¹³C_{VPDB} se calcula de acuerdo a la siguiente expresión:

Las relaciones isotópicas ¹⁸O/¹⁶O en material

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

orgánico se determinan comparando el CO proveniente de una reacción termoquímica a alta temperatura de la muestra, con respecto a las relaciones isotópicas de oxígeno ¹⁸O/¹⁶O de un CO proveniente de una reacción termoquímica a alta temperatura VSMOW (Vienna Standard Mean Ocean Water)

Un espectrómetro de masas de isótopos estables mide las relaciones isotópicas de los materiales en forma gaseosa como CO. La unidad de reporte δ¹⁸O_{VSMOW} se calcula de acuerdo a la siguiente expresión:

$$\delta^{18}O_{VSMOW} = \left[\frac{(^{18}O/^{16}O)_{Muestra}}{(^{18}O/^{16}O)_{VSMOW}} - 1 \right] \cdot 10^3$$

Las técnicas de determinación de δ¹³C_{VPDB} y δ¹⁸O_{VPDB} usando un cromatógrafo de gases, interfase, espectrómetro de masas de relaciones de isótopos estables (IRMS) se basan en [5], [6], [7], [8], [9].

Resultados de carbono 13

Las muestras de tequila tienen una composición química muy compleja, donde el compuesto mayoritario y que contiene a la información isotópica es el etanol por lo que es necesario separarlo mediante la cromatografía de gases. esto se realiza mediante la metodología conocida como flujo continuo empleando la combustión del etanol separado y analizado como CO₂ en un espectrómetro de masas de isótopos estables. Las condiciones del cromatógrafo de gases para análisis de etanol son: Reactor de Combustión temperatura de operación de 940°C. Reactor de Reducción a 600°C. Columna del Cromatógrafo Varian Porabond Q de 50 m de longitud y con 0.32 mm de I.D. 5 μm.

Flujo de Helio 5.0 en la columna 1.2 ml/min, Programa Temperatura del GC 110(4)//5.0//155(0)//10.0//215 (31)

En la gráfica 1 se presentan los resultados isotópicos de $\delta^{13}C$ realizados en el etanol con diferentes orígenes y en la tabla 1 los promedios, las desviaciones estándar y el número de muestras analizadas para los valores obtenidos para muestra de etanol.

Material	$\delta^{13}C$ Prom	$\delta^{13}C$ std	N
Maíz	-9.80	0.74	5
Caña	-12.07	0.76	10
Agave	-12.16	0.35	28

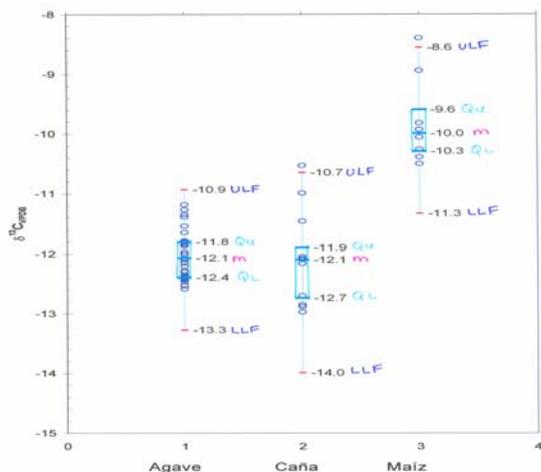


Fig 1. Los isótopos estables de carbono para diferentes aguardientes empleados en el Tequila determinados por GC/C/IRMS

3.2. Resultados con oxígeno 18

Al igual que el carbono, el análisis isotópico de oxígeno se realiza en el etanol separado mediante un cromatógrafo de gases seguido por una descomposición termoquímica del etanol en CO e hidrógeno en horno de platino a alta temperatura con bajo las siguientes condiciones

Los Parámetros de operación de la columna Varian Porabond Q, optimizados para los análisis de $^{18}O/^{16}O$ por GC-TC- IRMS en etanol:

Reactor de descomposición térmica a alta temperatura a 940°C. Columna del Cromatográfica Varian Porabond Q de 50 m de longitud, con 0.32 mm. Gas auxiliar para pirólisis 1% de H₂ en Helio,

con un flujo de 0.8ml/min. Flujo de helio en la columna cromatográfica 1.2 ml/min. El Programa Temperatura del GC 110(4)//5.0//155(0)//10.0//215 (31)

En la grafica 2 se presentan los resultados isotópicos de la $\delta^{18}O$ realizados en el etanol con diferentes orígenes y en la tabla 2 los promedios y las desviaciones estándar de los valores obtenidos para muestra de etanol.

Material	$\delta^{18}O$ prom	$\delta^{18}O$ std	N
Maíz	16.30	1.90	5
Caña	14.63	1.34	10
Agave	24.80	0.67	28

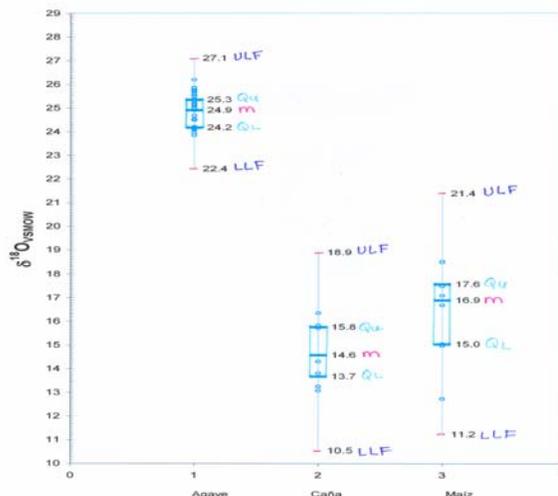


Fig 2. Los isótopos estables de Oxígeno para aguardientes con diferente origen empleados en el Tequila por GC/TC/IRMS

Como calcular el % de caña de azúcar en Tequila:

- A: Etanol de caña de azúcar 100%
- T: Etanol de agave 100%
- M: Muestra con algún % de Agave
- XA: Fracción Molar de etanol de caña 100%
- XT: Fracción Molar de etanol de agave 100%
- XM: Fracción Molar del Agave en la Muestra
- δA : $\delta^{18}O$ en ‰ de la caña de azúcar 100%
- δT : $\delta^{18}O$ en ‰ del Tequila 100%
- δM : $\delta^{18}O$ en ‰ de la Muestra con Agave
- $X_A + X_T = 1$
- $\delta A * X_A + \delta T * X_T = \delta M$

$$X_M = \frac{\delta_M - \delta_A}{\delta_T - \delta_A}$$

Como ejemplo1:

Para calcular el valor esperado para un alcohol que contuviese 51% proveniente del agave y 49% proveniente de la caña de azúcar, se aplica la ecuación 1.

$$\delta_M = (\delta_A X_A) + (\delta_T X_A) = (14.6 \cdot 0.49) + (24.8 \cdot 0.51) = 19.8$$

El valor en $\delta^{18}O_{VSMOW}$ para un tequila 51/49 es de 19.8 ‰

4. DISCUSIÓN

Los límites estadísticos para la $\delta^{13}C_{VPDB}$ y $\delta^{18}O_{VSMOW}$ en el caso del agave se obtienen a partir de una distribución normal basada en la población de resultados que aparecen en la tabla I y II que se obtuvieron a partir de análisis de muestras colectadas desde 1993 al 2003. En la leyenda de la Fig 5. el término 100% agave referencia se refiere a muestras que se tiene la certeza de que fueron elaboradas a partir de agave *tequilana weber variedad azul*. El término 100% agave comercial corresponde a muestras adquiridas en el mercado nacional que ostentan en su etiqueta la leyenda 100% agave. De estas muestras 22 correspondieron al mismo intervalo de las muestras de tequila de referencia. Se encontraron otras muestras que ostentan la etiqueta 100% agave pero su contenido de alcohol derivado de agave *tequilana weber variedad azul* está en el intervalo de muestras que contienen porcentajes desde el cero por ciento al 80% de agave.

La variación natural de los resultados isotópicos $\delta^{13}C_{VPDB}$ y $\delta^{18}O_{VSMOW}$ en el etanol proveniente del agave *tequilana weber variedad azul* presentan una curva que se aproxima a una distribución normal (figura 3 y 4). De esta manera se puede asociar un valor de probabilidad para una muestra auténtica cuando esté dentro de los límites estadísticos establecidos por la seguridad tabulada calculada a partir de la distribución normal. Con tal objeto se estableció un criterio estadístico de 2 σ el cual tiene una probabilidad de certeza del 98%, lo que significa que solamente 1 de cada 44 muestras estarían clasificadas erróneamente cuando están

dentro del intervalo mencionado [10]. De esta manera se puede asociar un valor de probabilidad para una muestra auténtica cuando ésta se encuentre dentro de los límites estadísticos.

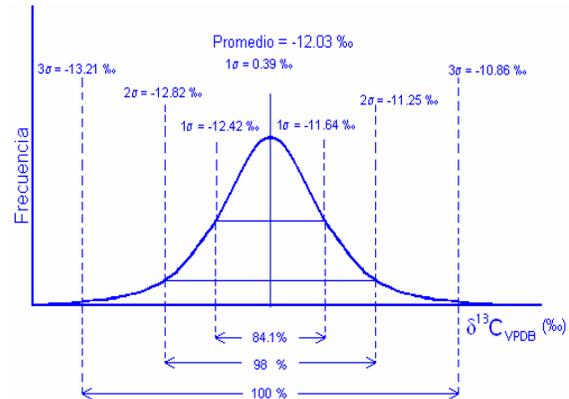


Fig 3. Estimación estadística por intervalos de confianza para la $\delta^{13}C_{VPDB}$ en el caso del agave

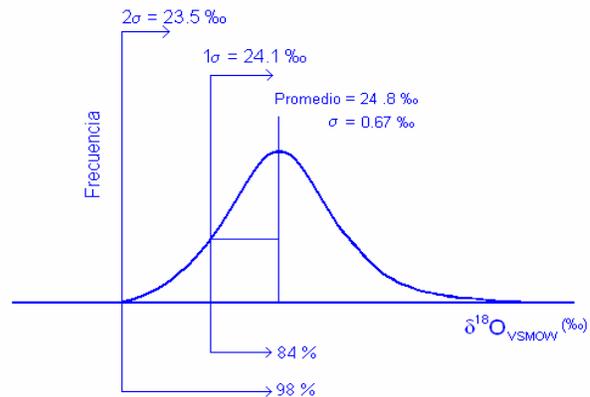


Fig 4. Estimación estadística por intervalos de confianza para el caso del $\delta^{18}O_{VSMOW}$ en el Tequila 100% agave.

Con estas estimaciones es posible determinar si una muestra pertenecen al intervalo del material auténtico que en este caso es el agave *tequilana weber variedad azul*.

Combinando los resultados de $\delta^{13}C_{VPDB}$ y $\delta^{18}O_{VSMOW}$ como se muestra en la figura 5, es posible establecer las zonas pertenecientes al Tequila 100% agave y a los tequilas 51% de agave y 49% de otro alcohol como lo es la caña de azúcar. Además en esta gráfica se presentan los resultados

de más de cincuenta muestras de productos denominados tequila que permite conocer la situación actual de la industria tequilera.

5. CONCLUSIONES

- Se ha desarrollado un método analítico para garantizar la autenticidad del Tequila 100%, trabajado en forma independiente y simultánea tanto en México como Alemania, basado en las relaciones de los isótopos estables de Oxígeno y Carbono.
- Este método es aplicable para la distinción de alcoholes de diferente origen botánico, presentes en la categoría de Tequila.
- El método es repetible, estable, de simple aplicación a costos razonables en México y en algunos otros laboratorios en el Mundo.
- El método, al estar basado en procesos físicos y contar con una estructura de trazabilidad y metrología aceptada internacionalmente, permitirá alcanzar consensos y mediciones entre diversos laboratorios participantes en evaluaciones.
- El método aquí expuesto puede ser transferido e implantado por autoridades reguladoras de la autenticidad del Tequila, en términos de inversión y tiempo aceptables

AGRADECIMIENTOS

- Al proyecto UNAM-BID por los fondos de financiamiento para la "Propuesta para la Adquisición de un Espectrómetro de Masas y Flujo Continuo para medir Relaciones de Isótopos Estables"
- Al CONACyT por los fondos para el proyecto No G35442-T "Desarrollo en México de Nuevas Metodologías en Isótopos Estables aplicadas al estudio de Depósitos Minerales, Vulcanismo, Sistemas Hidrotermales, Hidrología Ecología y Biogeoquímica Acuática"
- Al grupo Allied Domecq por el Financiamiento del proyecto "Desarrollo de los Métodos Isotópicos como Herramienta en la Caracterización de Autenticidad de la bebida denominada Tequila"
- A los integrantes del grupo de trabajo asociado al Laboratorio de Espectrometría de Masas de Isótopos Estables del Instituto de Geología de la UNAM.

- Al personal asociado a la gerencia de calidad y al laboratorio de la planta de Tequila Sauza y de Industrias Vinícolas Domecq planta Los Reyes.

REFERENCIAS.

1. Norma Oficial Mexicana NOM-006-SCFI-1994. Bebidas alcohólicas-Tequila-Especificaciones.
2. Werner Roland (2003). The online $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ analysis: development and application. *Isotopes Environ Healt Stud.* Vol 32, No 2 June 2003, 85-104.
3. De Niro M.J., Epstein S. (1978). Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 42, 495 – 506.
4. Craig Harmon (1957). Isotopic Standards for Carbon and Oxygen and correction factors for mass – spectrometric analysis of carbon dioxide. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, Vol. 12, pp 133 – 149.
5. Hilkert A.W., Douthitt C.B., Schlüter and Brand W.A. (1999). Isotope Ratio Monitoring Gas Chromatography/Mass Spectrometry of D/H by High Temperature Conversion Isotope Ratio Mass Spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 13, 1226-1230
6. Merritt D.A and Hayes J.M. (1994) Factors Controlling Precision and Accuracy in Isotope-Ratio-Monitoring Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 66, 2336-2347.
7. Werner R.A and Brand W.A. (2001) Referencing strategies and techniques in stable isotope ratio analysis. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 15: 501-519.
8. Burgoyne T.W. (1998) Quantitative Production of H_2 by Pyrolysis of Gas Chromatographic Effluents. *Anal. Chem.*, 70, 5136-5141.
9. Aguilar-Cisneros Blanca O., López Mercedes G., Richling Elke, Heckel Frank and Schreier Peter. (2002) Tequila Authenticity Assesment by Headspace SPME-HRGC-IRMS Analysis of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ and $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Ratios of Ethanol. *J. Agric. Food Chem* 50. 7520-7523.
10. Abramowitz Milton y Stegun Irene A. (1970). Handbook of Mathematical Functions with Formulas, Graphs and Mathematical Functions U.S. Department of Commerce. National Bureau of Standards Applied Mathematics Series 55. Tabla 26.1 pag. 966-970.

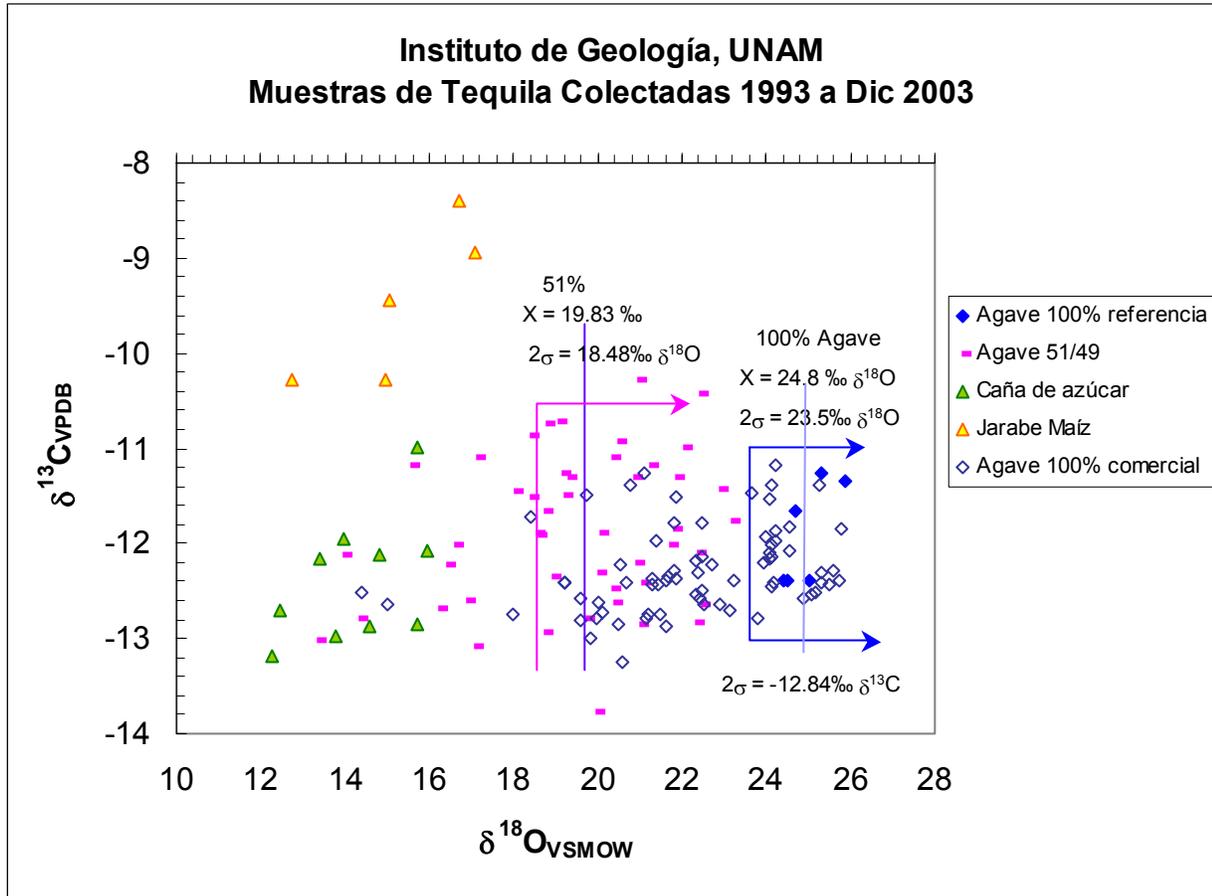


Fig 5. Correlación entre $\delta^{13}C_{VPDB}$ y $\delta^{18}O_{VSMOW}$ determinados por GC/C/IRMS y GC/TC/IRMS en muestras de diferentes aguardientes