

SE

IMPI

INSTITUTO MEXICANO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL



TÍTULO DE PATENTE No. 359933

Titular(es): CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y DISEÑO DEL ESTADO DE JALISCO, A.C.

Domicilio: Av. Normalistas 800, Colinas de la Normal, 44270, Guadalajara, Jalisco, MÉXICO

Denominación: FLUORESCENCIA INDUCIDA POR LÁSER PARA LA DETECCIÓN DE BEBIDAS ALCOHÓLICAS ADULTERADAS

Clasificación: CIP: G01N30/02; G01N31/22
CPC: G01N30/02; G01N31/22

Inventor(es): JESÚS CERVANTES MARTÍNEZ

SOLICITUD

| Número: | Fecha de Presentación: | Hora: |
|------------------|------------------------|-------|
| MX/a/2015/014693 | 19 de Octubre de 2015 | 14:45 |

Vigencia: Veinte años

Fecha de Vencimiento: 19 de octubre de 2035

Fecha de Expedición: 26 de septiembre de 2018

La patente de referencia se otorga con fundamento en los artículos 1º, 2º fracción V, 6º fracción III, y 5º de la Ley de la Propiedad Industrial.

De conformidad con el artículo 23 de la Ley de la Propiedad Industrial, la presente patente tiene una vigencia de veinte años improrrogables, contada a partir de la fecha de presentación de la solicitud y estará sujeta al pago de la tarifa para mantener vigentes los derechos.

Quien suscribe el presente título lo hace con fundamento en lo dispuesto por los artículos 6º fracciones III y 7º bis 2 de la Ley de la Propiedad Industrial (Diario Oficial de la Federación (D.O.F.) 27/06/1991, reformada el 02/08/1994, 25/10/1996, 26/12/1997, 17/05/1999, 26/01/2004, 16/06/2005, 25/01/2006, 06/05/2009, 06/01/2010, 18/06/2010, 28/06/2010, 27/01/2012, 09/04/2012, 01/06/2016 y 13/03/2018); artículos 1º, 3º fracción V inciso a), 4º y 12º fracciones I y III del Reglamento del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (D.O.F. 14/12/1999, reformado el 01/07/2002, 15/07/2004, 28/07/2004 y 7/09/2007); artículos 1º, 3º, 4º, 5º fracción V inciso a), 16 fracciones I y III y 30 del Estatuto Orgánico del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (D.O.F. 27/12/1999, reformado el 10/10/2002, 29/07/2004, 04/08/2004 y 13/09/2007); 1º, 3º y 5º inciso a) del Acuerdo que delega facultades en los Directores Generales Adjuntos, Coordinadores, Directores Divisionales, Titulares de las Oficinas Regionales, Subdirectores Divisionales, Coordinadores Departamentales y otros subalternos del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial. (D.O.F. 15/12/1999, reformado el 04/02/2000, 29/07/2004, 04/08/2004 y 13/09/2007).

El presente oficio se signa con firma electrónica avanzada (FIEL), con fundamento en los artículos 7 BIS 2 de la Ley de la Propiedad Industrial; 3o de su Reglamento, y 1 fracción III, 2 fracción V, 26 BIS y 26 TER del Acuerdo por el que se establecen los lineamientos para el uso del Portal de Pagos y Servicios Electrónicos (PASE) del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial, en los trámites que se indican.

LA DIRECTORA DIVISIONAL DE PATENTES NAHANNY CANAL REYES



Cadena Original:
NAHANNY MARISOL CANAL REYES|00001000000403252793|Servicio de Administración Tributaria|1695||MX/2018/92107|MX/a/2015/014693|Título de patente normal|1027|RGZ|Pág(s) 1|SUaZF0aCchwsZNd2+gB9bsq2wpl=

Sello Digital:
B5mxb23dBFR4QgsRRBqQPEYYH7Ik9YXsO+wGa0Dt7+VEIPTw7splQvj9p7qG3Oh1alcuZUImNAUdSsz7aweCuRtGpl.
KyTTdwZ+Az8RvWVn7wtPdeQqoJZdSLsTenfVUH0c5ZIVHTsBmBU3j/vqi6M+BgZgyKF0fsryVxQSryJ6amFOFqE
AC/3pHIAI6zoA1Tntv3mf4LD+mVsooTP8ENpPyVeI9s+pW5j/Cu7VoXEKBRPcq3TGskAGrwbkCCjyyZbrTdiDjc
qMAeqCWsuFBptdVzx6ZF0kLi6/hkHo7HEHVvClzIW56zr3O3rf7KJbsDVb3CVZ+oiQMIEhQ==



FLUORESCENCIA INDUCIDA POR LÁSER PARA LA DETECCIÓN DE BEBIDAS**ALCOHÓLICAS ADULTERADAS****CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION**

- 5 La presente invención está relacionada con el área de la física, más específicamente en la clasificación e identificación de bebidas alcohólicas auténticas, falsas o adulteradas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La maduración de bebidas alcohólicas se realiza en barricas de roble blanco o encino
10 blanco, maderas que confieren al producto final aromas, colores y sabores muy peculiares, los cuales dependen de diversos factores como la edad, grosor de la duela, graduación alcohólica y condiciones de reposo o añejamiento. La maduración se caracteriza por cambios en el color y sabor de bebidas alcohólicas como el ron, tequila, mezcal y whisky. Estos cambios en general involucran:

- 15
- Extracción de compuestos muy complejos de la madera.
 - Reacciones entre los constituyentes de la madera y los compuestos de las bebidas alcohólicas.
 - Reacciones de oxidación que involucran solamente los compuestos extraídos de la madera.
- 20
- Reacciones de oxidación que involucran solamente los compuestos originales de las bebidas alcohólicas.
 - Evaporación de compuestos volátiles.

Como consecuencia de estos cambios, la concentración de ácidos, ésteres y aldehídos se incrementa, a la vez que la concentración de alcoholes superiores



decrece (Cedeño, 1995; Mosedale y col., 1999). Por último, antes de embotellar es necesario eliminar algunos sólidos conferidos por la madera, esto se realiza a través de filtración con celulosa o carbón activado (Poncelis, 2000).

Una vez que ya están embotelladas las bebidas alcohólicas, están listas para su distribución en el mercado nacional e internacional. Es aquí donde la detección de alguna adulteración en estas bebidas cobra importancia, ya que obviamente el consumidor quiere adquirir un producto que sea auténtico y también las fábricas de tequila, ron mezcal o whisky quieren proteger sus marcas.

Tomando en cuenta que el ingreso monetario que aporta la elaboración de las diferentes bebidas alcohólicas a los gobiernos de las distintas regiones del mundo es tan grande, la producción de estas bebidas es una de las industrias y actividades más supervisadas y reguladas en todo el mundo, y en muchos de los casos, esta supervisión es efectuada directamente por dependencias de gobierno mediante el uso de diversas técnicas analíticas.

Para poder llevar a cabo una vigilancia de manera efectiva sobre la producción de bebidas alcohólicas es necesario contar con técnicas analíticas que ayuden a caracterizar las materias primas utilizadas para la elaboración de estas bebidas, así como el producto final. Todo esto con el propósito de asegurar que el producto resultante es elaborado de acuerdo a su descripción, es decir que es auténtico, y además cuente con ciertos parámetros de calidad. Para lograr este objetivo, se han desarrollado muchas técnicas analíticas para caracterizar y autenticar bebidas alcohólicas. De esta forma, para la autenticación de materias primas se han utilizado técnicas de análisis molecular del ADN para la identificación de cultivares en mostos de uvas utilizadas en la elaboración de vinos (García-Beneytes y col., 2002),



así como para evaluar la diversidad genética de Agave tequilero (Gil-Vega y col., 2006), el único agave permitido para la elaboración de tequila de acuerdo a su norma oficial mexicana (Secofi, 2006).

En cuanto a la caracterización del producto final, la medición de abundancia de isótopos de carbono por la técnica de resonancia magnética nuclear se ha aplicado para la autenticación de vinos (Guillou y col., 1992). También, la autenticación de diferentes tipos de bebidas espirituosas usando la técnica de GC IRMS, se ha realizado en base a la relación de isótopos que se encuentran presentes de manera natural en estas bebidas (Bauer-Christoph y col., 2003). Así mismo, la cromatografía de gases se ha utilizado para la caracterización y autenticación de whiskeys irlandeses (Gonzalez-Arjona y col., 1999) (Fitzgerald y col., 2000).

Además, se han utilizado técnicas de cromatografía de gases con diferentes detectores para la identificación de más de 175 compuestos presentes en tequila (Benn y Peppard, 1996); el cociente de isótopos y la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, se utilizó para discriminar tequilas de otras bebidas espirituosas (Aguilar-Cisneros y col., 2002) y para autenticar el tequila 100% y mixto (Bauer-Christoph y col., 2003).

Una estrategia similar se describe en el documento de patente CN103792300 B, en el que se refiere un método para detectar si una bebida alcohólica ha sido adulterada, se emplean técnicas de cromatografía de gases y espectrometría de masas, y se hace uso de isótopos estables de carbono como trazadores. Se describe como parte del método el establecimiento de una base de datos de la proporción de los isótopos de carbono en una bebida auténtica que se tomará como parámetro de comparación para determinar la autenticidad de las bebidas analizadas. La base del



método descrito consiste en que los productos de origen natural, y en este caso las bebidas destiladas originales tendrán una relación de isótopos estables de carbono determinada e invariable, y que se ve alterada cuando a las bebidas se adicionan aromatizantes, edulcorantes o colorantes exógenos; siendo así posible la detección de esta adulteración por medio de técnicas de cromatografía de gases y espectroscopia de masas de acuerdo con el método que se describe en este documento. Sin embargo; la solución propuesta en este documento no sería efectiva en el caso de adulteraciones en las cuales no se incluyan sustancias exógenas en las bebidas.

Otras sistemas de detección se han propuesto, como es el caso del documento de patente US 8,071,386 B2, en el que se describe un método para realizar un marcaje invisible en productos de consumo humano, por ejemplo las bebidas alcohólicas, y se proporciona un método para la identificación de tal marcaje invisible permitiendo determinar la autenticidad de productos entre los que se incluyen además de las bebidas alcohólicas, perfumes, preparaciones médicas y cosméticas. El método propuesto consiste en la incorporación de al menos un ion como un marcador dentro del producto a ser marcado. El ion (o iones) marcador es un anión o catión, no isotopo, proveniente de sales marinas, no tóxico, y que se incorpora en una cantidad de 3 a 8 veces la concentración en la que inicialmente se encuentra presente el ion en el producto de marcaje. Y para determinar la autenticidad de la bebida se propone un método para la detección del ion de marcaje por medio de sensores electroquímicos y por análisis de espectroscopia de absorción de masas, cromatografía y combinación de estas técnicas. Sin embargo, como se menciona también en este documento, la incorporación de estos iones en los productos de



consumo humano debe cumplir con una serie de requisitos legales. Y otro punto a considerar, no mencionado en el documento, es si la adición de los iónes en las bebidas puede modificar de algún modo sus propiedades físico-químicas u organolépticas; y más aún si la modificación en los procesos de manufactura implicaría aumento en costos de producción por ejemplo.

Por otra parte, en adición a las adulteraciones que se hacen sobre las materias primas y el producto final, el reposado en barricas de roble blanco para la producción de cierto tipo de bebidas alcohólicas es también susceptible de sufrir algunos tipos de falsificaciones.

Este proceso tiene la finalidad de suavizar los aromas y sabores de las bebidas originales y la generación de nuevos compuestos que contribuyen al bouquet final. Sin embargo, esta etapa es una de las más costosas para la industria de bebidas alcohólicas, por lo que la adición de extractos de madera de roble blanco o color caramelo para simular el reposado en barricas de roble blanco es una práctica común entre algunos productores de estas bebidas.

Una de las medidas que se ha tomado para evitar la adulteración de este proceso, es la colocación de sellos en los accesos al interior de las barricas por parte de organismos reguladores. No obstante, este tipo de disposiciones no es suficiente para asegurar que una bebida alcohólica ha sido reposada en barricas de roble blanco, ya que pueden existir algunos productos a los que se les ha añadido alguna sustancia química con el propósito de que estas bebidas adulteradas, tengan la misma apariencia visual que aquéllas que si han pasado por este proceso.

Por lo tanto, para poder verificar de una manera efectiva si este proceso se llevó a cabo de acuerdo a la reglamentación correspondiente, se requiere hacer uso de



técnicas analíticas que ayuden a identificar las cantidades y el tipo de compuestos que se adquieren durante el reposado de bebidas alcohólicas en barricas.

Haciendo uso de la técnica de HPLC-DAD, los compuestos fenólicos más comunes que se han identificado como compuestos que aparecen o se incrementan con el reposado de bebidas alcohólicas en barricas de roble blanco son los siguientes: 5-hidroximetil furfural, furfural, 5-metil furfural, ácido gálico, ácido protocatecuico, ácido vainillinico, ácido siríngico, ácido 3,4-dihidroxibenzoico, ácido ferúlico, ácido cafeico, p-hidroxibenzaldehído, vainillina, siringaldehído, coniferaldehído, sinapinaldehído, escopoletina, esculetina, umbeliferona y metilumbeliferona (Salagoity-Auguste y col., 1987; Quesada Granados y col., 1996; Mangas y col., 1997; Mangas y col., 1996 ; García-Moreno y García-Barroso, 2002). Así, la presencia de estos compuestos en bebidas alcohólicas se ha tomado como una prueba de su permanencia en barricas de roble blanco durante un tiempo específico (de Aquino y col., 2006).

Así mismo, utilizando esta misma técnica para medir este tipo de compuestos, se ha reportado que es posible diferenciar vinos que han sido almacenados en barricas de roble de aquéllos que se han sometido a un tipo de añejamiento artificial con trozos de madera de roble blanco (del Alamo Sanza y col., 2004).

De la misma forma, también se ha reportado que es posible diferenciar el tipo de matriz (en este caso vinos avinagrados) que se someten a añejamiento en barricas de roble blanco, midiendo la evolución de los compuestos que estas bebidas adquieren durante este periodo (Tesfaye y col., 2002).

En el documento CN 1025990373 se describe un método para la determinación simultánea de 10 tipos de compuestos fenólicos volátiles en bebidas alcohólicas por técnicas de microextracción de líquidos en dispersión y detección por HPLC-FLD, en



donde se utilizan como agentes de dispersión sustancias como tetrahidrofurano, dietiléter, etanol, propanol, isopropanol, acetona o mezclas de las mismas, y para la extracción se utiliza cloruro de metileno o cloroformo. El método es de alta sensibilidad, se requieren pocas cantidades de muestra para los análisis de las bebidas y los resultados de los análisis de las pruebas se obtienen en tiempos cortos; sin embargo, se trata de métodos de detección en los cuales las bebidas que van a ser analizadas deben ser sometidas a procesos químicos destructivos, y no se hace referencia en este documento de que la detección de los compuestos fenólicos se pueda llevar a cabo de manera directa sobre los productos listos para su consumo, como sería el caso de una botella cerrada de alguna bebida destilada.

Como una opción más, se ha propuesto que los resultados de las técnicas analíticas pueden combinarse con métodos matemáticos como es el análisis estadístico multivariado, logrando así una poderosa herramienta para la clasificación y autenticación de los diferentes tipos de bebidas alcohólicas. Así, un análisis de componentes principales, de análisis discriminante y el análisis del vecino más cercano sobre las cantidades de polifenoles en sidras, sirvió para clasificar y confirmar la autenticidad de estas bebidas (Alonso-Salces y col., 2004; Alonso-Salces y col., 2006).

El análisis de componentes principales, análisis discriminante y análisis de regresión lineal, son solo algunos de los ejemplos de los métodos de análisis estadístico que se han aplicado para la clasificación de varios tipos de vinos y vinos avinagrados (Arvanitoyannis y col., 1999; Šperkova y Suchánek, 2005). En el caso del tequila, el análisis de componentes principales se ha aplicado para la clasificación y autenticación de los diferentes tipos de tequila (Lachenmeier y col., 2005).



Así es aún una problemática vigente no contar en la actualidad con un método que permita obtener resultados casi instantáneos y de una manera no destructiva cuando se realizan los procesos de verificación de la autenticidad de las bebidas alcohólicas destiladas y no destiladas, y que permita asimismo evitar el riesgo a la salud humana que representa el consumo de bebidas adulteradas en las cuales pueden existir cantidades importantes de metanol y/o de otros contaminantes tóxicos.

La consecución de los propósitos antes mencionados se hace posible de acuerdo con la presente invención, mediante el uso de una técnica como la Fluorescencia Inducida por Laser (LIF). Sádecká y col. (2009) utilizaron espectroscopia de fluorescencia para diferenciar brandis de vinos destilados. Esta técnica también ha sido usada para distinguir entre brandis añejados en barricas y aguardiente con color caramelo (Sádecká, & Tóthová, 2010), en el caso del tequila, Contreras y col. (2010) reportaron que tequilas adulterados y falsos pueden distinguirse de los correspondientes de marcas genuinas, basados en espectroscopia UV-VIS y técnicas quimiométricas.

Sin embargo, aún no existe un estudio que presente una técnica espectroscópica para la determinación simultánea de compuestos marcadores de añejamiento en bebidas alcohólicas. Por lo que, el objetivo de esta invención es proporcionar un método espectroscópico no destructivo y no invasivo para la identificación en tiempo real de bebidas alcohólicas adulteradas y no adulteradas, utilizando la fluorescencia inducida por láser.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Sistema para la obtención de espectros de fluorescencia inducida por láser (LIF) de bebidas alcohólicas.



Figura 2. Promedios de espectros de emisión de fluorescencia de muestras comerciales en celdas de cuarzo, PA tequila 100% añejo, PR100 tequila 100% reposado, PMR tequila mixto reposado, PB100 tequila 100% blanco y PMB tequila mixto blanco.

5 Figura 3. Espectros de fluorescencia de tres muestras comerciales de tequila añejo 100% (A100)

Figura 4. Espectros de fluorescencia de tres muestras comerciales de tequila reposado 100% (R100) y tres de tequila mixto reposado (RM)

10 Figura 5. Espectros de fluorescencia de muestras comerciales de tequila blanco 100% (B100) y Mixto (BM)

Figura 6. Espectros de fluorescencia de diferentes tipos de bebidas alcohólicas.

Figura 7. Espectros de fluorescencia de tequila blanco, 100% reposado, refresco de cola y tequila blanco adulterado.

15 Figura 8. Espectros de fluorescencia de tequila añejo y sus efectos al adicionarle alcohol de caña.

Figura 9. Espectros de fluorescencia de dos marcas diferentes de tequila 100% añejo, obtenidos a través de la botella y espectros de fluorescencia del vidrio de las botellas.

20 Figura 10. Espectros de fluorescencia de dos marcas diferentes de tequila añejo obtenidos a través de la botella y en celdas de cuarzo.

Figura 11. Espectros de fluorescencia de muestras comerciales de Whisky.

Figura 12. Espectros de fluorescencia de muestras comerciales de Whisky y tequilas.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION



La invención se refiere a un sistema y un método de fluorescencia inducida por láser, que permite verificar la autenticidad de las bebidas ~~alcohólicas destiladas y no~~ destiladas, así como detectar cuando dichas bebidas alcohólicas destiladas y no
5 destiladas están adulteradas. El sistema y el método que se proporcionan en la invención permite la realización de un análisis directamente sobre un producto embotellado, y listo para su liberación al sector usuario, sin que posterior al análisis sufra cambio alguno.

La invención se sustenta en utilizar propiedades físicas de algunos compuestos
10 fenólicos que pueden estar o no estar presentes en una bebida alcohólica, ya sea destilada o no destilada; particularmente en relación al fenómeno físico denominado fluorescencia. Estos compuestos fenólicos absorben energía en forma de radiación electromagnética y la emiten en una longitud de onda mayor en un periodo de tiempo muy corto. La energía electromagnética es suministrada por una fuente de luz
15 externa y cuando la luz es absorbida por el compuesto fenólico, se produce una transición electrónica en estas moléculas produciéndose una emisión de luz de menor energía que la que se absorbe, proceso al que se le conoce como fluorescencia. La emisión de la fluorescencia emitida por los compuesto fenólicos, llamados también fluoróforos, se recoge mediante un detector adecuado como un
20 espectrofotómetro y en función de la intensidad de emisión de fluorescencia y construcción de los correspondientes espectros de fluorescencia es posible construir bases de datos para distinguir a cada tipo de bebida alcohólica, ya sea destilada o no destilada, y también que permita identificar y detectar las bebidas que han sido adulteradas.



Así, como un objeto primordial de la invención se proporciona un sistema de fluorescencia inducida por láser que consiste de al menos un soporte (1) para colocar un medio de entrada (2) en el cual se encuentran las bebidas a analizar; el medio de entrada es irradiado por una fuente de energía de excitación (3) a través de un medio de conducción de la irradiación (4) que consiste en fibra óptica bifurcada; un detector de la intensidad de fluorescencia (5) conectado al medio de conducción de la irradiación (4) y, acoplado además a un procesador (6) para el análisis y procesamiento de los datos de fluorescencia para la generación de los espectros de fluorescencia de las diferentes bebidas alcohólicas. (Figura 1)

10 En una modalidad preferida de la invención el medio de entrada es una celda de cuarzo que contiene la bebida que se va a analizar, y dicha celda de cuarzo es irradiada a través de una fibra óptica bifurcada que está conectada con la fuente de energía de excitación que consiste en un láser de nitrógeno.

En otra modalidad de la invención el medio de entrada es la bebida embotellada sin
15 abrir, y la botella cerrada es directamente irradiada a través de una fibra óptica bifurcada que está conectada con la fuente de energía de excitación que consiste en un láser de nitrógeno.

Para las mediciones de Fluorescencia Inducida por láser de muestras de bebidas alcohólicas seleccionadas, se utiliza un láser de nitrógeno con longitud de onda de
20 325 a 345 nm y potencia de salida de 5 - 15 mW, como fuente de excitación. La fluorescencia emitida por la región irradiada es colectada por medio de al menos una fibra óptica bifurcada con un diámetro del núcleo de 200 a 400 μm , la cual se acopla al láser y al menos a un espectrofotómetro portátil, con un arreglo de diodos CCD con 2048 elementos. La apertura de entrada de la fibra es colocada a un ángulo de

entre 10 y 50 grados, y dispuesta a una distancia de entre 0.5 y 1.5 cm de la superficie de una celda de cuarzo conteniendo muestras de bebidas alcohólicas o de una botella que contiene la bebida.



Como otro objeto primordial de la invención se proporciona un método de fluorescencia inducida por láser para la detección de bebidas alcohólicas adulteradas y sin adulterar. La ejecución de este método se hace posible mediante el sistema provisto de acuerdo con la invención, e incluye las fases y pasos siguientes:

Fase I. Determinación de la contribución espectral de cada compuesto fenólico al espectro característico de cada tipo de bebida:

- 10 a) preparar soluciones modelo de compuestos fenólicos que incluyen: 5-hidroximetil furfural, furfural, 5-metil furfural, ácido gálico, ácido protocatecuico, ácido vainillinico, ácido sirínigico, ácido 3,4-dihidroxibenzoico, ácido ferúlico, ácido cafeico, p-hidroxibenzaldehído, vainillina, siringaldehído, coniferaldehído, sinapinaldehído, y escopoletina;
- 15 b) generar una matriz de excitación-emisión de las soluciones modelo preparadas de acuerdo al inciso a), mediante la irradiación de las soluciones en una longitud de onda de entre 325 a 345 nm;
- c) cuantificar simultáneamente las concentraciones de los compuestos fenólicos en las soluciones modelo del inciso a), mediante técnicas de cromatografía de líquidos de alta resolución con detector de diodos (HPLC-DAD);
- 20 d) realizar un ajuste de los valores de fluorescencia por métodos de optimización no lineales y funciones gaussianas para reproducir el espectro de fluorescencia;

e) correlacionar los valores obtenidos de la matriz de excitación/emisión del inciso b) con los valores obtenidos de las soluciones estándares con las técnicas de HPLC- DAD del inciso c);

f) determinar la presencia y cantidad de los compuestos fenólicos del inciso a) en bebidas alcohólicas destiladas y no destiladas incluyendo: bebidas añejas, reposadas, jóvenes; y

g) realizar la suma espectral de los estándares individuales para generar el espectro de fluorescencia correspondiente a un tipo de bebida;

Fase II. Obtención del espectro de fluorescencia de una bebida objetivo:

a) generar energía de fluorescencia desde la bebida objetivo en el medio de entrada (2) por su irradiación con la energía de excitación provista por una fibra óptica (4) conectada a una fuente de energía de excitación (3);

b) detectar la energía de fluorescencia de la muestra mediante un detector de intensidad de fluorescencia (5) conectado a un medio de conducción de la irradiación (4);

c) analizar y procesar los datos de fluorescencia obtenidos mediante un procesador (6) adaptado al detector de intensidad de fluorescencia (5);

d) realizar un ajuste de los valores del inciso c) por métodos de optimización no lineales y funciones gaussianas para reproducir el espectro de fluorescencia; y

e) comparar el espectro de la muestra objetivo con el espectro reconstruido de la Fase I, correspondiente a una bebida no adulterada.

Se utilizan soluciones modelo, preparadas con estándares comerciales de compuestos fenólicos. Las concentraciones de estas soluciones estándar se obtienen de muestras de tequila cuantificadas por cromatografía de líquidos de alta

resolución (HPLC) equipado con arreglo de diodos estándar, se excitan con el mismo láser utilizado para encontrar la matriz excitación-emisión característica de cada tipo de tequila.



En una modalidad preferida del método de la invención, la detección y análisis de las bebidas se llevará a cabo sobre bebidas alcohólicas maduradas en barrica. Siendo que, en este caso previo a la ejecución de la Fase II, se lleva a cabo un paso previo de:

- i. identificar la matriz de excitación-emisión de mayor respuesta en bebidas auténticas maduradas en barrica.

En otra modalidad preferida del método de la invención, la detección y análisis de las bebidas se llevará a cabo sobre bebidas alcohólicas embotelladas, estando las botellas completamente cerradas. Para la realización de la Fase II de esta modalidad del método, se llevan a cabo los pasos adicionales de:

- i. obtener los espectros de diferentes botellas vacías;
- ii. obtener los espectros de las bebidas alcohólicas auténticas en botellas sin abrir;
- iii. Determinar la diferencia correspondiente a los espectros de las botellas vacías y los espectros de las botellas sin abrir, y multiplicar la diferencia obtenida por un factor de ajuste.

El registro de los espectros de fluorescencia y el procesamiento de datos, son conducidos en tiempo real en un procesador, por ejemplo en una computadora personal, y son analizados mediante un software en el que se incluyen algoritmos para optimizaciones no lineales y métodos de ajuste de curvas con funciones gaussianas.

Otros detalles característicos de la invención, que se refieren al sistema y método para identificar bebidas alcohólicas adulteradas y no adulteradas por medio de fluorescencia inducida por láser, se ilustran mediante los ejemplos no limitativos que se describen a continuación.



5

EJEMPLOS

Origen de las muestras

Se obtuvieron bebidas, directamente de las tres compañías productoras de tequila más importantes del estado de Jalisco, bebidas alcohólicas añejadas en barricas, clasificadas por 100 % agave y mixto (51 % al menos de agave) y por tiempo de añejamiento (blanco, reposado y añejo), así como de distribuidores formales de estas. También se obtuvieron otras bebidas alcohólicas (whiskies, brandis y rones).

EJEMPLO 1: FLUORESCENCIA INDUCIDA POR LÁSER DE TEQUILAS

Dependiendo del tipo de tequila, los espectros de emisión de añejos y reposados cuando se comparan con los blancos difieren mayormente en las intensidades de fluorescencia como se observa en la Figura 2. Aquí también se puede observar que hay claras diferencias en los patrones espectrales de tequilas madurados en barricas y tequilas blancos, los primeros están asociados con emisiones múltiples y relativamente fuertes, y los segundos con una emisión ancha y débil.

El análisis de los espectros de emisión total permite inmediatamente la localización de los máximos de emisión e indican la presencia de múltiples fluoróforos y la dependencia de la emisión de tequilas reposados, añejos y blancos. Los espectros de tequilas 100% añejos y reposados tienen un máximo de intensidad de

fluorescencia a 494 nm, mientras que los tequilas mixtos ~~reposados~~ lo tienen a 496 nm.



Como se muestra en la figura 2, el promedio de ~~tequilas añejos comerciales~~ tienen una mayor intensidad de fluorescencia cuando se comparan con los tequilas
5 reposados y blancos.

Al comparar entre sí los espectros LIF de tres marcas diferentes de tequila añejo (Figura 3), se puede observar que los espectros de fluorescencia tienen una forma similar entre ellos e intensidades de 3578 u.a. para la muestra 1A100, 2600 u.a. para 2A100 y 2906 u.a. para 3A100, mostrando todos un máximo de fluorescencia a
10 494 nm. La diferencia de estas intensidades puede ser debido a los diferentes procesos de elaboración y tiempo de añejamiento de cada marca comercial. La muestra con mayor intensidad de fluorescencia era de un color más oscuro que las otras dos muestras, por lo que se puede inferir que estuvo un mayor tiempo de añejamiento que las otras dos ya que la intensidad de color aumenta conforme
15 transcurre tiempo de añejamiento en barricas.

EJEMPLO 2.- ESPECTROS DE FLUORESCENCIA DE MUESTRAS COMERCIALES DE TEQUILAS REPOSADOS 100% (R100) Y MIXTOS (RM)

En la figura 4 se muestran los espectros de fluorescencia de muestras comerciales
20 de tequilas reposados 100% (R100) y Mixtos (RM). Aquí se puede observar que la intensidad y la forma de los espectros de fluorescencia para tequilas reposados 100% y mixtos es muy variable. Este fenómeno puede deberse a que el tiempo de almacenamiento en barricas de roble puede variar de una marca a otra. Otro factor que podría influir en este fenómeno es el estado de la barrica, es decir, el número de

veces que ésta se haya usado con anterioridad antes de almacenar una nueva muestra de tequila.



En esta misma figura 4 se puede observar la intensidad de fluorescencia de la muestra 2R100 de tequila 100% reposado (2758 u.a) es similar a las intensidades de las muestras 2A100 (2600 u.a) y 3A100 (2906 u.a) de tequila 100% añejo.

EJEMPLO 3.- ESPECTROS DE FLUORESCENCIA DE MUESTRAS COMERCIALES DE TEQUILAS BLANCOS 100% (B100) Y MIXTOS (BM)

En la figura 5 se muestran los resultados de la comparación de los espectros de fluorescencia que tienen las diferentes muestras comerciales de tequilas blancos 100% (B100) y mixtos (BM). En esta figura se puede observar que con excepción de una muestra de tequila blanco 100%, los espectros de fluorescencia de las otras muestras tienen una intensidad de fluorescencia casi nula. La muestra de tequila blanco 100% que presentó mayor intensidad de fluorescencia fue donada por una empresa tequilera, la cual para esta marca en especial, la almacena por un periodo de tiempo de hasta 1 semana en barricas de roble blanco y antes de envasarla la filtra. De aquí que en esta muestra aunque el color sea claro y transparente, se presente una mayor intensidad de fluorescencia comparada con las otras muestras comerciales de tequilas blancos.

20

EJEMPLO 4.- ESPECTROS DE FLUORESCENCIA DE DIFERENTES BEBIDAS ALCOHÓLICAS.

En base al conocimiento de la forma espectral de los diferentes tipos de tequila, se obtuvieron y compararon espectros de fluorescencia de diferentes bebidas



alcohólicas y de un tequila blanco 100% adicionado con extracto de roble y caramelo para simular un tequila reposado. El espectro del tequila blanco con extracto de roble muestra un ancho de banda mayor a las otras bebidas, diferente pendiente entre 360 y 430 nm, y dos máximos, uno a 449 y otro a 496 nm, el espectro del mezcal muestra máximos a 448 y 500 nm. Analizando la forma, los máximos de intensidad de fluorescencia y los anchos de banda de los espectros, claramente se distinguen entre sí estas bebidas (Figura 6).

EJEMPLO 5.- ESPECTROS DE FLUORESCENCIA DE TEQUILA BLANCO ADULTERADO

La figura 7 muestra los espectros de tequila blanco adulterado con refresco de cola para simular tequila 100% reposado, de tequila 100% reposado y de refresco de cola. En esta figura se ve claramente la diferencia entre un tequila original y un adulterado, así como la contribución del refresco de cola a este espectro, ya que el refresco contiene compuestos fluorescentes.

EJEMPLO 6.- ESPECTROS DE FLUORESCENCIA DE TEQUILA AÑEJO ADULTERADO

La figura 8 muestra los espectros de fluorescencia de tequila 100% añejo y tequila añejo adulterado con alcohol de caña, mostrando claramente las diferencias espectrales entre ellos, siendo la más notable, la disminución de la intensidad de fluorescencia debida al efecto del alcohol, ya que este no emite fluorescencia pero influye como un factor de amortiguamiento (quenching) de la fluorescencia.

EJEMPLO 7.- FLUORESCENCIA INDUCIDA POR LASER DE A TRAVES DE BOTELLAS DE TEQUILA.



Las mediciones de fluorescencia anteriores, se realizaron dentro de una celda de cuarzo, para evitar señales de ruido, ya que el cuarzo no muestra fluorescencia a esta longitud de onda (337 nm), a diferencia del vidrio que si contiene compuestos fluorescentes. En la figura 9 se muestran los espectros de fluorescencia de tequila a través de la botella sin abrir, y los espectros del vidrio de dichas botellas. Como era de esperarse la emisión de fluorescencia fue menor, ya que parte de la energía del haz láser primeramente es absorbida por el vidrio y por lo tanto la cantidad de energía que incide sobre la muestra de tequila es menor que la que incide sobre las muestras que se midieron en celdas de cuarzo.

Al realizar la sustracción del espectro de fluorescencia del vidrio al espectro del tequila obtenido a través de la botella, y multiplicar el espectro resultante por un factor de ajuste determinado en función del fabricante de la botella, se obtuvo un espectro muy similar al espectro obtenido midiendo la misma muestra de tequila a través de una celda de cuarzo, como se muestra en la figura 10.

EJEMPLO 8: Fluorescencia Inducida por láser de otras bebidas alcohólicas

Al comparar entre sí los espectros LIF de tres marcas diferentes de whisky (Figura 11), se puede observar que los espectros de fluorescencia tienen una forma similar entre ellos e intensidades de 2199 u.a. a 498 nm para la muestra W1, 1835 u.a. a 498 nm para W2, 1669 u.a. a 502 nm para W3 y 1889 u.a. a 499 nm para W3. La diferencia de estas intensidades como en el tequila, puede ser debido a los



diferentes procesos de elaboración y tiempo de añejamiento de cada marca comercial.

Los espectros de emisión de whisky, cuando se comparan con tequila añejo y reposado difieren principalmente de la longitud de onda de los máximos de fluorescencia y en las intensidades como se observa en la Figura 12.

En base a los resultados mostrados, este método se propone como una alternativa a las técnicas analíticas tradicionales para detectar algunos tipos de adulteraciones en cierto grupo de bebidas alcohólicas aún sin abrir la botella (en este caso bebidas alcohólicas maduradas en barricas), organismos como el Consejo Regulador del Tequila (CRT), PROFECO y la Secretaría de Hacienda (Aduanas) contarán con una herramienta no destructiva y en tiempo real para la detección de algunos tipos de adulteraciones de bebidas alcohólicas. Además, con esta técnica no destructiva las industrias tequileras tendrán las siguientes ventajas:

- Control de calidad en tiempo real.
- Reducción de los costos analíticos y tiempo.

REIVINDICACIONES



1. Un sistema de fluorescencia inducida por láser para la ~~detección de~~ bebidas
alcohólicas adulteradas y no adulteradas ~~caracterizado porque comprende:~~ (1)
un soporte para colocar un medio de entrada (2) de las bebidas alcohólicas a
5 analizar; un láser como fuente de energía de excitación (3) que emite en una
longitud de onda de 325 a 345 nm a través de un medio de conducción de la
irradiación (4) que consiste en fibra óptica bifurcada; un detector de la intensidad
de fluorescencia (5) conectado al medio de conducción de la irradiación (4) y,
acoplado además a un procesador (6) para el análisis y procesamiento de los
10 datos de fluorescencia para la generación de los espectros de fluorescencia de
las diferentes bebidas alcohólicas.
2. El sistema de fluorescencia inducida por láser para la detección de bebidas
alcohólicas de acuerdo a la reivindicación 1, caracterizado porque el detector de
la intensidad de fluorescencia (5) es un espectrofotómetro portátil, con un arreglo
15 de diodos CCD con 2048 elementos.
3. El sistema de fluorescencia inducida por láser para la detección de bebidas
alcohólicas de acuerdo a la reivindicación 1, caracterizado porque el medio de
entrada (2) es una celda de cuarzo.
4. El sistema de fluorescencia inducida por láser para la detección de bebidas
20 alcohólicas de acuerdo a la reivindicación 1, caracterizado porque el medio de
entrada (2) es una botella cerrada que contiene la bebida.
5. El sistema de fluorescencia inducida por láser para la detección de bebidas
alcohólicas de acuerdo a la reivindicación 1, caracterizado porque el láser es un
láser de nitrógeno con una potencia de salida de 5 - 15 mW.



6. El sistema de fluorescencia inducida por láser para la detección de bebidas
alcohólicas de acuerdo a la reivindicación 1, caracterizado porque la fibra óptica
bifurcada (4) tiene diámetro del núcleo de 200 a 400 μm .

5 7. El sistema de fluorescencia inducida por láser para la detección de bebidas
alcohólicas de acuerdo a la reivindicación 6, caracterizado porque la fibra óptica
bifurcada (4) está colocada en un ángulo de entre 10 y 50 grados y dispuesta a
una distancia de entre 0.5 y 1.5 cm de la superficie del medio de entrada.

10 8. Un método para la detección de bebidas alcohólicas adulteradas y no
adulteradas mediante un sistema de fluorescencia inducida por láser como el
que se describe en la reivindicación 1, que comprende las fases y pasos
siguientes:

Fase I. Determinar la contribución espectral de cada compuesto fenólico al
espectro característico de cada tipo de bebida mediante los pasos de:

15 a. preparar soluciones modelo de compuestos fenólicos que incluyen: 5-
hidroximetil furfural, furfural, 5-metil furfural, ácido gálico, ácido
protocatecuico, ácido vainillinico, ácido siríngico, ácido 3,4-
dihidroxibenzoico, ácido ferúlico, ácido cafeico, p-hidroxibenzaldehído,
vainillina, siringaldehído, coniferaldehído, sinapinaldehído, y escopoletina;

20 b. generar una matriz de excitación-emisión de las soluciones modelo
preparadas de acuerdo al inciso a), mediante la irradiación de las
soluciones con un láser como fuente de energía de excitación (3), que
emite en una longitud de onda de entre 325 a 345 nm;

25 c. cuantificar simultáneamente las concentraciones de los compuestos
fenólicos en las soluciones modelo del inciso a), mediante técnicas de
cromatografía de líquidos de alta resolución con detector de diodos (HPLC-



DAD);

- d. realizar un ajuste de los valores de fluorescencia por métodos de optimización no lineales y funciones gaussianas para reproducir el espectro de fluorescencia;
- 5 e. correlacionar los valores obtenidos de la matriz de excitación-emisión del inciso b) con los valores de concentración de compuestos fenólicos obtenidos mediante las técnicas de HPLC- DAD del inciso c) para las soluciones modelo;
- f. determinar la presencia y cantidad de los compuestos fenólicos del inciso
- 10 a) en bebidas alcohólicas destiladas y no destiladas incluyendo: bebidas añejas, reposadas, jóvenes; y
- g. realizar la suma espectral de los compuestos fenólicos determinados en el inciso f) para generar el espectro de fluorescencia correspondiente a un tipo de bebida no adulterada;
- 15 Fase II. Obtener el espectro de fluorescencia de una bebida objetivo mediante los pasos de:
- a) generar energía de fluorescencia desde la bebida objetivo en el medio de entrada (2) por su irradiación con la energía de excitación provista por una fibra óptica (4) conectada a un láser como fuente de energía de excitación
- 20 (3) que emite en una longitud de onda de entre 325 a 345 nm;
- b) detectar la energía de fluorescencia de la muestra mediante un detector de intensidad de fluorescencia (5) conectado a un medio de conducción de la irradiación (4);
- c) analizar y procesar los datos de fluorescencia obtenidos mediante un
- 25 procesador (6) adaptado al detector de intensidad de fluorescencia (5);



- d) realizar un ajuste de los valores del inciso c) por métodos de optimización no lineales y funciones gaussianas para reproducir el espectro de fluorescencia; y
- e) comparar el espectro de la muestra objetivo con el espectro reconstruido de la Fase I, correspondiente a una bebida no adulterada.
9. El método de acuerdo a la reivindicación 8, caracterizado porque el láser es un láser de nitrógeno con una potencia de salida de 5 – 15 mW.
10. El método de acuerdo a alguna de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la bebida objetivo de la Fase II es una bebida alcohólica madurada en barrica.
11. El método de acuerdo a la reivindicación 10, caracterizado porque para la realización de la Fase II se lleva a cabo un paso previo de:
- f) identificar la matriz de excitación-emisión de mayor respuesta en bebidas auténticas maduradas en barrica.
12. El método de acuerdo a alguna de las reivindicaciones 8 y 9, caracterizado porque la bebida objetivo de la Fase II es una bebida alcohólica contenida dentro de una botella cerrada.
13. El método de acuerdo a la reivindicación 12, caracterizado porque para la realización de la Fase II se llevan a cabo los pasos adicionales de:
- g) obtener los espectros de diferentes botellas vacías;
- h) obtener los espectros de las bebidas alcohólicas auténticas en botellas sin abrir;
- i) determinar la diferencia correspondiente a los espectros de las botellas vacías y los espectros de las botellas sin abrir, y multiplicar la diferencia obtenida por un factor de ajuste.

RESUMEN



La presente invención tiene como finalidad proporcionar un sistema y un método que permita llevar a cabo una vigilancia de manera efectiva sobre la autenticidad y calidad de las bebidas alcohólicas; se hace uso de técnicas analíticas basadas en la emisión de fluorescencia inducida para la caracterización de las materias primas utilizadas para la elaboración de estas bebidas, así como del producto final. El sistema y el método de la invención hacen posible la realización del análisis de las bebidas alcohólicas aún sin abrir la botella por lo que se cuenta así con una poderosa herramienta no destructiva y en tiempo real para verificar la autenticidad de las bebidas alcohólicas destiladas y no destiladas, así como detectar cuando dichas bebidas alcohólicas destiladas y no destiladas están adulteradas.

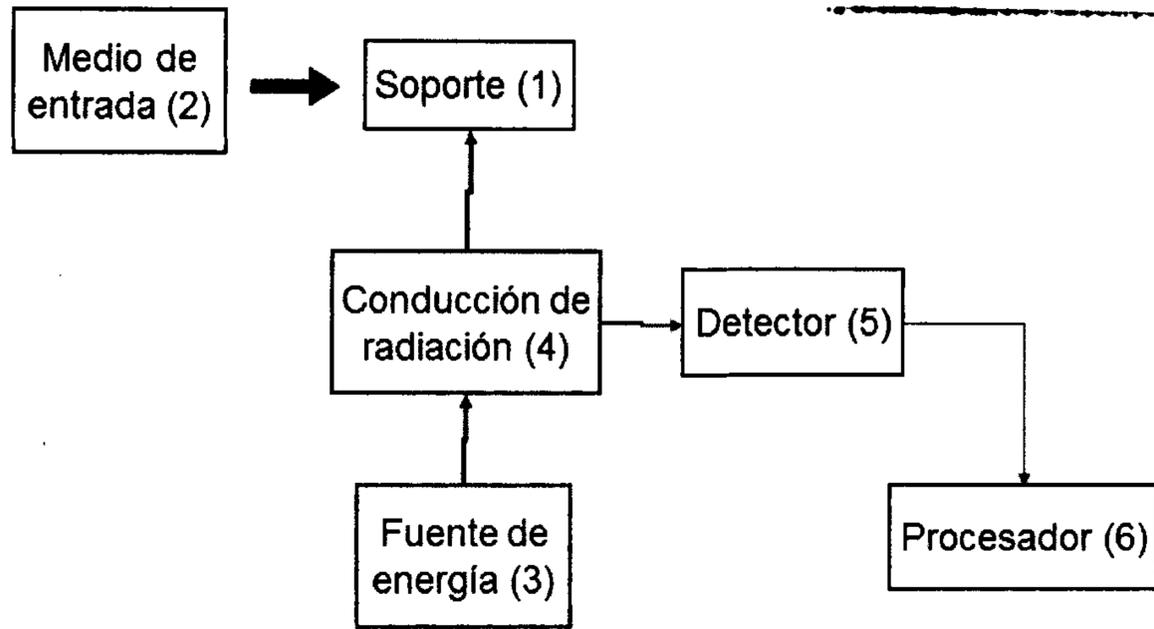


FIGURA 1

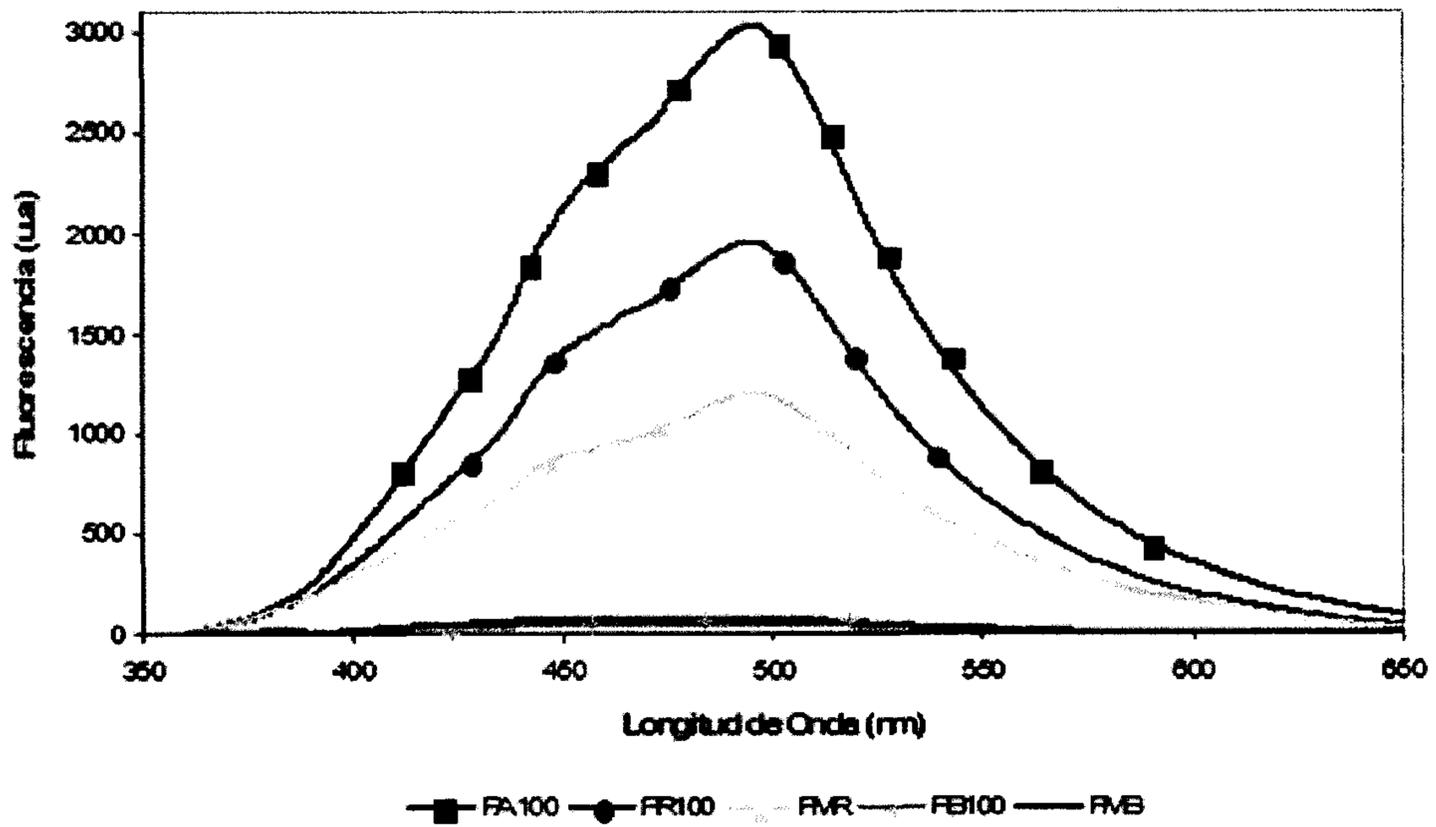


FIGURA 2

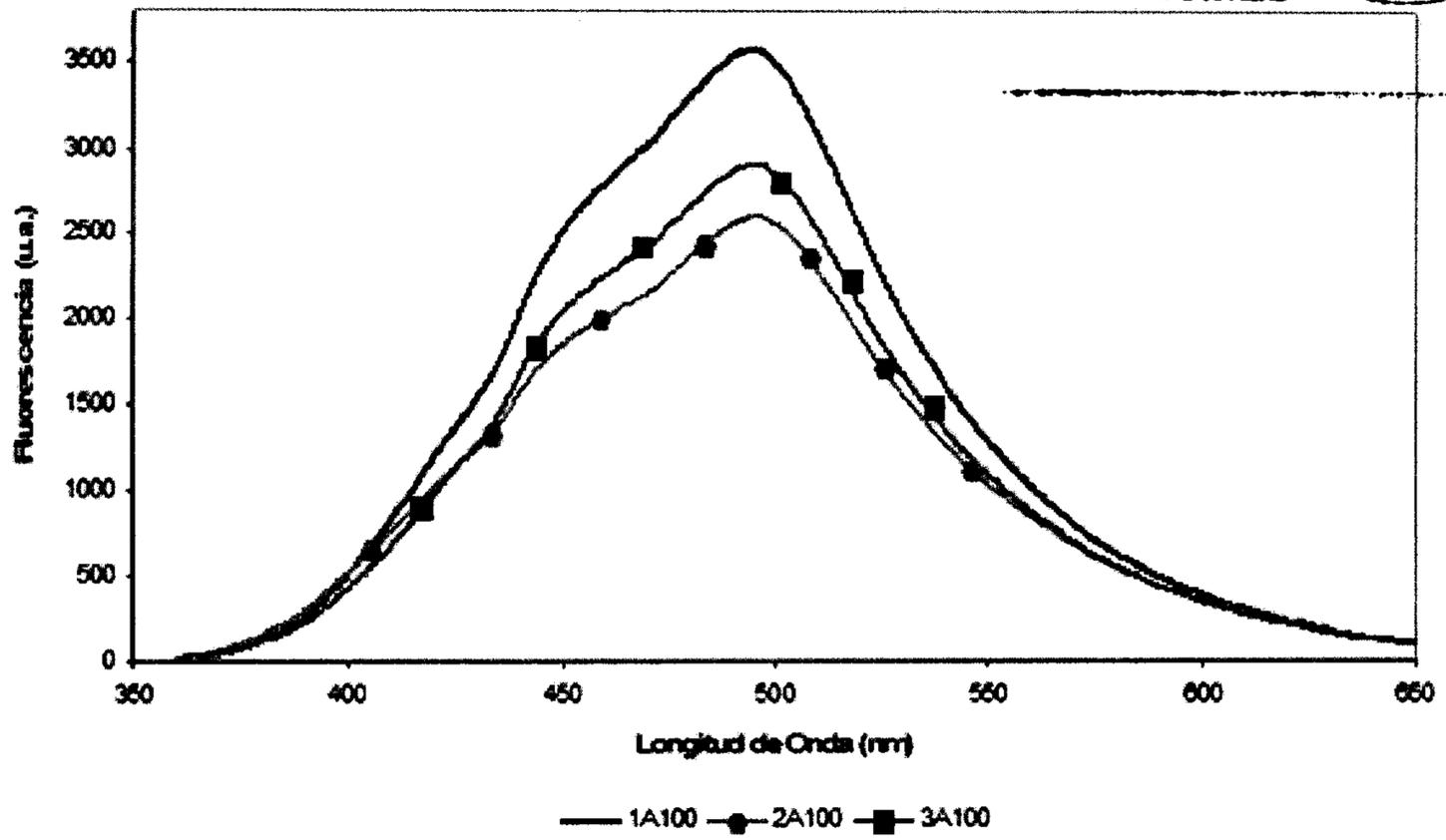


FIGURA 3

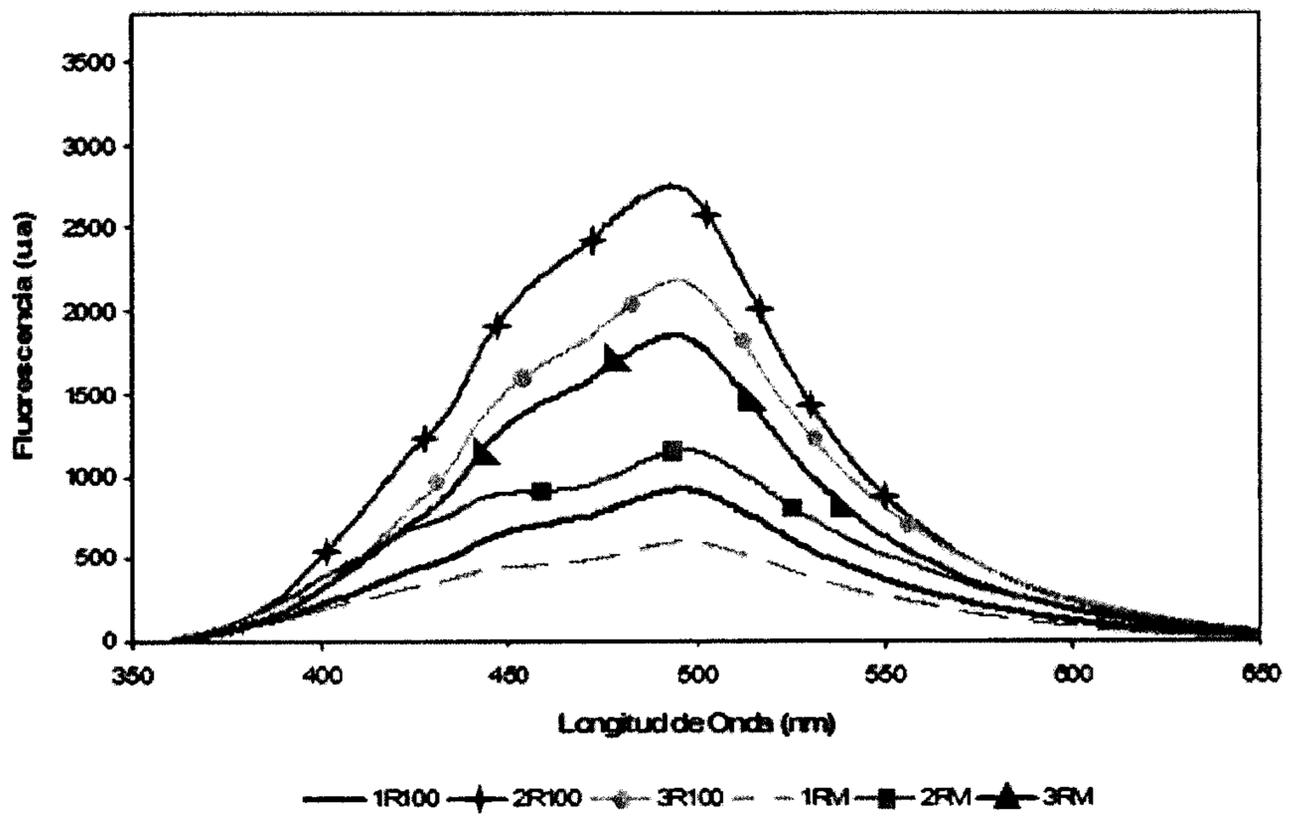


FIGURA 4

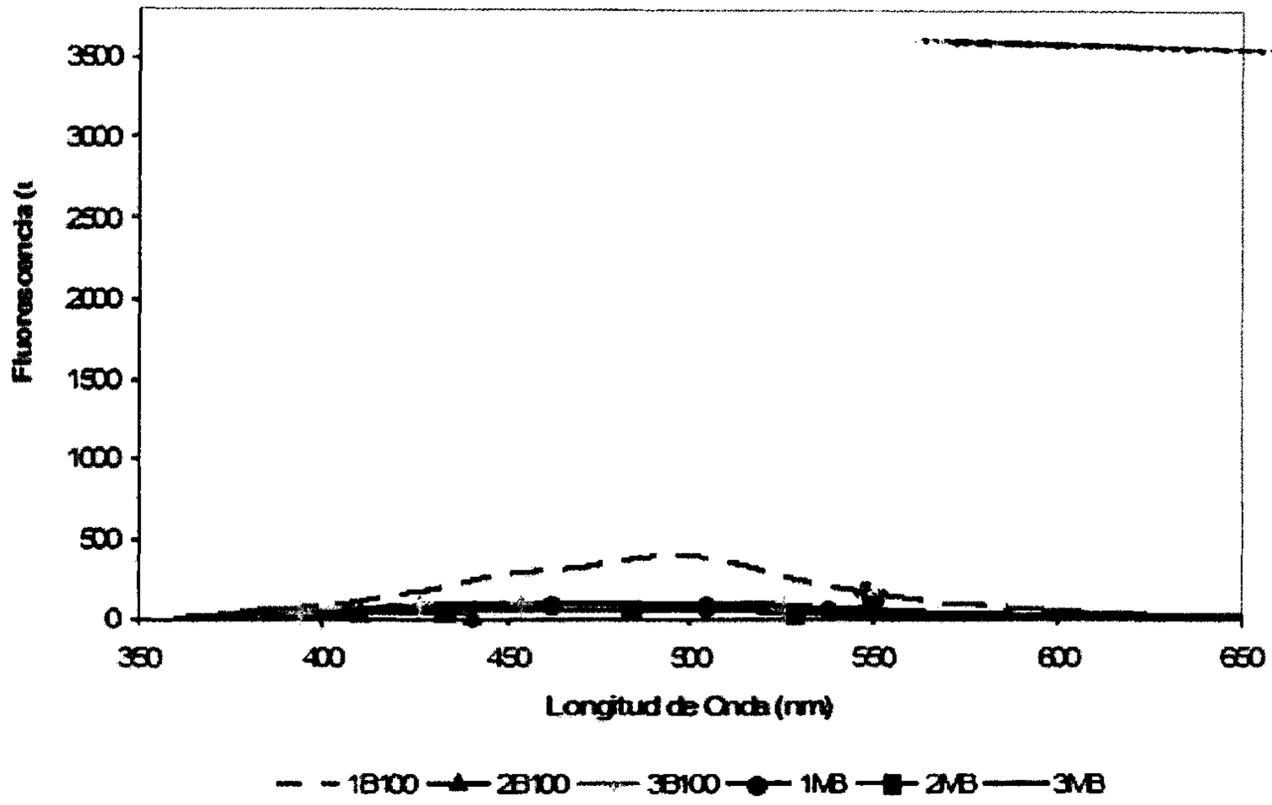


FIGURA 5

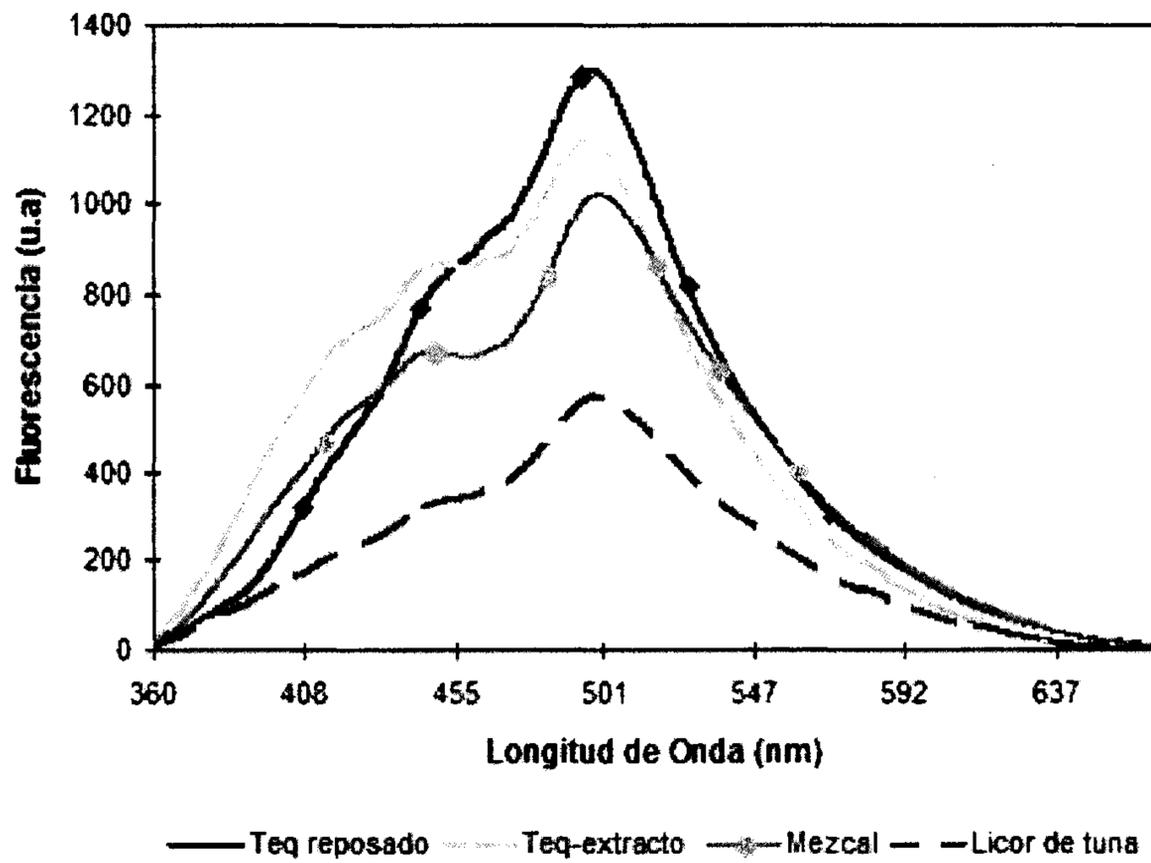
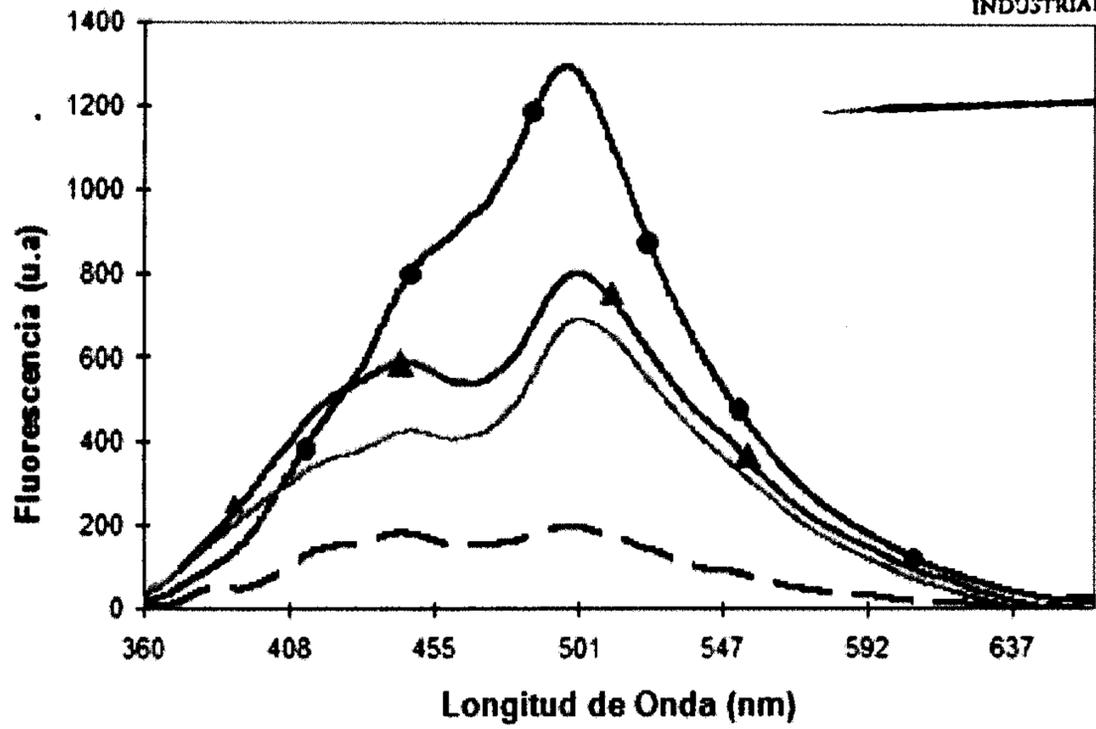


FIGURA 6

Adulteración de Tequila

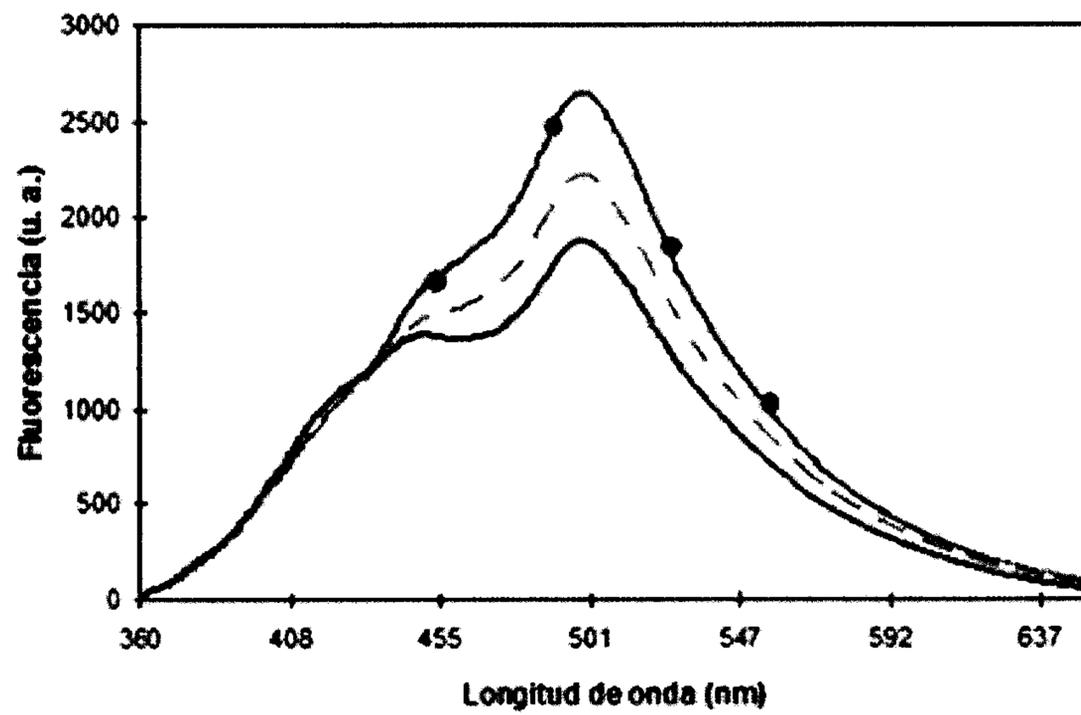
IMPI
INSTITUTO MEXICANO
DE LA PROPIEDAD
INDUSTRIAL



— Teq Reposado — Teq Blanco — Teq Blanco+Ref cola — Ref Cola

FIGURA 7

Adulteración de tequila



● Teq. Añejo 100% — Alcohol caña 30%-Añejo 70% — Alcohol caña 60%-Añejo 40%

FIGURA 8

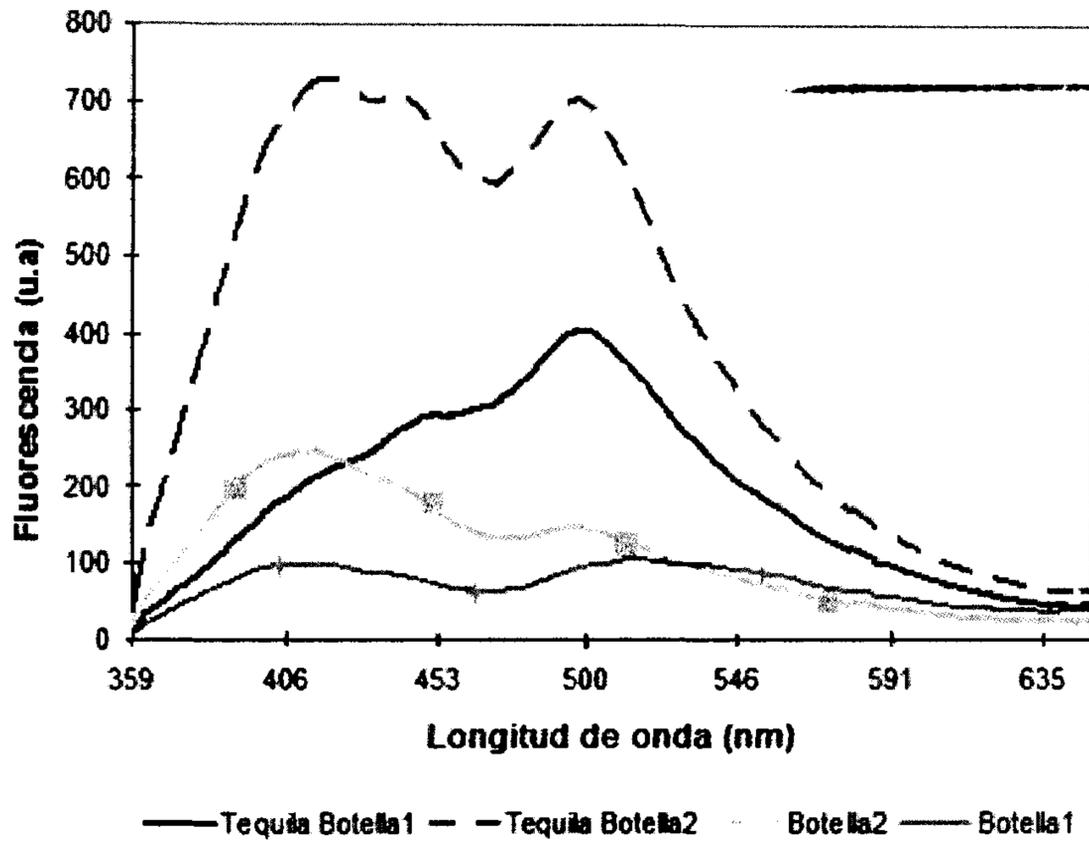


FIGURA 9

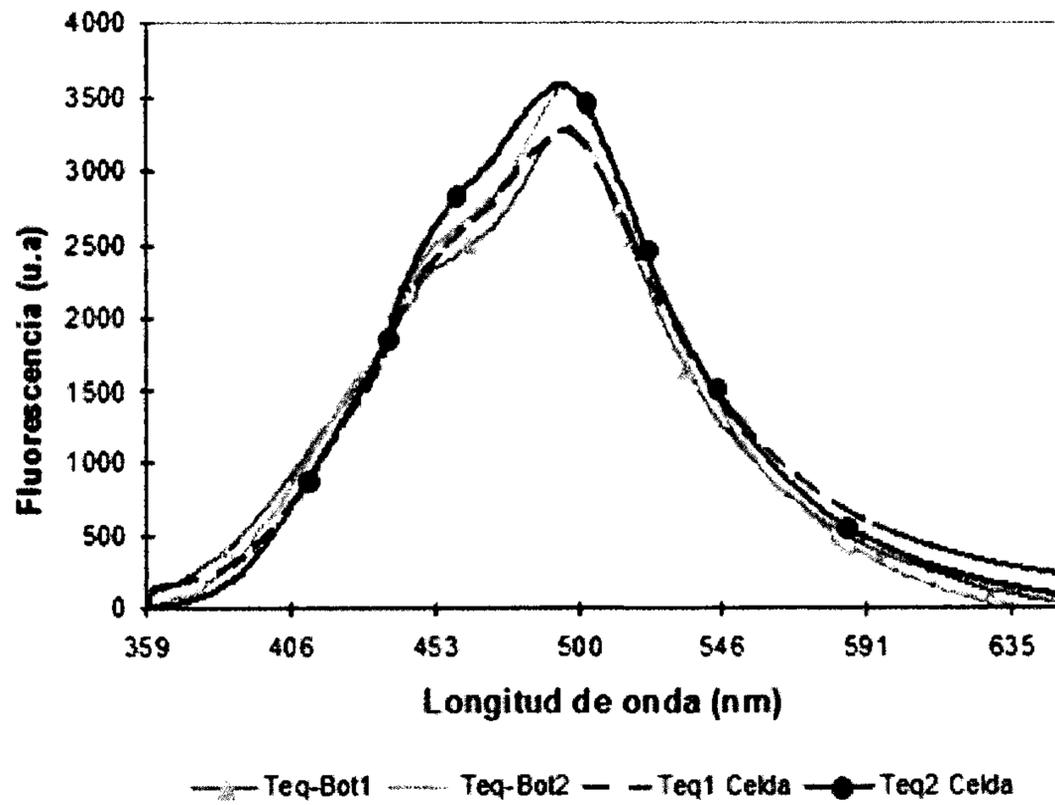


FIGURA 10

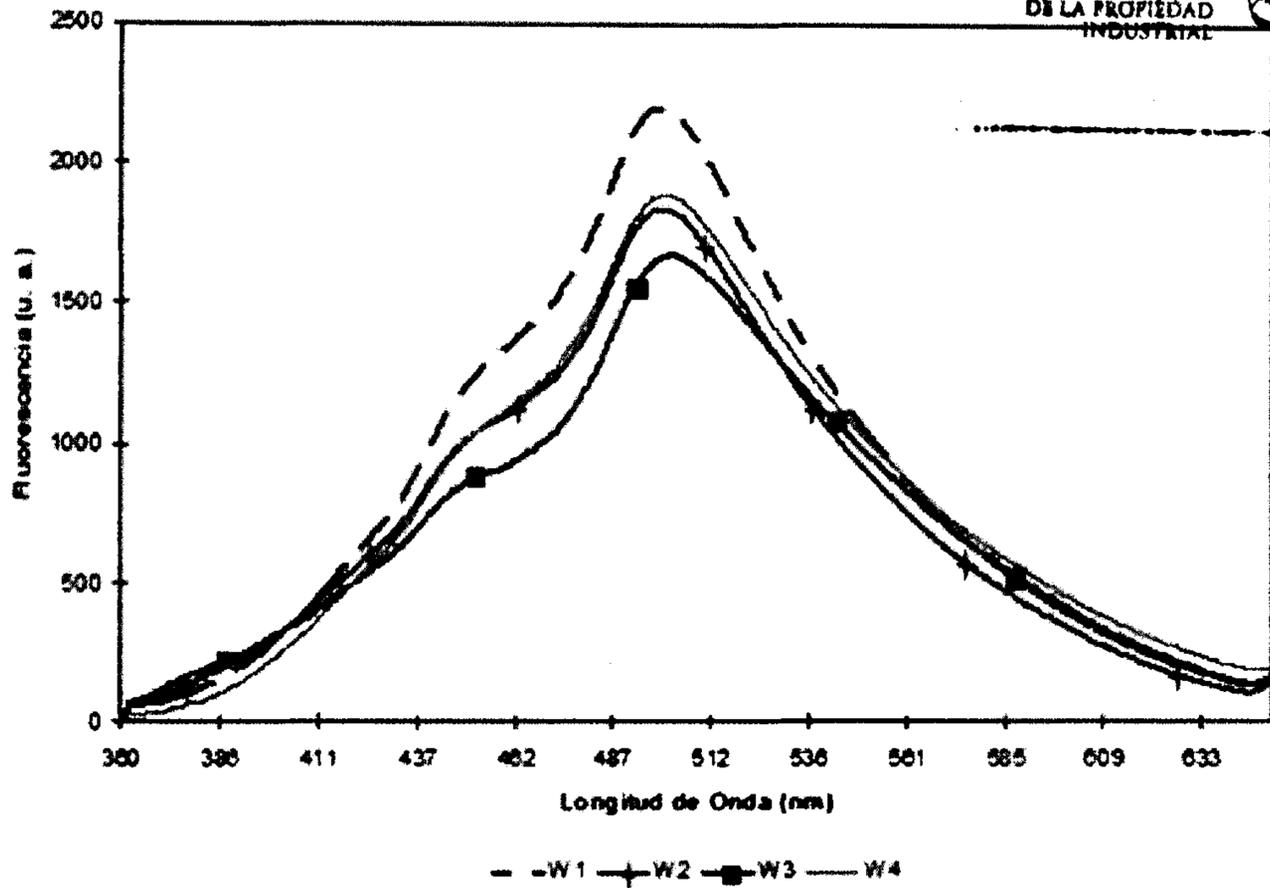


FIGURA 11

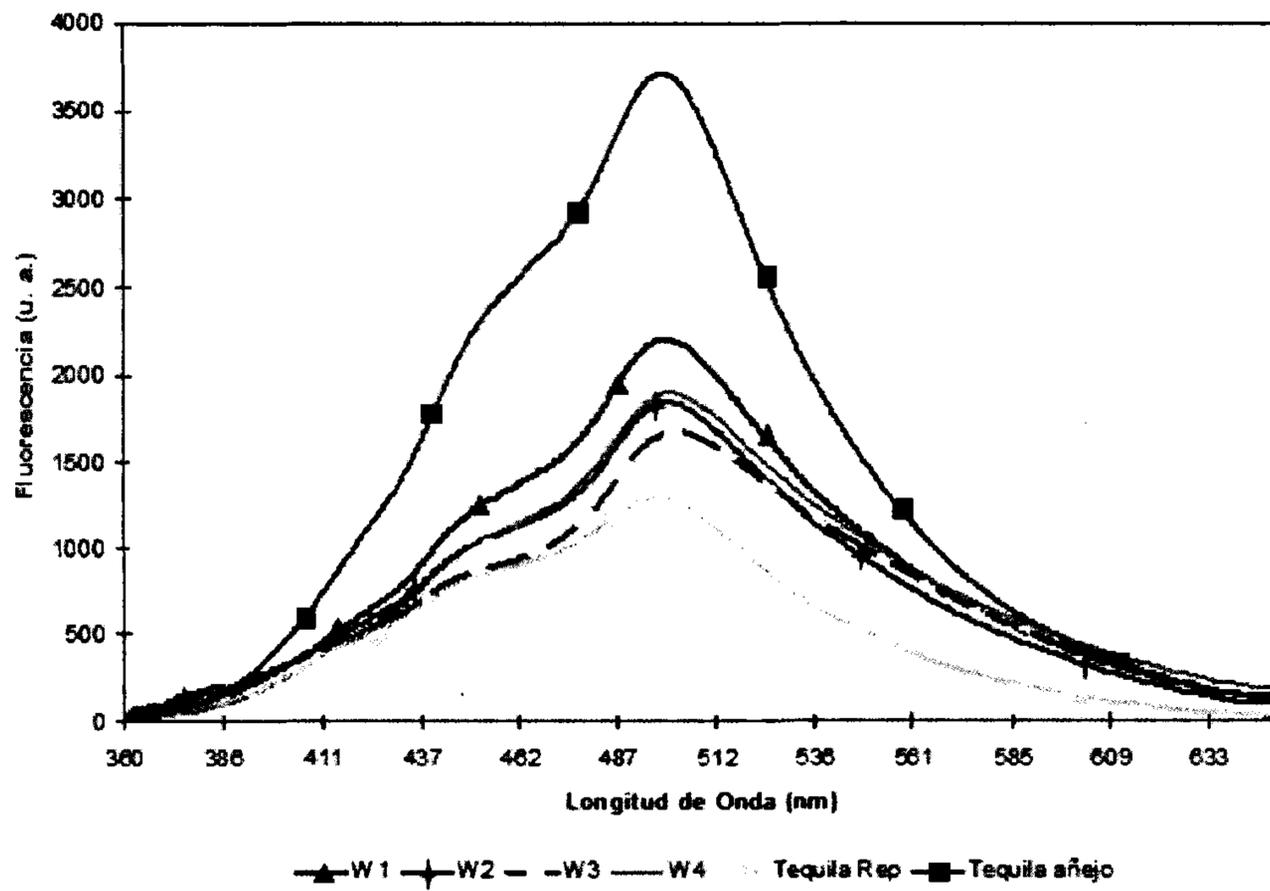


FIGURA 12