

PREFACIO

La Sociedad Mexicana de Normalización y Certificación S.C. (NORMEX), es un Organismo Nacional de Normalización establecido el 3 de diciembre de 1993 en términos del artículo 4 de los estatutos de la acta constitutiva de la Sociedad. Acreditado el 8 de diciembre de 1993 por la SECOFI Actualmente Secretaría de Economía– Dirección General de Normas para elaborar y expedir normas mexicanas con fundamento en los artículos 3 fracción 1, 65 y 66 de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización y de conforme con las directrices y procedimientos para la acreditación de organismos nacionales de normalización.

La Sociedad Mexicana de Normalización y Certificación S.C. (NORMEX), fue acreditada por la Dirección General de Normas para elaborar, modificar y expedir normas mexicanas en el sector alimentos procesados y bebidas no alcohólicas el 8 de diciembre de 1993, No. Acreditamiento 0001.

Fundamentado en el artículo 51-A fracción III de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización y del artículo 43 del Reglamento de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización se publicó en el Diario Oficial de la Federación del día 24 de diciembre de 1999 el aviso de consulta pública del proyecto de norma.

A partir de la publicación del aviso de consulta publica y en un periodo de 60 días naturales, se recibirán los comentarios que se presenten por escrito y en idioma español, los interesados deben presentar o enviar los comentarios a la sede del comité, sito Dirección de Normalización de NORMEX, Alfredo B. Nobel 21, Centro Industrial Puente de Vigas, Tlalnepanltla de Baz, Estado de México, teléfono 5390 4152, fax 5565 8601, correo electrónico: normas@normex.com.mx.

El presente proyecto de norma mexicana fue elaborado por el Subcomité de Jugos del Comité Técnico de Normalización Nacional para la Industria Alimentaria NALI-10, coordinado por Coca Cola de México, S.A. de C.V. y con la colaboración de las siguientes instituciones y empresas:

Miembros participantes

- Asociación Nacional de Fabricantes de Productos Aromáticos, ANFPA.
- Asociación Nacional de Tecnólogos en Alimentos de México, ATAM
- Cámara Nacional de la Industria de Transformación de Bebidas y Tabacos, Consejo Coordinador de las Industrias de Alimentos Bebidas y Tabacos, CANACINTRA
- Cámara Nacional de la Industria de Conservas Alimenticias, CANAINCA.
- Distribuidora Valle Redondo S.A. de C.V.
- Grupo Jumex
- HERDEZ, S.A. de C.V.
- Instituto Politécnico Nacional
Escuela de Ciencias Biológicas
- Jugos del Valle, S.A. de C.V.
- Nestlé México, S.A. de C.V.
- Parmalat de México, S. A. de C.V.
- PROFECO – Laboratorio
- SE – Dirección General de Normas
- Universidad Iberoamericana
- Universidad Nacional Autónoma de México
Instituto de Geología
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan

Contando con la aprobación del Comité Técnico de Normalización Nacional para la Industria Alimentaria (NALI-10) y la sociedad Mexicana de Normalización y Certificación, S.C. se expide el siguiente proyecto de norma mexicana.

ÍNDICE

0 INTRODUCCIÓN	3
1 OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACIÓN	3
2 REFERENCIAS	3
3 DEFINICIONES	4
4 SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	4
5 CLASIFICACION Y DENOMINACION DEL PRODUCTO.....	4
6 ESPECIFICACIONES	4
7 LLENADO	7
8 MUESTREO	7
9 MÉTODOS DE PRUEBA	7
9 ENVASE	7
10 ETIQUETADO	7
11 BIBLIOGRAFÍA	7
12 CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES	7
APENDICE A	8
APENDICE B	15

ALIMENTOS - BEBIDAS NO ALCOHÓLICAS – JUGOS ENVASADOS

FOOD – NO ALCOHOLICS DRINKS – CANNED JUICE

(Esta norma mexicana cancela a las NMX-F-018-1968, NMX-F-044-1983, NMX-F-045-1982, NMX-F-117-1982 y NMX-F-118-1984)

0 INTRODUCCIÓN

Las especificaciones que se señalan a continuación sólo podrán satisfacerse cuando en la elaboración del producto objeto de esta norma, se utilicen materias primas e ingredientes de calidad sanitaria, se apliquen Buenas Prácticas de Higiene y Sanidad en el proceso de fabricación de bebidas no alcohólicas (Véase [NOM-120-SSA1-1994](#)).

1. OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACIÓN

Esta norma mexicana establece las especificaciones que deben cumplir los productos denominados: jugos envasados.

Esta norma mexicana se aplica al producto que se denomine jugo de fruta y que se comercialice en el territorio nacional.

2. REFERENCIAS

Esta norma mexicana se complementa con las siguientes normas oficiales mexicanas y normas mexicanas vigentes:

2.1 NOM-002/SCFI-1993 Productos preenvasados. Contenido Neto/Tolerancias y Métodos de verificación.

2.2 NOM-030-SCFI-1993 Información comercial-Declaración de cantidad en la etiqueta-Especificaciones.

2.3 NOM-051-SCFI-1994. Especificaciones. Generales de etiquetado para alimentos y bebidas no alcohólicas preenvasados.

2.4 NOM-086-SSAI-1994. Bienes y Servicios. Alimentos y bebidas no alcohólicas con modificaciones en su composición. Especificaciones nutrimentales.

2.5 NOM-092-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placas.

2.6 NOM-110-SSA1-1994. Bienes y Servicios Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.

2.7 NOM-111-SSA1-1994. Bienes y Servicios Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.

2.8 NOM-117-SSA1-1995 Bienes y Servicios. Métodos de prueba para determinación de arsénico, cadmio, arsénico, plomo, estaño, cobre, hierro, zinc y mercurio en alimentos, agua potable y agua purificada por espectrometría de absorción atómica.

2.9 NOM-120-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Prácticas de higiene y sanidad para el proceso de alimentos, bebidas no alcohólicas y alcohólicas.

2.10 NOM-130-SSA1-1995 Bienes y Servicios. Alimentos envasados en recipientes de cierre hermético y sometidos a tratamiento térmico. Disposiciones y especificaciones sanitarias.

2.11 NMX-Z-12-1-1987 Muestreo para la inspección de atributos – Parte 1 – Información General y aplicaciones.

2.12 NMX-Z-12-3-1987 Muestreo para la inspección de atributos – Parte 3 – Regla de cálculo para la determinación de planes de muestreo.

2.13 NMX-V-35-S-1981 Bebidas alcohólicas. Determinación de dióxido de azufre total.

2.14 NMX-F-103-1978 Alimentos- Frutas y Derivados- determinación de grados brix.

2.15 NMX-F-309-S-1978 Determinación de Benzoatos, salicilatos y sorbatos en alimentos.

2.14 NMX-F-314-1977 Determinación de la masa de la capacidad de llenado para envases de productos alimenticios.

2.15 NMX-F-317-S-1978 Determinación de pH en alimentos.

3. DEFINICIONES

Para los efectos de esta norma se establecen las siguientes definiciones

3.1 Jugo de frutas envasado

Es el jugo obtenido por la expresión de frutos maduros de la variedad correspondiente, sin diluir, y/o jugo congelado, y/o de jugo concentrado reconstituido, clarificado o no, no fermentado y sometido al tratamiento adecuado que asegura su conservación en el envase. No debe contener corteza y semillas, ni materia extraña objetable, pudiendo contener aditivos alimentarios permitidos por la Secretaría de Salud y hasta un máximo del 5% de azúcares referidos al volumen total envasado.

Se considerará como jugo de ciruela pasa al alimento preparado del extracto acuoso de ciruelas secas de las diferentes variedades de ciruelas, expresados en la Tabla No. 1

Nota: La determinación de azúcares exógenos a los de fruta, se tomará en cuenta el apéndice A.

3.2 Jugo concentrado de fruta

Es el producto que por procesos físicos se le ha eliminado parte de su contenido de agua y que puede estar refrigerado, congelado o envasado asépticamente.

3.3 Jugo concentrado reconstituido

Es el producto que se obtienen al agregar agua potable a un jugo concentrado para obtener un producto similar en cuanto a concentración y características sensoriales del jugo de fruta de que se trate.

3.4 Jugo de frutas múltiple envasado

Los jugos de frutas múltiples se elaborarán con dos o más variedades de frutas y pueden hacerse por la mezcla de jugos de las frutas correspondientes. Pudiendo contener pulpa de frutas y aditivos alimentarios permitidos por la Secretaría de Salud.

3.5 Tratamiento térmico

Es el tratamiento que consiste en someter a una fuente de calor suficiente por un tiempo apropiado al producto antes o después de ser envasado en recipientes de cierre hermético con el fin de lograr una estabilidad biológica, aplicado al producto para

la destrucción de todos los microorganismos viables de importancia en la Salud Pública y aquellos capaces de reproducirse en el alimento bajo condiciones normales de almacenamiento y distribución, sin la condición de refrigeración

4. SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

°Bx	grado Brix
%	por ciento
g	gramo
mg	miligramo
kg	kilogramo
ml	mililitro
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
B.P.F.	Buenas Prácticas de Fabricación
NaCl	Cloruro de Sodio
°C	grados Celsius
pH	potencial de hidrógeno
¹³ C	número total de átomos de carbono 13
¹² C	número total de átomos de carbono 12
δ ¹³ C	delta de carbono 13
‰	partes por mil
µl	microlitro
°C	grado Celsius
CO ₂	bióxido de carbono
rpm	revoluciones por minuto
Pa	Pascal
±	mas,menos

5. CLASIFICACIÓN Y DENOMINACIÓN DEL PRODUCTO

La denominación de los jugos de frutas múltiples se hará nombrando a las frutas de acuerdo a su predominio. Opcionalmente se podrá indicar como jugo de frutas cítricas, tropicales, etc., según corresponda.

Los productos objeto de esta norma se clasifican en dos tipos, designándose como "Jugo de _____", seguido del nombre de la fruta o frutas correspondientes, que se enlistan en la Tabla No. 1.

	Jugos
Tipo I	Jugo de fruta
Tipo II	Jugo de frutas múltiples

6. ESPECIFICACIONES

Los jugos envasados objeto de esta norma, deben cumplir con las siguientes especificaciones:

6.1 Sensoriales

Color: Característico semejante a la variedad empleada.

Olor: Característico del jugo que se trate.

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

Se permite la restitución de los componentes volátiles naturales del jugo a cualquier jugo obtenido de los mismos tipos de fruta de la que se haya extraído.

6.2 Fisicoquímicas

Los jugos envasados objeto de esta norma deben cumplir con las especificaciones físicas y químicas que se muestran en las Tabla No. 2, de acuerdo a la elaboración con jugo o jugo concentrado.

6.3 Microbiológicas

Los jugos envasados objeto de esta norma, deben estar exentos de microorganismos patógenos y de toda sustancia tóxica producida por los mismos.

La cantidad de microorganismos no patógenos no debe exceder a la cantidad indicada en Tabla No. 3 y Tabla No. 4 según corresponda.

TABLA No. 1 Variedad de frutos para la elaboración de jugos

JUGO	VARIEDAD
Naranja	<u>Citrus sinensis L.</u>
Piña	<u>Ananas sativus, Ananas comosus.</u>
Toronja	<u>Citrus máxima y/o Citrus paradisi.</u>
Manzana	<u>Pyrus malus.</u>
Uva	<u>Vitis vinifera y/o Vitis rupestris y/o Vitis labrusca.</u>
Mandarina	<u>Citrus reticulata</u>
Ciruela pasa	<u>Santley y/o EarlyBlue y/o D'Angen y/o President</u>

TABLA No. 2 Especificaciones Fisicoquímicas de Jugos

JUGO DE ..	Naranja	Manzana	Piña	Toronja	Uva	Mandarina	Multiples	MÉTODO DE REFERENCIA
Parámetro								
Sólidos disueltos de fruta mínimos (°Brix)	8	8	8	7,0	10,0	8	8	NMX-F-103-1982
pH	3,0-4,0	3,2-3,6	3,2-3,8	2,9-3,5	3,0-3,7	3,0-4,0	3,0-4,0	NMX-F-317-S-1978

TABLA No. 3 Especificaciones microbiológicas para jugos pasteurizados

ESPECIFICACIONES	CONTENIDO MÁXIMO	MÉTODO DE REFERENCIA
Mesofílicos aerobios	100 UFC/ml	Apéndice "B"
Hongos y levaduras	25 UFC/ml	NOM-111-SSA1-1994

TABLA No. 4 Especificaciones microbiológicas para jugos esterilizados comercialmente

ESPECIFICACIONES	LÍMITE MÁXIMO	MÉTODO DE REFERENCIA
Mesofílicos anaerobios	Ausente	NOM-130-SSA1-1995
Mesofílicos aerobios	Ausente	Apéndice "B"
Mohos y levaduras viables	Ausente	NOM-111-SSA1-1994

6.4 Contaminantes Químicos

Los productos objeto de esta norma, no deben exceder los límites de los ningún contaminante

químico, fuera de los límites que se muestran en la tabla No. 5.

TABLA No. 5 Especificaciones de contaminantes químicos.

ESPECIFICACIONES	MÁXIMO (mg/kg)	MÉTODO DE REFERENCIA
Plomo (Pb)	0,3	NOM-117-SSA1-1994
Estaño (Sn)	250,0	NOM-117-SSA1-1994
Zinc (Zn)	5,0	NOM-117-SSA1-1994
Arsénico (As)	0,2	NOM-117-SSA1-1994
Cadmio (Cd)	0,1	NOM-117-SSA1-1994
Cobre (Cu)	5,0	NOM-117-SSA1-1994
Hierro (Fe)	15,0	NOM-117-SSA1-1994
Dióxido de azufre (SO ₂)	10,0	NMX-B-35-S-1981
Dióxido de azufre (SO ₂), para el caso del Jugo de uva	50,0	NMX-B-35-S-1981

6.5 Aditivos

6.5.1 Acidulantes y amortiguadores de pH

Ácido cítrico, ácido málico, ácido tartárico, citrato de sodio, fumarato de sodio, fumarato de potasio, carbonato de sodio, carbonato de potasio, tartrato de sodio, tartrato de potasio y sus mezclas, para ajustar la relación de sólidos solubles/acidez titulable y regulador de pH, además de los permitidos por la Secretaría de Salud.

6.5.2 Antioxidantes

Ácido L-ascórbico y/o sus sales de sodio o potasio y/o eritorbato de sodio y otros permitidos por la Secretaría de Salud.

6.5.3 Conservadores

Queda prohibido el uso de conservadores.

6.5.4 Otros aditivos

Se permite el uso de aditivos admitidos por la Secretaría de Salud para este tipo de alimentos.

6.6 Saboreadores, saborizantes o aromatizantes y colorantes orgánicos naturales

Se permite exclusivamente la adición de saborizantes naturales, aromas o saboreadores idénticos a los naturales y colorantes orgánicos naturales, de acuerdo a las Buenas Prácticas de Fabricación.

6.7 Azúcares

Se permite el uso de los siguientes azúcares: sacarosa, glucosa, fructosa, azúcar invertido y otros azúcares permitidos por la Secretaría de Salud, en un límite máximo de 5% de sólidos volumen total (m/v).

7 LLENADO

Se deberá de cumplir con la NOM-002/SCFI-1993. Productos envasados. Contenido Neto - Tolerancias y Métodos de verificación.

8 MUESTREO

Cuando se requiera el muestreo del producto, este podrá ser establecido de común acuerdo entre el proveedor y comprador (se recomienda el uso de la norma NMX-Z-12-1-1987 y/o NMX-Z-12-3-1987).

9 MÉTODOS DE PRUEBA

Para verificación de las especificaciones físicas, químicas y microbiológicas que se establecen en esta norma, se deben aplicar las normas oficiales mexicanas y las normas mexicanas (en ausencia de éstas los métodos reconocidos y validados que permiten la verificación real de la calidad del producto) que se indican en el capítulo de referencias, así como en los establecidos en los apéndices A y B.

10 ENVASE

Los productos objeto de esta norma se deben envasar en recipientes limpios elaborados con materiales inocuos. Resistentes a las condiciones de envasado, almacenaje y manejo de tal manera que no cedan al producto sustancias tóxicas u otras, que alteren las propiedades físicas, químicas, microbiológicas y sensoriales del producto.

11 ETIQUETADO

Las etiquetas o impresiones indelebles en los envases, deberán observar lo dispuesto en la NOM-051-SCFI-1994 "Norma general de etiquetado para alimentos y bebidas no alcohólicas preenvasados".

12 BIBLIOGRAFÍA

11.1 A.O.A.C., "Total Sulfurous Acid; Modified Monier-Williams Method", 14th. ed., Sections 20.123-20.125, pp 391-392.

11.2. F.D.A., Code of Federal Regulations. Ref. 101.100, Appendix A, July 1986.

11.3. F.D.A. Code of Federal Regulations. Chapter 1 (4-1-91 Edition) Ref. 102.33 Diluted fruit or vegetable juice beverages other than diluted orange juice beverages.

11.4. F.D.A., Code of Federal Regulations. Chapter 1 (4-1-96 Edition) Ref. 146.187 Canned prune juice.

11.5. Secretaría de Salud, Ley General de Salud, 10a. ed., Editorial Porrúa, S.A., México, D.F., 1993.

11.6 NOM-F-044-1982 Alimentos- Frutas y Derivados. Jugo de uva. Foods. Fruits and derivatives-Grape Juice.

11.7 NOM-F-045-1982 Alimentos Frutas y Derivados. Jugo de manzana.

11.8 NOM-F-118-1984. Alimentos-Bebidas No alcohólicas-Jugo de naranja envasado.Foods-Soft drinks-Canned Orange Juice.

11.9 PROY-NOM-109-SSA1-1994.Bienes y Servicios. Procedimientos para la toma, manejo y transporte de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.

11.10 NMX-F-018-1968 Jugo de Toronja.

11.11 AOAC. Official Method 982.21 Carbon Stable Isotope Ratio of Orange Juice. Section 37.1.61, 1997.

12 CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES

Esta norma mexicana no concuerda con ninguna norma internacional por no existir en el momento de la elaboración.

Primero.- La presente norma entrará en vigor 60 días después de la publicación de su declaratoria de vigencia en el Diario Oficial de la Federación con excepción de lo establecido en los artículos siguientes:

Segundo.- Durante los primeros 365 días siguientes a la entrada en vigor de la presente norma mexicana, las especificaciones indicadas en la tabla número 2, podrán tener una tolerancia de $\pm 20\%$, cuando estas sean verificadas con el método de prueba indicado en el apéndice normativo A. Posterior a esta fecha durante los siguientes 365 días las especificaciones deberán cumplir con la tolerancia establecida en el método correspondiente.

Tercero.- El grupo de trabajo se compromete a revisar la norma en un plazo de tres años con el objeto de modificar, en por lo menos un 3% hacia arriba los grados brix de fruta, propuestos como piso inferior.

APENDICE A

DETECCIÓN DE AZÚCAR DE CAÑA O JARABE DE MAÍZ CON ALTO CONTENIDO DE FRUCTOSA EN JUGOS DE FRUTAS - MEDIANTE LA DETERMINACIÓN DE LA RELACIÓN ISOTÓPICA DE CARBONO ($\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$) POR ESPETROMETRÍA DE MASAS DE ISÓTOPOS ESTABLES.

A1. ALCANCE

Esta metodología es aplicable en la detección de azúcar de caña o jarabe de maíz con alto contenido de fructosa en jugos de fruta provenientes de frutos maduros de la variedad correspondiente o preparados a partir de concentrados o en concentrados de fruta obtenidos por proceso industrial de eliminación del agua contenida en los jugos. Este método no es aplicable para el caso de jugo de piña.

A2. DEFINICIONES

La determinación del contenido natural de carbono – 13 (^{13}C) por Espectrometría de Masas de Isótopos Estables se expresa por los cocientes de las abundancias de los átomos estables de carbono 12 y 13 ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) los cuales están referidos a un patrón internacional el cual es físicamente un carbonato de calcio (CaCO_3) de origen marino proveniente de la formación cretácica Peedee de Carolina del Sur, conocido como PDB (Pee Dee Belemnite Limestone). La unidad de reporte es δ en partes por mil (‰). De acuerdo a la siguiente ecuación (Craig, 1957):

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

La comisión de pesos atómicos y abundancias isotópicas de la Unión Internacional de Química y Aplicada (IUPAC) publicó sus recomendaciones en su reunión de agosto de 1995 para el reporte de datos isotópicos de H, C y O. Para reportar los análisis isotópicos de carbono-13 deben ser relativos a VPDB (Vienna Pee dee Belemnite) es cual está referido en términos de la calcita NBS-19.

A.3 PRINCIPIO

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

La proporción de isótopos estables ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) contenidos en los alimentos, son típicos de su origen o de su procedencia y en mucho menor escala de los posteriores procesos industriales que sufren. En general la proporción isotópica de origen se mantiene, por lo cual nos permite identificar su fuente.

La base del método consiste en relacionar la cantidad de isótopos estables expresada en unidades delta de un producto determinado con el correspondiente ciclo fotosintético de la planta origen de la materia prima. Lo anterior es debido a que los mecanismos fotosintéticos de la fijación del CO_2 atmosférico por las plantas se realiza principalmente a través de dos procesos.

A.3.1 Descripción de los diferentes tipos de origen

Con respecto al origen de jugos y néctares de frutas, las plantas se clasifican en tres grandes grupos dependiendo del proceso fotosintético que utilizan para fijar el CO_2 atmosférico. Plantas tipo C_3 utilizan el ciclo de Calvin, las plantas tipo C_4 siguen el ciclo de Hatch Slack y las plantas denominadas CAM (Crasulacean Acid Metabolism).

El ciclo de Calvin es empleado por plantas tipo C₃, a este ciclo pertenecen los frutales, entre otros, manzana, pera, durazno, plátano, uva, mango, guayaba, cítricos como naranja, toronja, mandarina y limón.

El ciclo de Hatch Slack es empleado por plantas C₄, a este ciclo pertenecen plantas como: caña de azúcar y maíz. De este tipo de plantas se derivan edulcorantes hechos por el hombre como son el azúcar de caña y el jarabe de maíz con alto contenido en fructuosa.

El tercer grupo de las plantas es denominado CAM (Crasulacean Acid Metabolism). A este grupo pertenecen plantas como la piña.

Entre los grupos de plantas C₃ y C₄ existe una diferencia considerable en la proporción de isótopos estables (¹³C/¹²C) contenidos en las plantas. Por lo que midiendo la $\delta^{13}\text{C}$ en jugos, jugos concentrados o néctares es posible reconocer el proceso fotosintético de la planta que les dio origen.

El grado de mezcla entre azúcares provenientes de plantas C₃ con plantas C₄ (azúcares exógenos) se puede estimar mediante una proporción lineal construida tomando como extremos la composición isotópica de $\delta^{13}\text{C}$ de los edulcorantes exógenos y la composición isotópica de $\delta^{13}\text{C}$ de la variedad en estudio. Como ejemplo véase fig. 1.

A.4 DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO DE PRUEBA

La $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ se determina en un Espectrómetro de Masas de Isótopos Estables utilizando el CO₂ obtenido de la combustión de la muestra. Los resultados se reportan como $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ expresado en ‰ calculado de acuerdo a la ecuación 1.

Para realizar el análisis, se toma una alícuota del material orgánico de interés el cual se oxida completamente hasta formar CO₂ y H₂O. El CO₂ obtenido de la reacción de oxidación es purificado mediante un proceso de separación criogénica.

En la literatura internacional se reportan dos métodos de combustión. Uno que utiliza una combustión dinámica (Craig, 1953). Algunos espectrómetros modernos utilizan un método de flujo continuo que utiliza un sistema compuesto de Analizador Elemental – horno de combustión – columna de separación – un espectrómetro de masas de isótopos estables.

Y otro en la cual la combustión se lleva a cabo en tubo de cuarzo sellado el cual describiremos a continuación (Cienfuegos, Casar y Morales, 1997). No se recomienda el método de combustión en tubo de pyrex a 550°C.

A.5 TÉCNICA ANALÍTICA PARA DETERMINAR LA $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ EN MUESTRAS ORGÁNICAS

A.5.1 Objetivo de la Técnica

El objetivo es transformar totalmente el carbono proveniente de la materia orgánica de la muestra en bióxido de carbono (CO₂ puro), para medir su $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ en el Espectrómetro de Masas de Isótopos Estables. Lo anterior se realiza mediante la combustión total de la muestra en presencia de óxido cúprico, plata y cobre metálico activado. Todos estos materiales están contenidos en un tubo de cuarzo sellado al vacío a 900°C durante dos horas seguido por una estancia de una hora a 650°C

A continuación se hace la descripción detallada del método.

A.5.2 Reactivos y Materiales

A.5.2.1 Óxido Cúprico en alambre. El óxido cúprico es pasado por una malla del No. 40 para retirar el polvo. Posteriormente es quemado en una mufla a 850°C durante tres horas para oxidar toda la materia orgánica que contenga.

A.5.2.2 Plata 99.9994% de pureza. Es laminada con un grosor entre 0.1 y 0.4 mm y cortada en secciones de 1 mm de ancho por 7 mm de largo. Las cuales son limpiadas con una solución de ácido nítrico al 1%, posteriormente son lavados con agua destilada y son calentados en una mufla a 400°C durante una hora. La plata es usada como catalizador en el tubo de combustión.

A.5.2.3 Cobre metálico activado (granalla). (Alpha Resources Inc. P.O. BOX 199 Stevensville, Michigan 49127, U.S.A).

A.5.2.4 Tanque de oxígeno industrial, con regulador y mangueras para operación del soplete.

A.5.2.5 Gas Butano para uso doméstico entubado para la operación del soplete.

A.5.3.6 Tanque de CO₂ (Grado analítico), de 99.995% mínimo de pureza en un cilindro de 7 L, contenido en un tanque metálico a una presión máxima de 5860 KPa a 294°K (21°C) con un regulador de dos pasos con una presión de entrega de 5l/min para trabajar con cilindros con una presión máxima de 100 KPa. Para ser utilizado como patrón interno de trabajo en el espectrómetro de masas de relaciones isotópicas.

A.5.2.7 Hielo seco.

A.5.2.8 Etanol Industrial.

A.5.2.9 Nitrógeno líquido.

A.5.2.10 Grasa para alto vacío marca Apiezon N o M.

A.5.2.11 Pinzas de punta y espátula de acero inoxidable para el manejo de muestras de 10 mg.

A.5.2.12 Secadora de aire caliente tipo industrial con capacidad de alcanzar 500°C con ventilador tipo jaula de ardilla de 1500 rpm.

A.5.2.13 Gatos mecánicos de laboratorio de diferentes tamaños.

A.5.2.14 Generador tesla para detección de fugas en sistemas al vacío de vidrio.

A.5.2.15 Tubo de cuarzo de 9.0 mm de diámetro externo, 7 mm de diámetro interno y 20 cm de largo, sellado por un lado con soplete. El cual se utiliza como tubo de combustión.

A.5.2.16 Tubo de cuarzo de 6.0 mm de diámetro externo, 4 mm de diámetro interno y aproximadamente 2 cm de largo, sellado por un lado con soplete. El cual se utiliza para mantener separado el óxido cúprico del cobre metálico y como contenedor para muestras orgánicas sólidas.

A.5.2.17 Tubo de cuarzo de 3.2 mm de diámetro externo, 2 mm de diámetro interno y aproximadamente 2 cm de largo terminado en punta para ser utilizado como tubo capilar como contenedor de muestras orgánicas líquidas.

A.5.2.18 Tubo de cuarzo de 3.2 mm de diámetro externo, 2 mm de diámetro interno y aproximadamente 2 cm de largo se coloca un filamento de plata de 1mm x 7mm de largo y se sella por ambos lados dejando un pequeño orificio para sostener el filamento de plata.

A.5.2.19 Todo el material de cuarzo se purifica en una mufla a 600°C durante 1 hora para eliminar cualquier partícula de materia orgánica, una vez purificado se guarda en recipiente mantenido en un horno de secado a 40-60°C.

A.5.2.20 Frascos contenedores de pyrex con válvula para alto vacío con pistón de teflón o de vidrio. Estos frascos se utilizan para transportar el CO₂ de la línea de preparación de muestras sistema de introducción del espectrómetro de masas de relaciones isotópicas.

A.5.2.21 Termos de pyrex de diferentes tamaños (1, 1/2 y 1/4 lt) para nitrógeno líquido.

A.5.2.22 Termo de 50 litros de acero inoxidable para guardar nitrógeno líquido.

A.5.2.23 Un soplete (antorcha) de gas - oxígeno capaz de alcanzar la temperatura de fusión del cuarzo.

A.5.2.24 Uniones cajón ultra torr de 3/8 No. SS-6-UT-6 y filtro para gases SS4VCR25M.

A.5.2.25 Se requiere un sistema para romper el tubo de cuarzo que contiene el gas CO₂ proveniente de la muestra, este sistema se encuentra formado por las siguientes partes:

- a) una unión reductora cajón de ½ a ¼ ultra torr, No. SS-8-UT-6-4,
- b) tubo flexible cajón de ½, No. 321-8X-1,
- c) dos conos de acero inoxidable 304-8-XOA,
- d) una unión reductora cajón ultra torr de ½ a 3/8 y un filtro para gases SS4VCR25M. El material de este inciso es para un solo rompedor. (Uniones Cajón. Swagelok Companies) Descrito en el artículo DesMaris y Hayes 1976.

A.5.2.26 Microjeringas de volumen variable de 0 a 50 µl. y de 0 a 10 µl con puntas de plástico desechables.

A.5.3 Equipos

A.5.3.1 Mufla - La combustión de la materia orgánica en tubo de cuarzo sellado se realiza en una mufla que puede operar a una temperatura máxima de 1100°C equipada con control digital de temperatura con un error no mayor de ±5°C y un control de tiempo con una resolución de 1 min.

A.5.3.2 Línea de Vacío para la desgasificación de las muestras, (ver figura 3). Equipada con dos bombas de vacío con una capacidad de bombeo de 4 m³/hr y una bomba difusora con trampa para nitrógeno líquido con una velocidad de bombeo de 100 l/seg.

A.5.3.3 Línea de vacío para la purificación criogénica de las muestras, (ver figura 4). Equipada con dos bombas de vacío con una capacidad de bombeo de 4 m³/hr y una bomba difusora con trampa para nitrógeno líquido con una velocidad de bombeo de 100 l/seg.

A.5.3.4 Espectrómetro de Masas de Isótopos Estables para medir la δ¹³C tipo Finnigan Mat 250, Delta Plus XL o Micromass Optima. La precisión interna deberá de 0,01 ‰ y la precisión externa de 0,05 ‰. La linealidad debe ser < 0,02 ‰ por nanoamper de corriente de iones. Durante la operación del espectrómetro, las mesetas de los picos para colector universal CNOS debe ser m/Δm = 95 (10% valle) y para D/H la resolución = 10 (10% valle).

A.5.3.5 Balanza analítica con una precisión de 0,1 mg.

A.5.3.6 Centrífuga con rotor de 45° con capacidad de 6 tubos de 46 a 50 ml que alcance 4500 rpm.

A.5.3.7 Horno de secado. Que mantenga una temperatura entre 50 – 60°C

A.6 PREPARACIÓN Y ACONDICIONAMIENTO DEL MATERIAL Y DE LA MUESTRA.

- a) Preparación del tubo de combustión. Al tubo de cuarzo quemado a 600°C se le adicionan alrededor de 3 g de óxido cúprico y el capilar con filamento de plata (Fig. 2). El conjunto es calentado una hora a 600°C en una mufla para eliminar cualquier resto de materia orgánica. Los tubos así preparados son almacenados en un recipiente de vidrio con tapa en un horno a 40-60°C.
- b) Preparación de muestras de jugos, néctares y concentrados de jugos para análisis isotópico. Se centrifuga alrededor de 50 ml de jugo o néctar durante 10 min a 4500 rpm. Si es un concentrado de jugo, este se diluye con agua destilada al 50% y se centrifuga durante 10 min a 4500 rpm. En ambos casos la centrifugación elimina los sólidos no solubles.
- c) Se toman entre 40 a 90 µl del sobrenadante dependiendo de la concentración del jugo y se colocan en un capilar de cuarzo el cual es introducido en el tubo de combustión descrito previamente (véase fig. 2).

Posteriormente se coloca un tubo pequeño de 6 mm de diámetro externo de cuarzo y se deposita invertido dentro del tubo de combustión de cuarzo de 9 mm de diámetro externo que contiene CuO, el filamento de plata y la muestra, finalmente se colocan alrededor 3 g de cobre metálico con un embudo. La combustión de la muestra se realiza utilizando el oxígeno liberado por el óxido cúprico, siendo la plata el catalizador de la reacción y el cobre metálico sirve para poder convertir los óxidos de nitrógeno en N₂ a una temperatura de 650°C.

- d) Los tubos de combustión preparados como en el inciso c, se colocan en la línea de vacío (véase Fig. 3) mediante una unión ultra torr de 3/8". Las muestras se liofilizan a una presión de 1.33 Pa y finalmente se evacuan hasta alcanzar una presión de 0.133 Pa, una vez alcanzada esta presión, el tubo de cuarzo es sellado con soplete de alta temperatura.
- e) Cada vez que se prepara un conjunto de muestras para análisis isotópico de $\delta^{13}\text{C}$, simultáneamente se prepara un material de referencia de distribución internacional pudiendo ser cualquiera de los siguientes: (8539: NBS-22 (4 μ l), 8540: PEF1 (4 mg) o 8242: Sucrose, ANU (8 mg)). Para Calibrar el espectrómetro de masas se utilizan además otros materiales de referencia como lo son el 8544: NBS-19 y 8543: NBS-18.

A.6.1 Combustión

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

A.6.2 Purificación de CO₂.

El CO₂ producto de la combustión de la muestra es separado y purificado criogénicamente, iniciando con la separación del agua mediante una mezcla frigorífica (mezcla de hielo seco con alcohol o acetona a -80°C), para la purificación se utiliza otra trampa enfriada con nitrógeno líquido (-190°C) que captura el CO₂ y se eliminan los gases no condensables a través de una línea de vacío Figura 4.

Operación de la línea de vacío de la Figura 4.

Se cierran válvulas 1 y 2. Se marca el tubo de cuarzo con un cortador de vidrio y se coloca en el rompedor en la posición A de la línea de vacío con una pinza unión de junta esférica. Se abre la válvula 1, se evacua hasta alcanzar una presión de 1,33 Pa y posteriormente utilizando la bomba difusora hasta obtener una presión de 0,133 Pa.

Se coloca un termo con mezcla frigorífica (-80°C) en la trampa B para condensar el agua y un termo con nitrógeno líquido (-190°C) en la trampa C para condensar el CO₂.

Se cierra la válvula 1 y se procede a romper el tubo, flexionando el rompedor. Los gases no condensables se bombean a través del sistema de vacío, abriendo primero la válvula 5 y después la válvula que conecta a la bomba difusora.

Una vez que se tiene una presión de 0,133 Pa se cierran las válvulas 3 y 4, se retira el termo con nitrógeno líquido y se mide la presión del CO₂ purificado calentándolo a temperatura ambiente midiendo con un manómetro digital.

El CO₂ purificado se transfiere al frasco contenedor utilizando nitrógeno líquido a través de la válvula 4 y cerrando la válvula 5. Se cierran válvulas y se retira el frasco contenedor

Los frascos con el CO₂ purificado se colocan en el sistema automático de introducción del espectrómetro de masas de isótopos estables para determinar la $\delta^{13}\text{C}$ de las muestras.

A.7 OBTENCIÓN DE RESULTADOS

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

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

El espectrómetro de masas de isótopos estables da el resultado de cada análisis directamente en unidades de $\delta^{13}\text{C}$ con las correcciones por efecto de presión, de masas parásitas, efecto de memoria, gas residual, mezcla de gases por cambio de válvulas y por abundancia isotópica.

La precisión de esta técnica esta dada por la desviación estándar de los análisis de los patrones internacionales y del patrón interno realizados durante los últimos 12 meses (0,02 ‰). Cabe hacer notar que la desviación estándar internacionalmente aceptada para esta técnica es de 0,2 ‰.

A.7.1 Interpretación de Resultados.

Los valores de $\delta^{13}\text{C}$ para las muestras de jugos está dado por un intervalo de variación natural el cual es -25 ± 1 ‰.

FALTA INTEGRAR LA
FIGURA 1

FALTA INTEGRAR LA
FIGURA 2

FALTA INTEGRAR LA
FIGURA 3

FALTA INTEGRAR LA
FIGURA 4

APENDICE B

METODO PARA LA DETERMINACION DE MICROORGANISMOS MESOFILICOS EN ALIMENTOS DE ALTA ACIDEZ. AGAR SUERO NARANJA

B.1 ALCANCE

Este método establece la determinación de microorganismos mesofilicos aerobios en jugos y néctares de frutas cítricas y otros productos de alta acidez.

B.2 FUNDAMENTO

La adición de suero de naranja clarificado y el resto de los ingredientes nutritivos proveen un medio ambiente óptimo para la recuperación de microorganismos ácido- tolerantes que provienen de los jugos cítricos. El medio es suficientemente claro, lo que permite el conteo y aislamiento de las colonias, así como su estimación.

B.3 EQUIPOS E INSTRUMENTOS

B.3.1 Balanza analítica.

B.3.2. Parrilla de calentamiento.

B.3.3 Autoclave.

B.3 REACTIVOS Y MATERIALES

B.3.1 Agar Suero Naranja - Disolver 10 g de suero de naranja, 3 g de Extracto de levadura, 10 g de Caseína hidrolizada, 4 g de Dextrosa, 2,5 g de Fosfato de potasio y 15,5 g de agar en 1 litro de agua, ajustar el pH a 5,5 ± 0,2.

B.3.1.3 Preparación del agar suero naranja

- a) Disolver 45 g de la mezcla de los ingredientes en polvo en un litro de agua y agitar.
- b) Calentar con agitación constante, hasta ebullición, mantenerse por un minuto para lograr la completa dispersión de los polvos.
- c) Esterilizar en autoclave a 121 °C por 10 minutos.

B3.2 Cajas petrí estériles.

B3.3 Matraz elermeyer.

B3.3 Pipetas.

B.4 PROCEDIMIENTO

- a) Adicionar 1 ml de muestra a analizar y agregar 18 ml de agar suero de naranja estéril enfriado a una temperatura de 45 – 50 °C.
- b) Mezclar el contenido aproximadamente 3 minutos, meter a incubar a 30 ± 2 °C de 48 a 72 horas.
- c) Contar el número de colonias aisladas y reportarlas como Unidades Formadoras de Colonias (UFC/ml).