

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 393 313**

51 Int. Cl.:

B01D 59/44 (2006.01)

C07C 51/16 (2006.01)

C07C 51/41 (2006.01)

C12P 7/06 (2006.01)

G01N 33/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **09760028 .2**

96 Fecha de presentación: **05.10.2009**

97 Número de publicación de la solicitud: **2334409**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.06.2011**

54 Título: **Método para la determinación de los valores delta-d de los isótopos estables de hidrógeno no intercambiables en el grupo metilo del etanol por medio de la técnica instrumental IRMS**

30 Prioridad:

06.10.2008 RS 8046208

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

20.12.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

20.12.2012

73 Titular/es:

IVAN SMAJLOVIC (100.0%)

Samu Mihalja 30

21220 Becej, RS

72 Inventor/es:

GLAVANOVIC, MILANKA y

SMAJLOVIC, IVAN

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 393 313 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para la determinación de los valores delta-d de los isótopos estables de hidrógeno no intercambiables en el grupo metilo del etanol por medio de la técnica instrumental IRMS.

5

Campo de la técnica

La presente invención se relaciona con el análisis químico instrumental, es decir con el campo del análisis de isótopos estables en los productos alimenticios, y se relaciona con el método para la preparación de muestras de etanol y el modo para la determinación de la relación isotópica de isótopos estables de hidrógeno no intercambiables localizados en el sitio metilo del etanol por medio de la técnica instrumental CF - TC/EA - IRMS (Conversión Térmica/Analizador Elemental - Espectrometría de Masa de Relación Isotópica en Flujo Continuo), y con el propósito de establecer la autenticidad y el origen geográfico de vinos y mosto de uva, cerveza, bebidas alcohólicas, jugos de fruta, miel, vinagres y otros productos alimenticios que contienen alcohol y/o azúcares fermentables.

10

15

Antecedentes

Los métodos isotópicos han mostrado que pueden ser una herramienta analítica muy poderosa para la determinación de la autenticidad y origen geográfico de vinos y espíritus fuertes. Midiendo el contenido de isótopos estables en estos productos se puede proporcionar una información útil para la detección de muchos fraudes en la producción de vino y de espíritus fuertes. Las técnicas instrumentales que se usan para las determinaciones isotópicas se basan en la determinación de las proporciones relativas de isótopos estables por medio de la Espectrometría de Masa de Relación Isotópica.

20

25

Los sistemas que comprenden una cámara de pirólisis y un espectrómetro isotópico de flujo continuo CF- TC/EA - IRMS (Conversión Térmica /Analizador Elemental-Espectrometría de Masa de Relación Isotópica en Flujo Continuo Flash HT) están comercialmente disponibles para el análisis de hidrógeno estable en muestras líquidas y sólidas.

30

Cuando se analizan las muestras de etanol, por medio de CF-TC/EA-IRMS (Conversión Térmica /Analizador Elemental-Espectrometría de Masa de Relación Isotópica en Flujo Continuo), debido al grupo hidroxilo del etanol el cual contiene hidrógeno fácilmente intercambiable, los valores dados de δD para el etanol de un mismo origen botánico y geográfico pueden variar, y por esa razón es imposible realizar la identificación cualitativa y cuantitativa del origen de la muestra de etanol.

35

Uno de los problemas que puede ocurrir, por ejemplo, en la producción de un espíritu fuerte, está en las etapas de finalización de la producción. El destilado se diluye con agua para determinar el grado de alcohol necesario para que la bebida alcohólica se pueda consumir. Al adicionar agua con un contenido isotópico diferente, se perturba el equilibrio dinámico isotópico y el hidrógeno o el deuterio que esta enlazado al átomo de oxígeno del grupo hidroxilo se intercambia. Esta es una de las razones para obtener valores erróneos de δD e información errónea sobre el origen del etanol.

40

Debido a los problemas declarados anteriormente, la técnica instrumental CF-TC/EA-IRMS no puede ser muy útil en la detección de fraudes en la producción de vinos y de bebidas alcohólicas y además para la detección de etanol que se origina de remolacha azucarera, cebada, trigo, etc. en el vino y las bebidas alcohólicas.

45

De acuerdo al primer aspecto de esta invención, el método para la preparación de muestras de etanol y el modo para la determinación de la relación isotópica de los isótopos estables de hidrógeno no intercambiable localizados en el sitio metilo del etanol por medio de la técnica instrumental CF-TC/EA- IRMS (Conversión Térmica /Analizador Elemental-Espectrometría de Masa de Relación Isotópica en Flujo Continuo) se basa en la transformación enzimática (u orgánica) total de las muestras de etanol para obtener ácido etanoico (ácido acético), la neutralización controlada del ácido acético y la posterior concentración, purificación de la sal de acetato preparada y su secado hasta la masa constante y la posterior determinación de los valores de δD en las muestras preparadas por medio de CF-TC/EA-IRMS.

50

55

Antecedentes

Las mediciones de la relación relativa de deuterio e hidrógeno para una propuesta de autenticidad y determinación del origen de vinos y bebidas alcohólicas, cerveza, jugos de fruta y miel se realizan actualmente por medio de la metodología de NMR (Fraccionamiento Isotópico Natural local-Resonancia Magnética Nuclear) el cual se basa en un barrido intermolecular de la muestra de etanol medida y la determinación de la composición isotópica de los átomos de deuterio e hidrógeno localizados en el primer y en el segundo átomo de carbono dentro de la molécula de etanol. Los resultados obtenidos por la metodología de NMR dan información sobre la presencia de etanol que se origina de remolacha azucarera u otras plantas industriales, y las cuales pertenecen al grupo de plantas C3.

60

Esta técnica instrumental tiene un uso limitado en la práctica, porque solo se puede usar si la base de datos para las muestras de vino existe previamente y sin una base de datos específica las conclusiones pueden ser muy subjetivas

65

y el análisis cuantitativo difícil. Por esa razón se usa solamente para el vino con un origen geográfico designado para el cual se ha creado previamente una base de datos. Otras limitaciones de esta técnica instrumental son:

- La metodología de NMR es un método que consume mucho tiempo
- Requiere un gran consumo de helio y nitrógeno líquido y también de energía eléctrica,
- Ocupa una gran parte del lugar de trabajo debido a su tamaño y debido al campo magnético muy fuerte que forma (se necesita una zona de seguridad),

Descripción de la invención

10 El objetivo principal de esta invención es superar la barrera y limitaciones de los aparatos y métodos conocidos actualmente para la determinación de la composición isotópica de los átomos de deuterio e hidrógeno no intercambiable en las muestras de etanol.

15 De acuerdo a la invención, el método para la preparación de muestras de etanol y el modo para la determinación de la relación isotópica de los isótopos estables de hidrógeno no intercambiable localizados en el sitio metilo del etanol (grupo-CH₃) se basa en la transformación enzimática total de las muestras de etanol hasta ácido acético (ácido etanoico) en presencia de las enzimas etanol deshidrogenasa y acetaldehído deshidrogenasa y la coenzima NAD⁺, la neutralización controlada del ácido acético obtenido para hacer el acetato, la purificación del acetato preparado y la vaporización hasta masa constante y la determinación posterior de los valores de δD en las muestras preparadas por medio de CF-TC/EA-IRMS.

La conversión de etanol en ácido acético se puede realizar alternativamente por la oxidación orgánica de etanol en presencia de bicromato de sodio (IV). Este aspecto sin embargo no es parte de la invención.

25 La conversión química (opuesta a la enzimática) de etanol a ácido acético con el propósito de medir los valores de δD se describe en los documentos siguientes:

ROSSMANN A y otros: "Assignment of ethanol origin and proof of sugar addition to wine through positional deuterio and carbon-13 isotope ratio measurement", Zeitschrift fuer Lebensmitteluntersuchung und -forschung, vol. 188, núm. 5, 1989, págs. 434-438, ISSN: 0044-3026.

RAUSCHENBACH P y otros: "Comparison of the deuterium and carbon-13 contents of ethanol obtained by fermentation and chemical synthesis", Zeitschrift fuer Naturforschung, vol. 34c, núm. 1-2, 1979, págs. 1-4, ISSN: 0939-5075.

De acuerdo a un aspecto adicional de esta invención, el método para la preparación de muestras de etanol y su conversión en ácido acético se puede realizar alternativamente por recirculación de la muestra de etanol previamente aislada a través de una columna de flujo continuo con una mezcla de dos enzimas inmovilizadas etanol deshidrogenasa y acetaldehído deshidrogenasa y en presencia de la coenzima NAD⁺.

Mejores modos para llevar a cabo la invención.

De acuerdo con la invención, el método para la preparación de las muestras de etanol y el modo para la determinación de la relación isotópica de los isótopos estables de hidrógeno no intercambiable localizados en el sitio metilo del etanol (grupo- CH₃) se basa en la transformación enzimática total de las muestras de etanol a ácido acético (ácido etanoico) en presencia de las enzimas etanol deshidrogenasa y acetaldehído deshidrogenasa y la coenzima NAD⁺, la neutralización controlada del ácido acético obtenido para hacer el acetato, la purificación del acetato preparado y la vaporización hasta masa constante y la determinación posterior de los valores de δD en las muestras preparadas por medio de CF-TC/EA-IRMS.

La primera etapa del proceso se basa en el aislamiento del etanol de las muestras de vino, espíritus fuertes, jugos de fruta fermentados, soluciones de miel fermentadas por destilación. Antes de la destilación se necesita neutralizar todos los ácidos volátiles en la muestra los que pueden pasar al destilado.

La segunda etapa se basa en la transformación enzimática total del etanol previamente aislado para producir el ácido acético sin fraccionamiento isotópico. Esto se hace en presencia de dos enzimas específicas, etanol deshidrogenasa y acetaldehído deshidrogenasa y la coenzima de oxidación-reducción NAD⁺.

La tercera etapa involucra el aislamiento del ácido acético obtenido de la mezcla de reacción sin ninguna pérdida cuantitativa por destilación en presencia de vapores de agua sobrecalentados o por destilación al vacío.

La cuarta etapa involucra la neutralización del ácido acético aislado con hidróxido de sodio o alguna otra base alcalina, carbonato de sodio o similar, en presencia de un pH-metro hasta el valor de pH de 8,1 y en esta manera la preparación de la sal de acetato (preferible el acetato de sodio).

La etapa cinco involucra la concentración de la solución de acetato por medio de la destilación al vacío hasta que la solución adquiere una consistencia de sirope. El destilado se puede desechar.

5 La sexta etapa involucra la purificación del acetato de sodio frío con éter dietílico para eliminar todas las impurezas orgánicas que caen en la matriz. Esto puede ser por el uso de un baño de agua ultrasónico y después eliminar la fase de éter con ayuda de un embudo de separación. Esta etapa se debe repetir tres veces. Después de la purificación se puede realizar la vaporización del acetato de sodio para secar hasta masa constante.

10 Una etapa adicional involucra la determinación de la relación relativa de isótopos estables de hidrógeno en la muestra de acetato de sodio preparada que proviene de un grupo metilo no intercambiado dentro de la sal de acetato.

15 De acuerdo a un aspecto adicional de esta invención, al principio del método, antes de la destilación y aislamiento de etanol de las muestras de vino, espíritus fuertes, jugos de fruta fermentados o soluciones de miel fermentadas, ellas se deben neutralizar para evitar el fraccionamiento isotópico y la pérdida adicional durante la etapa de la destilación por la adición de una solución de hidróxido de sodio (NaOH) hasta que el valor de pH alcance 8,1 a 8,5. De esta manera todos los ácidos orgánicos presentes se neutralizarán y los compuestos carbonílicos presentes - aldehídos y cetonas se degradarán. En esta manera, después de la destilación el destilado obtenido está libre de ácidos y las etapas adicionales del proceso son las mismas que las descritas con anterioridad en el texto.

20 Además, de acuerdo a un aspecto adicional de esta invención, la segunda etapa del método, la cual involucra la conversión del etanol a ácido acético, se puede llevar a cabo por la recirculación del etanol neutralizado aislado previamente de las muestras analizadas, en presencia de NAD^+ a través de una columna con una mezcla de enzimas inmovilizadas de etanol deshidrogenasa y acetaldehído deshidrogenasa con el propósito de una conversión bioquímica más rápida de etanol en ácido acético.

25 De acuerdo con la idea de esta invención, el método para la preparación de las muestras de etanol y el modo para la determinación de la relación isotópica de los isótopos estables de hidrógeno no intercambiable localizados en el sitio metilo del etanol (grupo- CH_3), con el propósito de la determinación de la autenticidad y del origen geográfico de vinos y mostos de uva, cervezas, bebidas alcohólicas, jugos de fruta, miel y todos los otros productos alimenticios que contienen alcohol y/o azúcares fermentables, tiene sus ventajas:

- 35 • En primer lugar, ofrece muy buena precisión y repetitividad de los resultados para los valores de δD de las muestras de etanol analizadas, sin importar si la muestra de etanol se diluyó con agua antes de la destilación, y ofrece una diferencia y dependencia constante observada entre las muestras de etanol con origen botánico de las plantas del grupo C3;
- No hay necesidad de grandes fondos financieros y condiciones especiales para el mantenimiento como es el caso con la técnica instrumental de la metodología de NMR,
- 40 • Brinda la oportunidad de detectar la presencia de etanol que se origina de azúcar de remolacha, trigo, cebada y otras plantas industriales que pertenecen al grupo de plantas C3, en las muestras de etanol que se aíslan de los vinos y bebidas alcohólicas analizados o jugos fermentados y miel fermentada,

45 Por supuesto se apreciará que son posibles modificaciones a las modalidades descritas anteriormente. La presente invención se limita sólo por el alcance de las reivindicaciones anexas.

Aplicabilidad Industrial

50 El método para la preparación de muestras de etanol y el modo para la determinación de la relación isotópica de los isótopos estables de hidrógeno no intercambiables localizados en el sitio metilo del etanol (grupo- CH_3) es aplicable en la química analítica instrumental y se usa para la determinación de la autenticidad y el origen geográfico de vinos y mostos de uva, bebidas alcohólicas, cervezas, jugos de fruta, miel y otros productos alimenticios que contienen etanol y/o azúcares fermentables.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para determinar el origen de un producto alimenticio que contiene alcohol, que comprende:
 - proporcionar una muestra del producto alimenticio que contiene alcohol; neutralizar los ácidos volátiles en la muestra proporcionada;
 - degradar los compuestos carbonílicos: aldehídos y cetonas en la muestra proporcionada; extraer una muestra de etanol de la muestra proporcionada;
 - proporcionar las enzimas etanol deshidrogenasa y acetaldehído deshidrogenasa, y una coenzima de oxidación-reducción NAD^+ para convertir el etanol en la muestra extraída de etanol en ácido acético;
 - extraer el ácido acético, en donde la etapa de extracción del ácido acético incluye al menos uno de los procesos siguientes: destilación en presencia de vapor de agua sobrecalentado, o destilación al vacío;
 - producir una solución de la sal de acetato del ácido acético extraído por neutralización del ácido acético extraído hasta que el valor del pH de la solución alcance 8.1;
 - concentrar la solución de la sal de acetato producida por destilación al vacío hasta que la solución de la sal de acetato alcance una consistencia de sirope, en donde el subproducto destilado se desecha; enfriar la solución concentrada de la sal de acetato;
 - eliminar las impurezas de la solución concentrada y enfriada de la sal de acetato adicionando un solvente orgánico y mezclar la solución en un baño de agua ultrasónico, en donde el solvente orgánico disuelve las impurezas;
 - desechar el solvente orgánico que contiene las impurezas disueltas usando un embudo de separación;
 - obtener la sal de acetato seca hasta masa constante de la solución concentrada purificada de la sal de acetato;
 - medir la composición isotópica, es decir, la relación isotópica relativa de deuterio e hidrógeno de la sal de acetato seca;
 - calcular el valor de δD por la composición isotópica medida; y
 - comparar el valor calculado de δD con valores de δD asociados con un producto alimenticio de origen conocido.
2. El proceso de la reivindicación 1, en donde la etapa de neutralización de los ácidos volátiles incluye la adición de una solución de hidróxido de sodio hasta que el valor del pH de la mezcla alcanza un valor entre 8.1 y 8.5.
3. El proceso de la reivindicación 1, en donde la etapa de producir una solución de la sal de acetato del ácido acético extraído por neutralización del ácido acético extraído hasta que el valor del pH de la solución alcance 8.1, incluye el uso de una base alcalina.
4. El proceso de la reivindicación 3, en donde la base alcalina es hidróxido de sodio.
5. El proceso de la reivindicación 1, en donde la etapa de producir una solución de la sal de acetato del ácido acético extraído por neutralización del ácido acético extraído hasta que el valor del pH de la solución alcance 8.1, incluye el uso de una sal ácida débil.
6. El proceso de la reivindicación 5, en donde la sal ácida débil es carbonato de sodio.
7. El proceso de la reivindicación 1, en donde el solvente orgánico usado en las etapas de eliminación de las impurezas de la solución concentrada y enfriada de la sal de acetato, y desechado del solvente orgánico que contiene las impurezas disueltas, incluye un éter dietílico.
8. El proceso de la reivindicación 1, en donde las etapas de eliminación de las impurezas de la solución concentrada y enfriada de la sal de acetato, y desechado del solvente orgánico que contiene las impurezas disueltas, se repiten tres veces.
9. El proceso de la reivindicación 1, comprende adicionalmente:
 - proporcionar una columna con una mezcla de enzimas inmovilizadas de etanol deshidrogenasa y acetaldehído deshidrogenasa; y
 - recircular la muestra de etanol en presencia de una coenzima de oxidación-reducción NAD^+ a través de la columna proporcionada.