



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO



**FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y
BIOTECNOLOGÍA**

CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA

Tema: Determinación de edulcorantes por espectrofotometría visible en bebidas azucaradas consumidas en la provincia de Tungurahua.

Trabajo de Titulación, Modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención de título de Ingeniero Bioquímico, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Autor: Anthony Daniel Salinas Lara

Tutor: Mg. Lander Vinicio Pérez Aldas

Ambato-Ecuador

Marzo - 2022

APROBACIÓN DEL TUTOR

Mg. Lander Vinicio Pérez Aldas

Certifica:

Que el presenta trabajo de titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Trabajo de Titulación bajo la Modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que responde las normas establecidas en el reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 07 de febrero de 2022

.....

Mg. Lander Vinicio Pérez Aldas

C.I. 1802706596

TUTOR

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Anthony Daniel Salinas Lara, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente trabajo de titulación, modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniero Bioquímico son absolutamente originales, auténticos y personales a excepción de las citas bibliográficas.



.....
Anthony Daniel Salinas Lara

C.I. 1803940830

AUTOR

APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Presidente del Tribunal

Dra. Mirari Yosune Arancibia Soria
C.I.: 1802142461

Dr. Orestes Darío Lopez Hernandez
C.I.: 1754784864

Ambato, 08 de marzo del 2022

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Trabajo de Titulación o parte de él, como documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Trabajo de Titulación, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



.....
Anthony Daniel Salinas Lara

C.I. 1803940830

AUTOR

DEDICATORIA

A mis padres José Salinas y Silvia Lara, en especial a mi mamá por todo el cariño, apoyo y motivación que me ha brindado a lo largo de la carrera cuando pensaba en darme por vencido.

A mi hermana Jessy por su ayuda en situaciones complicadas, por ser mi confidente y mi acompañante en todo momento.

A mis abuelitas Hilda y Herminia por ayudarme a crecer como persona y a luchar por mis sueños, Dios les de muchos años de vida.

A mis primos por regalarme tantos momentos divertidos de igual manera a mis amigos Chris, Bryan, Adry, Nico, Jonathan, Lucho, Aby, Monse, Karen y Paty a quienes conocí durante mi carrera universitaria y con los que compartí muchas experiencias agradables.

A mi novia Judy por ser esa persona que siempre me dio su amor y comprensión, con quien viví momentos inolvidables, por ser mi consejera y ayudarme a ser una mejor persona.

Al laboratorio LACQUANALISIS por abrirme sus puertas, enseñarme tanto y porque gracias a ellos le cogí más interés a mi carrera.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios porque sin él nada de esto hubiera sido posible puesto que me ha dado salud y bendiciones para poder cumplir mi meta.

A la Universidad Técnica de Ambato y a la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología por brindarme tanto conocimiento y por prepararme para la vida profesional.

A LACONAL por permitirme realizar mi parte experimental en su laboratorio, por su ayuda y por una acogida tan amigable desde el principio.

A mi tutor químico Lander Pérez por su gran ayuda, por el tiempo dedicado, por sus consejos y por siempre demostrar interés y preocupación en el desarrollo de este proyecto de titulación.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL TUTOR.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD.....	iii
APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO.....	iv
DERECHOS DE AUTOR	v
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTO	vii
ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS	xi
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	xi
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xii
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
CAPÍTULO I.....	1
1 MARCO TEÓRICO.....	1
1.1 Antecedentes investigativos	1
1.1.1 Sobrepeso y obesidad causadas por bebidas azucaradas.....	1
1.1.2 Edulcorantes en la dieta	1
1.1.2.1 Aspartamo.....	2
1.1.2.2 Acesulfame-K.....	3
1.1.2.3 Sucralosa.....	4
1.1.3 Consumo de bebidas azucaradas.....	5
1.1.4 Método de cuantificación de edulcorantes.....	5
1.1.4.1 Método espectrofotométrico.....	5
1.1.4.2 Método cromatográfico.....	6
1.1.5 Norma regulatoria para el consumo de aditivos alimentarios.....	6

1.2	Objetivos	7
1.2.1	Objetivo general	7
1.2.2	Objetivos específicos	7
1.3	Hipótesis	7
1.3.1	Hipótesis Nula.....	7
1.3.2	Hipótesis alternativa.....	7
CAPÍTULO II		8
2	METODOLOGÍA	8
2.1	Equipos y materiales	8
2.1.1	Materiales de laboratorio.....	8
2.1.2	Equipos.....	8
2.1.3	Reactivos	8
2.2	Muestreo	9
2.3	Toma y recolección de muestras	9
2.4	Método de análisis	10
2.4.1	Determinación de edulcorantes por espectrofotometría.....	10
2.4.1.1	Preparación de las bebidas azucaradas	10
2.4.1.2	Preparación de soluciones.....	10
2.4.1.3	Determinación de aspartamo	10
2.4.1.4	Determinación de acesulfame-K.....	11
2.4.1.5	Determinación de sucralosa	11
2.5	Factores en estudio	12
2.6	Tratamientos	12
2.7	Diseño experimental.....	13
CAPÍTULO III		14
3	ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	14
3.1	Curvas de calibración para edulcorantes	14

3.2	Obtención de concentración de edulcorantes a partir de la absorbancia.....	15
3.2.1	Análisis de aspartamo (SIN951) en bebida azucarada Coca Cola Light	15
3.2.2	Análisis de acesulfame-K (SIN950) en bebida azucarada Pepsi Light	16
3.2.3	Análisis de sucralosa (SIN955) en bebida azucarada Monster Energy	17
3.3	Análisis estadístico de datos.....	18
3.4	Determinaciones bibliográficas realizadas por cromatografía para edulcorantes en bebidas.....	20
3.5	Verificación de concentración de edulcorantes sintéticos respecto al Codex STAN 192-1995.....	21
4	CAPÍTULO IV.....	23
4.1	CONCLUSIONES.....	23
4.2	RECOMENDACIONES	24
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25
	ANEXOS	30

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Factores en estudio para determinación de edulcorantes en bebidas azucaradas.	12
Tabla 2 Tratamientos para la determinación de tres edulcorantes sintéticos en bebidas azucaradas.	12
Tabla 3 Concentración de aspartamo (mg/L) en bebida azucarada (Coca Cola Light) de la provincia de Tungurahua.	16
Tabla 4 Concentración de acesulfame-K (mg/L) en bebida azucarada (Pepsi Light) de la provincia de Tungurahua.	17
Tabla 5 Concentración de sucralosa (mg/L) en bebida azucarada (Monster Energy) de la provincia de Tungurahua.	18
Tabla 6 Datos para análisis de varianza (ANOVA).	19
Tabla 7 Análisis de varianza	19
Tabla 8 Comparación técnica espectrofotométrica con técnica cromatográfica.....	21
Tabla 9 Cumplimiento del Codex STAN 192-1995 para las bebidas.	21

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1 Estructura de aspartamo	2
Ilustración 2 Estructura del acesulfame-K.....	3
Ilustración 3 Estructura de la sucralosa.	4
Ilustración 4 Curva de calibración para aspartamo.	14
Ilustración 5 Curva de calibración para acesulfame-K.....	14
Ilustración 6 Curva de calibración para sucralosa	15

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Descripción y especificaciones del equipo de espectrofotometría para la lectura de edulcorantes.....	30
Anexo 2. Formato de etiquetas	30
Anexo 3. Certificados de análisis de materiales de referencia.....	32
Anexo 4. Diagrama de flujo del procedimiento.....	34
Anexo 5. Medición de la absorbancia de aspartamo en una bebida azucarada (Coca Cola Light) de distintos cantones de la provincia de Tungurahua.	34
Anexo 6. Medición de la absorbancia de acesulfame-K en una bebida azucarada (Pepsi Light) de distintos cantones de la provincia de Tungurahua.....	35
Anexo 7. Medición de la absorbancia de sucralosa en una bebida azucarada (Monster Energy) de distintos cantones de la provincia de Tungurahua.....	35
Anexo 8. Análisis de varianza con datos obtenidos en Excel.....	36

RESUMEN

Las bebidas azucaradas al considerarse un producto de consumo masivo, se debe llevar un control de sus componentes, en este caso de edulcorantes sintéticos, los cuales son aditivos alimentarios que deben cumplir regulaciones en sus concentraciones a fin de que el alimento no sea perjudicial para sus consumidores.

La presente investigación estuvo orientada a determinar la cantidad de edulcorantes sintéticos en las bebidas azucaradas más consumidas en la provincia de Tungurahua tal selección tomó como referencia el proyecto de investigación denominado Política Tributaria y el consumo de bebidas azucaradas en el Ecuador que fue ejecutado en la FCAUD y además se realizó una comparación bibliográfica con la técnica cromatográfica para garantizar la fiabilidad de los resultados obtenidos. La determinación de la concentración de edulcorantes en bebidas azucaradas se realizó por medio de espectrofotometría, apoyado con el proyecto de investigación de **Castillo (2022)**, los resultados fueron de 112,03 mg por litro para aspartamo, 59,71 mg por litro para acesulfame y 85,83 mg por litro para sucralosa. Los valores experimentales no presentaron tanta discrepancia con los valores bibliográficos cromatográficos. El cumplimiento de la norma CODEX STAN 192-1995 fue verificada ya que las concentraciones de los edulcorantes sintéticos de las bebidas azucaradas presentaron valores inferiores a los establecidos como dosis máxima, lo que asegura que dichas bebidas son eficaces e inocuas para el consumo humano.

Palabras clave: métodos analíticos, espectrofotometría, cromatografía, edulcorantes sintéticos, bebidas azucaradas, aditivos alimentarios.

ABSTRACT

As sugar-sweetened beverages are considered a product of mass consumption, their components must be controlled, in this case synthetic sweeteners, which are food additives that must comply with regulations in their concentrations so that the food is not harmful to their consumers.

The present investigation was oriented to determine the amount of synthetic sweeteners in the most consumed sugary drinks in the province of Tungurahua, such a selection took as a reference the research project called Tax Policy and the consumption of sugary drinks in Ecuador that was executed in the FCAUD In addition, a bibliographic comparison was made with the chromatographic technique to guarantee the reliability of the results obtained. The determination of the concentration of sweeteners in sugary drinks was carried out by means of spectrophotometry, supported by the research project of Castillo (2022), the results were 112.03 mg per liter for aspartame, 59.71 mg per liter for acesulfame and 85.83 mg per liter for sucralose. The experimental values did not present as much discrepancy with the chromatographic bibliographic values. Compliance with the CODEX STAN 192-1995 standard was verified since the concentrations of synthetic sweeteners in sugar-sweetened beverages presented values lower than those established as the maximum dose, which ensures that these beverages are effective and safe for human consumption.

Keywords: analytical methods, spectrophotometry, chromatography, synthetic sweeteners, sugary drinks, food additives.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes investigativos

1.1.1 Sobrepeso y obesidad causadas por bebidas azucaradas

Las bebidas azucaradas suponen una ingesta importante de energía dietética al cuerpo, contribuye a la tercera parte del azúcar total consumida a diario, su consumo en altas cantidades ha contribuido al desarrollo de sobrepeso y obesidad en niños, jóvenes y adultos, a la vez han sido relacionadas con enfermedades cardiovasculares, endocrinológicas y trastornos psicológicos (**Schwendicke & Stolpe, 2017**).

La fructosa presente en el jarabe de maíz es el componente del azúcar que más ha llamado la atención debido a sus efectos en el sobrepeso y la obesidad, los resultados siguen siendo controversiales ya que los niveles de consumos pueden ser relacionados con factores extrínsecos como el económico, la actividad física, malos hábitos, etc. (**Brown et al., 2008**).

1.1.2 Edulcorantes en la dieta

Los edulcorantes o sustitutos del azúcar, también denominados edulcorantes no calóricos o no nutritivos son aquellos compuestos que pueden añadirse a los alimentos y/o bebidas, con la capacidad de reducir el contenido energético y al mismo tiempo poseer propiedades endulzantes, pese a que estos edulcorantes producen percepciones dulces en la boca, en su composición se encuentran productos químicos con distintas estructuras, formas de absorción, metabolismo y vías de excreción (**Cavagnari, 2019**). La población con el fin de reducir el contenido calórico de sus bebidas azucaradas y mantener su sabor dulce han optado por productos con edulcorantes no calóricos, los cuales en un estudio realizado por **Cavagnari (2019)** fueron comparados con agua para demostrar que conducen a una reducción tanto del aporte calórico como del peso corporal.

Las industrias fabricantes de edulcorantes no calóricos sacan provecho de la aprobación de la FDA (Food and Drug Administration) para alentar el uso moderado de sus edulcorantes, los cuales todavía no evidencian beneficios en lo que concierne a equilibrio energético, a mantener o disminuir el peso corporal, colaboración con el control dental, entre otros riesgos de carácter cardiometabólico (**Shankar et al., 2013**).

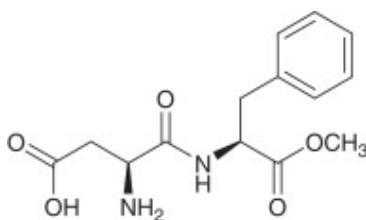
1.1.2.1 Aspartamo

Es un dipéptido compuesto de ácido aspártico, fenilalanina y metanol como se muestra en la **Ilustración 1**. Es un polvo blanco cristalino y 200 veces más dulce que la sacarosa. Actualmente, gran parte de la población mundial consume aspartamo como edulcorante y es usado en alrededor de 6000 productos alimenticios, dentro de los cuales se incluyen a las bebidas azucaradas (**Walters, 2011**).

El aspartamo es más estable en su forma sólida y debe ser almacenado en recipientes herméticos. Algunos cambios en factores como la humedad, temperatura y pH pueden ocasionar la hidrólisis del compuesto causando de forma gradual la pérdida de dulzura (**Food Insight, 2020**). Consta de dos aminoácidos, fenilalanina, la cual ha sido ligeramente modificada añadiendo un grupo metilo para producir el sabor dulce y ácido aspártico, los cuales se descomponen al ingerirse para su uso en la síntesis y metabolismo de las proteínas.

Ilustración 1

Estructura de aspartamo



Fuente: (O'Mullane et al., 2014).

En el tracto digestivo se hidroliza fácilmente por enzimas intestinales a sus aminoácidos constituyentes, ácido aspártico en un 40%, fenilalanina en 50% y metanol en 10%. El ácido aspártico es un aminoácido no esencial, por lo que no es necesario en la dieta ya que el humano lo puede producir, es de importancia en la síntesis de ADN, de urea y como neurotransmisor en el cerebro. Si se presenta un exceso de este aminoácido, se convertirá en fumarato que proporcionará energía (**Lara, 2021**).

La fenilalanina por otra parte, es un aminoácido esencial, por lo que es necesario obtenerlo de la dieta, es un precursor de la tirosina y de la biogénesis de ciertos neurotransmisores. Un exceso de dicho aminoácido resultará en la formación de fumarato y acetoacetato, que liberarán energía (**Walters, 2011**). Por último, el metanol, se metaboliza en el hígado a formaldehído y este se oxida a ácido fórmico.

En personas que padecen fenilcetonuria, la fenilalanina se convertirá en fenilpiruvato, el cual causa riesgos graves en el sistema nervioso provocando a su vez retraso mental que puede llegar a ser permanente en algunos casos (Astudillo & Orellana, 2017). Mientras, en una investigación realizada por Guerrero & Mora (2014) destacan que el excesivo consumo de aspartamo produce ciertos efectos secundarios como pérdida del apetito, irritabilidad, insomnio además de considerarlo como un inductor del cáncer de mama y próstata, estos estudios han sido desmentidos por la FDA y la EFSA (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria) (Joyanes, 2014).

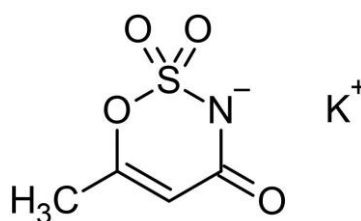
1.1.2.2 Acesulfame-K

Es un edulcorante de alta intensidad soluble en agua, es una sal de potasio como se muestra en la **Ilustración 2**. Presenta estabilidad a altas temperaturas independientemente del pH del alimento, su solubilidad aumenta con la temperatura (Favaro-Trindade et al., 2015). La esterilización y pasteurización no altera el sabor final. Es un polvo higroscópico, lo que quiere decir que absorbe humedad del ambiente (Revenga, 2016).

Por lo general es usado para enmascarar el regusto amargo de otros edulcorantes, pues presenta un efecto sinérgico de dulzura (Astudillo & Orellana, 2017).

Ilustración 2

Estructura del acesulfame-K



Fuente: (Chakraborty & Das, 2019).

Estudios farmacocinéticos desarrollados por la OMS (Organización Mundial de la Salud) en 1991, muestran que el acesulfame-K es absorbido, no es metabolizado y es excretado por la orina sin cambios notables, por lo cual su consumo no puede ser asociado a efectos adversos (Tighrine et al., 2019). No debe utilizarse en grandes concentraciones y tiene que venir acompañado de otro edulcorante para que no deje un regusto metálico desagradable luego de la ingesta (Cuellar & Funes, 2013).

Numerosos organismos encargados de preservar la salud alimenticia, especialmente la FDA y la OMS han concluido que el consumo de acesulfame-K no causa ningún tipo de trastorno o enfermedad asociada, ya que es desechado de forma completa sin presentar derivados (**Favaro-Trindade et al., 2015**).

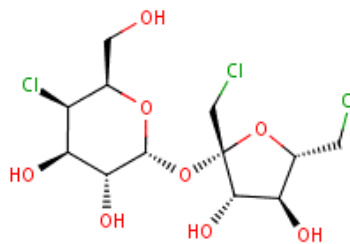
1.1.2.3 Sucralosa

Es un edulcorante semisintético, se produce por cloración de sacarosa mediante la sustitución de tres grupos hidroxilo por átomos de cloro como se aprecia en la **Ilustración 3 (Briand & Salles, 2016)**. Es estable en un rango amplio de pH y temperatura, sin embargo, está comprobado que a temperaturas mayores a 119°C comienza a descomponerse.

Se emplea en una gran variedad de alimentos procesados, en el cuerpo poca es absorbida y la que se absorbe luego es eliminada, es más dulce que otros edulcorantes como el acesulfame-K y el aspartamo (**Ma et al., 2020**).

Ilustración 3

Estructura de la sucralosa.



Fuente: (Das & Chakraborty, 2016).

Al ser una molécula inerte pasa a través del cuerpo sin presentar alteración ni metabolizarse por lo que es eliminada en su totalidad (**Franco, 2021**). Un inconveniente sería someterla a temperaturas muy altas lo que provocaría la liberación de clorofenoles, los cuales al ingerirse alteran la flora bacteriana del tracto digestivo causando cáncer o infertilidad (**Helmenstine, 2019**).

Al ser un derivado clorado causa preocupación pues se lo relaciona con posibles efectos tóxicos o cancerígenos, ya que el cloro pudiera desprenderse y causar complicaciones perturbaría gastrointestinales (**Shah & Jager, 2017**). La FDA asegura que consumir alimentos con sucralosa no causa riesgos ni reproductivos, ni neurológicos, ni cancerígenos (**Das & Chakraborty, 2016**).

1.1.3 Consumo de bebidas azucaradas

Las bebidas azucaradas son aquellas que no contienen alcohol, pero si poseen azúcares, en los últimos años han sido relacionadas con una pésima calidad de dieta, ganancia de peso, obesidad y diabetes tipo 2 en adultos. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) sugiere que los azúcares no deben representar más del 10% de la cantidad de energía que una persona consume al día, esto equivale a 50 g de azúcar o 200 kcal para una dieta promedio de 2000 kcal (**OMS, 2016**).

El consumo de bebidas azucaradas ha aumentado en más del 40% a nivel mundial entre los años 1990 y 2016 causando muertes anuales por diabetes y enfermedades cardiovasculares de 178000 individuos, por otra parte, se dedujo que ciertos edulcorantes artificiales aumentan la intolerancia a la glucosa puesto que la microbiota intestinal es alterada (**Chazelas et al., 2019**).

1.1.4 Método de cuantificación de edulcorantes

1.1.4.1 Método espectrofotométrico

Es una rama de los métodos espectroscópicos los cuales se basan en la medida de la radiación electromagnética emitida o absorbida por sustancias (**Calle, 2011**). Cuando se da la interacción entre la radiación electromagnética y la materia, ciertas frecuencias de la radiación incidente son absorbidas y otras eliminadas. Una molécula cualquiera posee niveles de energía determinados por distribuciones espaciales de electrones, en un fenómeno de absorción lo que ocurre son transiciones electrónicas que lleva a la molécula desde su estado basal hasta uno excitado (**Calle, 2011**).

La espectrofotometría UV-visible es una técnica de análisis que involucra la medida de la cantidad de radiación absorbida por una sustancia en una solución (**Adhikari, 2019**). La absorción depende de la molécula (orgánica), la cual debe presentar en su estructura una región denominada cromóforo compuesta por grupos funcionales capaces de absorber radiación ultravioleta o visible (**Astudillo & Orellana, 2017**).

Según **Passos & Saraiva (2018)** la espectrofotometría de absorción ultravioleta y visible trata de una técnica que se fundamenta en la medición de la atenuación de la radiación electromagnética por una sustancia absorbente, dicha radiación con un rango espectral de 190 a 800 nm. La atenuación de la luz resulta de la reflexión, dispersión, absorción e incluso interferencias, las mediciones se pueden realizar registrando la

absorbancia, donde esta es proporcional a la concentración del analito de interés y la distancia de la luz cuando atraviesa la muestra (**Passos & Saraiva, 2018**).

1.1.4.2 Método cromatográfico

Los edulcorantes habitualmente son determinados mediante HPLC con detección ultravioleta visible acoplada, detección electroquímica o detección espectrométrica de masas, pese a esta tecnología la mayoría son adecuadas para la determinación de un único edulcorante o para mezclas simples (**Zou et al., 2018**). Uno de los factores necesarios para una separación eficiente de los analitos a medir radica en la selección de la columna para lo cual se deben realizar ensayos empleando diferentes columnas (**Joyanes, 2014**).

Al existir una gran cantidad de columnas de separación disponibles sumado a la amplia gama de detectores multifuncionales convierten a HPLC en una de las técnicas más utilizadas en la determinación de edulcorantes de alta intensidad, dichos procedimientos se basan en la separación cromatográfica en fase inversa, en gradiente o por detección de la absorbancia (**Zygler et al., 2009**).

1.1.5 Norma regulatoria para el consumo de aditivos alimentarios

El Codex STAN 192-1995 contempla el conjunto de normas para el uso apropiado de aditivos alimentarios donde se establece la dosis máxima por alimento, para este caso bebidas a base de agua aromatizadas, en aspartamo corresponde a 600 mg/kg de alimento, en acesulfame-K a 600 mg/kg de alimento y en sucralosa a 300 mg/kg de alimento. Fue establecida por el Comité Conjunto De Expertos En Aditivos Alimentarios (JEFCA) por lo que es adoptada a nivel internacional, con el fin de mantener la salud del consumidor y favorecer el comercio de alimentos (**CODEX STAN 192-1995, 2016**).

Por otra parte, el JEFCA de la Organización para la Agricultura y la Alimentación y la Organización Mundial de la Salud con el fin de caracterizar el riesgo del consumo de edulcorantes no calóricos ha establecido una ingesta diaria admisible (IDA) de 15 mg/kg de peso corporal para acesulfame-K, 40 mg/kg de peso corporal para aspartamo y 15 mg/kg de peso corporal para sucralosa (**Chang & Yeh, 2014**).

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo general

Determinar la cantidad de edulcorantes sintéticos en bebidas azucaradas de mayor consumo en la provincia de Tungurahua por espectrofotometría visible y realizar una comparación con la técnica cromatográfica.

1.2.2 Objetivos específicos

- Separar y cuantificar la concentración de los edulcorantes sintéticos en bebidas azucaradas a través de espectrofotometría visible.
- Comparar bibliográficamente la técnica espectrofotométrica con la técnica cromatográfica en la determinación de edulcorantes en bebidas azucaradas.
- Verificar el cumplimiento de la concentración de edulcorantes sintéticos según la norma CODEX STAN 192-1995.

1.3 Hipótesis

1.3.1 Hipótesis Nula

El punto de muestreo no afecta significativamente la concentración de edulcorantes sintéticos de las muestras de bebidas en la provincia de Tungurahua.

1.3.2 Hipótesis alternativa

El punto de muestreo afecta significativamente la concentración de edulcorantes sintéticos de las muestras de bebidas en la provincia de Tungurahua.

CAPÍTULO II

2. METODOLOGÍA

2.1 Equipos y materiales

2.1.1 Materiales de laboratorio

- Balones de aforo (10, 25, 50 y 100 ml)
- Vasos de precipitación (25, 50 y 100 ml)
- Espátula
- Tubos de centrifuga (Falcon)
- Micropipetas de volumen fijo y variable
- Pipetas volumétricas (5 y 10 ml)
- Gradilla
- Jeringas
- Filtros de jeringa 0.45
- Embudo de decantación
- Probetas (10, 25 y 50 ml)
- Celdas de cuarzo

2.1.2 Equipos

- Baño ultrasónico BRANSONIC M2800H
- Balanza analítica BOECO BBL31
- Centrifuga FUNKE GERBER Nova-safety
- Baño termostático VELP SCIENTIFICA F30400207
- Espectrofotómetro Visible Genesis 10vis
- Espectrofotómetro UV-Vis Evolution 60S
- Plancha de calentamiento Bektron BK20

2.1.3 Reactivos

- Aspartamo Analytical Standard SIGMA – ALDRICH LRAC7356
- Acesulfame K – for food analysis SIGMA – ALDRICH BCCF4723
- Sucralose analytical standard SIGMA – ALDRICH BCCD3883
- Ácido acético anhidro Merck

- Acetato de sodio Merck
- Ninhidrina, ACS - ITW
- Etanol absoluto – Merck Millipore
- Sulfato de sodio anhidro Merck
- Ácido sulfúrico 95-97% - Merck - Labomersa
- Éter etílico Merck
- Hidróxido de sodio – Merck Millipore
- Agua destilada
- Permanganato de potasio - Novachem
- Acetonitrilo – Merck Millipore

2.2 Muestreo

Para la selección de muestras, las bebidas azucaradas fueron recolectadas en distintos puntos de los cantones de la provincia de Tungurahua. En base a datos recopilados en la encuesta del proyecto de investigación “Política Tributaria y el consumo de bebidas azucaradas en el Ecuador” que fue ejecutado en la FCAUD para determinar la influencia en la salud del consumo de bebidas azucaradas (**Guano, 2019**) se procedió a elegir como bebidas de análisis a Coca Cola Light, Pepsi Light y Monster Energy, las cuales según dicha investigación son las más consumidas en la provincia.

2.3 Toma y recolección de muestras

Se cumplió con el manual de toma de muestras de alimentos y bebidas, en caso de bebidas se realizó bajo condiciones de asepsia y sanitarias para lo cual la bebida adquirida se mantuvo en su envase original, esta inmediatamente fue depositada en refrigeración con pilas de frío para su debido transporte al lugar de análisis, asegurando que la bebida conserve su estado inicial y posea su respectivo registro con la información necesaria (nombre del analista, fecha y hora, lugar exacto, tipo de bebida, etc.) (**INVIMA, 2015**). Las bebidas se almacenaron a una temperatura entre 3-8°C. Para la recolección de las muestras de trabajo se tomaron en cuenta supermercados en distintos cantones de la provincia de Tungurahua como son Ambato con coordenadas geográficas 17S 763521 9860648, Pelileo con 17S 773557 9852908 y Patate con 17S 777457 9854828.

2.4 Método de análisis

2.4.1 Determinación de edulcorantes por espectrofotometría

Los métodos utilizados para la determinación de edulcorantes en este trabajo se encuentran validados en el trabajo de titulación de **Castillo (2022)** donde se detalla de forma comprensible parámetros de calidad como son la linealidad, sensibilidad, límites de detección y de cuantificación, precisión y exactitud necesarios para validar cualquier método analítico.

2.4.1.1 Preparación de las bebidas azucaradas

Las muestras de bebidas carbonatadas y energizantes se des-gasificaron empleando un baño ultrasónico BRANSONIC M2800H a una frecuencia de 40 kHz por 10 min. en distintos tubos de ensayo (**Kanon, 2017**).

2.4.1.2 Preparación de soluciones

- Buffer acetato: Se tomaron 50 ml de solución de ácido acético 0,2 M y se agregaron 50 ml de solución de acetato de sodio 0,2 M.
- Solución ninhidrina (0,4%): Se pesaron 0,4 g de ninhidrina y se disolvieron en 100 ml de etanol absoluto.

2.4.1.3 Determinación de aspartamo

Para determinar el aspartamo en las bebidas azucaradas se empleó un método espectrofotométrico descrito por **Lau et al., (1988)** el cual se basa en la reacción de aspartamo con ninhidrina.

En un tubo de centrifuga se colocó 0,75 ml de muestra de bebida previamente des-gasificada, posteriormente se añadieron 0,5 ml de buffer acetato pH 3.5 con el fin de mantener el medio ácido y 2 ml de etanol absoluto como disolvente. La mezcla fue colocada en el baño ultrasónico por 5 minutos a una frecuencia de 40 kHz (**Franco, 2021**).

Para la extracción de aspartamo se centrifugo a 5000 rpm por 5 minutos en una centrifuga FUNKE GERBER Nova-safety. Se recogieron 3,5 ml de la fase inferior en un tubo de ensayo y se secaron con sulfato de sodio anhidro. Después de 20 minutos de sedimentación, se tomó 2 ml de solución seca en otro tubo de ensayo y se

adicionaron 2 ml de solución de ninhidrina al 4%, la cual actuó como el cromóforo **(Astudillo & Orellana, 2017)**.

Para aumentar la velocidad de reacción se procedió a hervir la mezcla en un baño termostático VELP SCIENTIFICA F30400207 a 80°C por 20 minutos. La solución se dejó enfriar y se diluyó con etanol hasta 5 ml, se tomó una lectura de absorbancia a 585 nm en un espectrofotómetro Visible GENESYS 10 VIS. Para el blanco se utilizó 1 ml de agua **(Kanon, 2017)**.

2.4.1.4 Determinación de acesulfame-K

Para extraer el acesulfame-K de las bebidas, se transfirieron 50 ml de la muestra de bebida azucarada a un embudo de decantación de 250 ml, se añadió 10 ml de ácido sulfúrico al 50 % produciéndose una reacción exotérmica por lo que se dejó enfriar. El contenido del embudo se lavó con dos porciones de 50 ml de éter etílico, se desechó la capa acuosa y a la capa etérea se le añadió 5 ml de hidróxido de sodio al 50% volviéndose a producir una reacción exotérmica y dejándose enfriar **(Franco, 2021)**. Se procedió con otro lavado empleando 3 porciones de 5 ml de etanol, descartando la capa etérea. Luego, se tuvo que evaporar hasta sequedad la capa alcohólica en una plancha de calentamiento Bektron BK20 para obtener un residuo el cual se disolvió en un balón de aforo con agua destilada y se aforó a 25 ml. Se realizó la medición espectrofotométrica a 227 nm contra un blanco de agua destilada en un espectrofotómetro UV-Vis Evolution 60S **(Cuellar & Funes, 2013)**.

2.4.1.5 Determinación de sucralosa

Para el tratamiento de la muestra se tuvo que transferir 1 ml de muestra de bebida azucarada a un matraz aforado de 25 ml, el cual se diluyó hasta el aforo con acetonitrilo actuando como disolvente para la sucralosa y se filtró con un filtro de jeringa (0,45 µm) para obtener una solución clara **(Zygler et al., 2009)**.

La determinación de sucralosa se llevó a cabo mediante un método cinético espectrofotométrico el cual se basa en la reacción de oxidación de la sucralosa con permanganato de potasio en medio alcalino **(Kanon, 2017)**.

Para lo cual, en matraces aforados de 10 ml se colocaron alícuotas de 3 ml de permanganato de potasio 5×10^{-3} M como reactivo cromóforo y 1 ml de solución de hidróxido de sodio 0,5 M para mantener un medio alcalino. Se agregó la muestra de bebida azucarada diluida hasta el aforo y se agitó vigorosamente. Luego de 30 minutos

se midió la absorbancia a 610 nm en un espectrofotómetro Visible GENESYS 10 VIS. (Youssef et al., 2011).

2.5 Factores en estudio

Tabla 1

Factores en estudio para determinación de edulcorantes en bebidas azucaradas.

FACTOR	DESCRIPCIÓN	CÓDIGO	DESCRIPCIÓN
A	Edulcorante	A1	Aspartamo
		A2	Acesulfame-K
		A3	Sucralosa
B	Lugar de muestreo	B1	Ambato
		B2	Pelileo
		B3	Patate

Elaborado por: Daniel Salinas

En la **Tabla 1** se muestran los factores en estudio, donde se determinaron 3 edulcorantes en 3 lugares de muestreo empleando método espectrofotométrico.

2.6 Tratamientos

Tabla 2

Tratamientos para la determinación de tres edulcorantes sintéticos en bebidas azucaradas.

Tratamiento	Descripción
T1	A1B1 Aspartamo, Ambato
T2	A1B2 Aspartamo, Pelileo
T3	A1B3 Aspartamo, Patate
T4	A2B1 Acesulfame-K, Ambato
T5	A2B2 Acesulfame-K, Pelileo
T6	A2B3 Acesulfame-K, Patate

T7	A3B1	Sucralosa, Ambato
T8	A3B2	Sucralosa, Pelileo
T9	A3B3	Sucralosa, Patate

Elaboración por: Daniel Salinas

2.7 Diseño experimental

De los resultados obtenidos en la determinación de la concentración de edulcorantes, se aplicó un diseño completamente al azar (DCA) en un arreglo factorial 3x3 con 3 repeticiones. A estos datos se empleó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar la diferencia significativa entre los factores A y B que fueron la concentración de edulcorantes y el cantón donde se fue el lugar de muestreo.

CAPÍTULO III

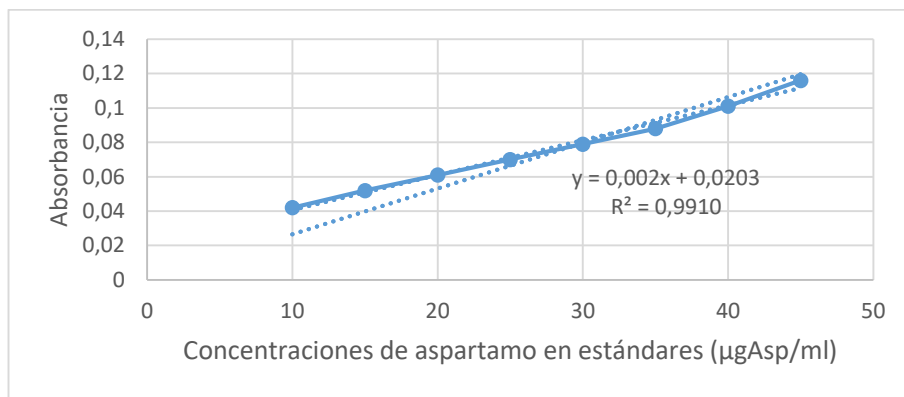
3. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.1 Curvas de calibración para edulcorantes

La determinación de la concentración de edulcorantes se llevó a cabo tomando como punto de partida las curvas de calibración realizadas en la investigación de **Castillo (2022)** como se muestra en la **Ilustración 4** con un coeficiente de correlación de 0,991 para el caso del aspartamo, para el acesulfame-K en la **Ilustración 5** que presentó un coeficiente de correlación de 0,993 y la curva de calibrado para la sucralosa en la **Ilustración 6** cuyo coeficiente de correlación fue de 0,997.

Ilustración 4

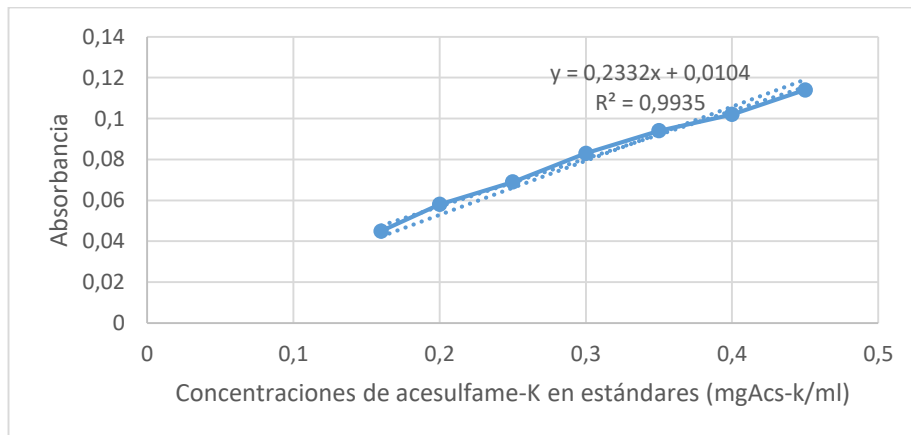
Curva de calibración para aspartamo.



Fuente: (Castillo, 2022)

Ilustración 5

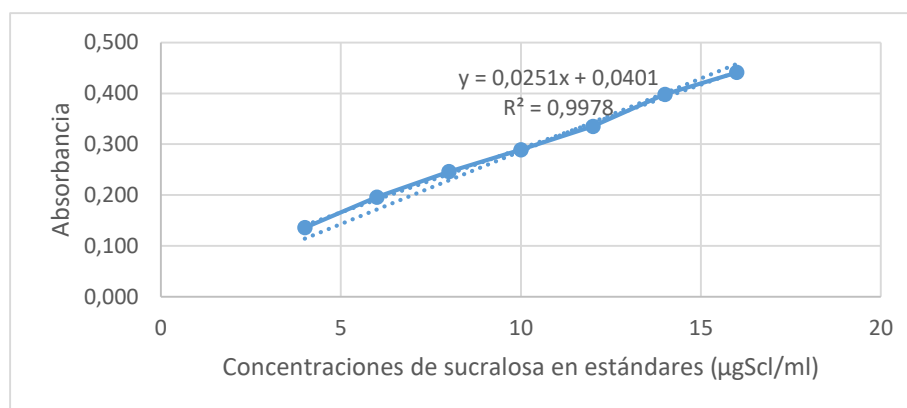
Curva de calibración para acesulfame-K



Fuente: (Castillo, 2022)

Ilustración 6

Curva de calibración para sucralosa



Fuente: (Castillo, 2022)

Las figuras de las curvas de calibrado muestran la correlación de las concentraciones de los estándares con los datos de absorbancia a una determinada longitud de onda.

3.2 Obtención de concentración de edulcorantes a partir de la absorbancia

3.2.1 Análisis de aspartamo (SIN951) en bebida azucarada Coca Cola Light

Con el fin de poder leer la absorbancia en el espectro visible se utilizó ninhidrina como reactivo cromóforo, el cual es un compuesto que reacciona con aminoácidos que contengan grupos amino libres, la ninhidrina se reduce dando origen a amoníaco y dióxido de carbono, la ninhidrina reducida reacciona con el amoníaco y otra molécula de ninhidrina, dando origen a un color azul-violeta con picos de absorción máxima en 570 nm (Jorrín et al., 2014).

Las concentraciones de aspartamo en las bebidas se obtuvieron mediante las absorbancias registradas en el espectrofotómetro “GENESIS 10vis” y su correspondiente ecuación de regresión lineal, la cual fue obtenida del trabajo de Castillo (2022) como se aprecia en la Figura 3 $y = 0,002x + 0,0203$ la concentración de aspartamo se obtuvo despejando “x” donde $x = (y - 0,0203) / 0,002$. Para obtener resultados confiables se realizaron tres lecturas y se obtuvo el promedio de las absorbancias de aspartamo por bebida. Los resultados de las concentraciones de aspartamo en Coca Cola Light se muestran en la **Tabla 3**.

Tabla 3

Concentración de aspartamo (mg/L) en bebida azucarada (Coca Cola Light) de la provincia de Tungurahua.

Lugar de muestreo	1	2	3	Promedio
Ambato	111,75	106,75	119,25	
Pelileo	109,25	111,75	116,75	112,03
Patate	109,25	116,75	106,75	

Elaborado por: Daniel Salinas

En la **Tabla 3** se representan los valores de las concentraciones de aspartamo en una misma marca de bebida, la cual fue adquirida en distintos puntos de la provincia de Tungurahua reflejando valores de aproximadamente 112 mg/L, los cuales son muy altos en comparación al trabajo de **Kanon (2017)** donde el rango de aspartamo en sus muestras rondan entre 10,2 a 25,9 mg/L, esto puede ser debido a que se tratan de bebidas ajenas a la región, lo cual involucra diferentes normas alimenticias. Por otro lado, en investigaciones de origen hispano como **Astudillo & Orellana (2017)** presentan valores de entre 113,31 y 143,69 mg/L los cuales son más próximos a los resultados obtenidos.

3.2.2 Análisis de acesulfame-K (SIN950) en bebida azucarada Pepsi Light

Al existir un sinnúmero de interferencias en la bebida el edulcorante fue extraído por decantación con la asistencia de solventes orgánicos los cuales debieron ser inmiscibles con la fase a extraer con cada lavado se desechaban aquellos compuestos que no resultaban de utilidad, para la lectura en el espectrofotómetro, el acesulfame-K al poseer un grupo sulfóxido presentó picos de absorbancia en el rango de 215 a 230 nm (**Astudillo & Orellana, 2017**).

La concentración de acesulfame-K en bebidas sometidas a los mismos tratamientos fue obtenida por medio de las absorbancias registradas en el espectrofotómetro “UV-Vis Evolution 60S” y su correspondiente ecuación de regresión lineal, la cual fue obtenida del trabajo de **Castillo (2022)** como se muestra en la Figura 5 $y = 0,2332x + 0,0104$ la concentración de acesulfame-K se obtiene despejando “x” donde $x = (y - 0,0104) / 0,2332$. Para obtener valores representativos se realizaron tres lecturas y se

reportó el promedio de las concentraciones de aspartamo por bebida. Los resultados de las concentraciones de acesulfame-K en Pepsi Light se indican en la **Tabla 4**.

Tabla 4

Concentración de acesulfame-K (mg/L) en bebida azucarada (Pepsi Light) de la provincia de Tungurahua.

Lugar de muestreo	1	2	3	Promedio
Ambato	58,30	54,00	58,30	
Pelileo	54,00	58,30	62,60	59,71
Patate	66,80	62,60	62,60	

Elaborado por: Daniel Salinas

En la **Tabla 4** se muestran las concentraciones de acesulfame-K calculadas por medio de las absorbancias en una misma bebida dando un resultado cercano a 60 mg/L, el cual guarda concordancia con estudios realizados por **Franco (2021)** donde obtuvo valores 7,5 a 182,6 mg/L en muestras que fueron cuantificadas a partir del detector UV y **Astudillo & Orellana (2017)** los mismos que presentaron valores mínimos y máximos de entre 35,39 a 103,85 mg/L.

3.2.3 Análisis de sucralosa (SIN955) en bebida azucarada Monster Energy

En un estudio realizado por **Youssef et al., (2011)** se encontró que la sucralosa reaccionaba con el permanganato de potasio en medio alcalino produciendo un color verde azulado debido a la producción de ion manganato el cual absorbe radiación a 610 nm. La coloración permanecía estable por 60 minutos, por lo que se aplicó un método cinético pues la intensidad del color aumentaba con el tiempo, cabe recalcar que se utilizó acetonitrilo ya que el MnO_4^- podría oxidar otros disolventes presentes para dar lugar a un precipitado verde de MnO_4^{2-} .

La concentración de sucralosa en bebidas sujetas a los mismos tratamientos fue obtenida mediante las absorbancias registradas en el espectrofotómetro “GENESIS 10vis” y su correspondiente ecuación de regresión lineal, la cual fue obtenida del trabajo de **Castillo (2022)** como se muestra en la Figura 6 $y = 0,0251x + 0,0401$ la concentración de sucralosa se obtiene despejando “x” donde $x = (y - 0,0401) / 0,0251$.

Para obtener valores confiables se realizaron siete lecturas y se reportó el promedio de las concentraciones de aspartamo por bebida. Los resultados de las concentraciones de sucralosa en Monster Energy se indican en la **Tabla 5**.

Tabla 5

Concentración de sucralosa (mg/L) en bebida azucarada (Monster Energy) de la provincia de Tungurahua.

Lugar de muestreo	1	2	3	Promedio
Ambato	83,50	77,50	82,50	
Pelileo	87,50	92,50	91,50	85,83
Patate	90,50	87,50	81,57	

Elaborado por: Daniel Salinas

En la **Tabla 5** se muestran valores de concentración de sucralosa en un tipo de bebida azucarada donde el promedio es cercano a 85 mg/L, dicho resultado es próximo al obtenido en la investigación de **Youssef et al. (2011)** donde especifica que según su método analítico validado encuentra un valor de 101 mg/L mientras que **Joyanes (2014)** en su trabajo indica que sus valores fueron de 21,2 a 128,9 mg/L.

3.3 Análisis estadístico de datos

Se empleó un diseño factorial de 3 x 3 para facilitar la aplicación de un “Análisis de Varianza de dos factores con varias muestras por grupo) en el software Excel en la **Tabla 6**, en la cual edulcorante es el factor A y el cantón el factor B se tuvo tres réplicas.

Tabla 6*Datos para análisis de varianza (ANOVA).*

Edulcorante (A)	Cantón (B)		
	Ambato	Pelileo	Patate
Aspartame	111,75	109,25	109,25
	106,75	111,75	116,75
	119,25	116,75	106,75
Acesulfame	58,30	54,00	66,80
	54,00	58,30	62,60
	58,30	62,60	62,60
Sucralosa	83,50	87,50	90,50
	77,50	92,50	87,50
	82,50	91,50	81,57

Elaborado por: Daniel Salinas

A continuación, se presenta la **Tabla 7** con la cual se puede rechazar o aceptar la hipótesis nula con mayor entendimiento en el análisis de varianza.

Tabla 7*Análisis de varianza*

Factores	S.C.	G.L.	F	Probabilidad	F crítica
Edulcorant (A)	12311,63296	2	369,920392	2,40575E-15	3,554557146
Cantón (B)	77,68962222	2	2,33429437	0,125496668	3,554557146
Interacción (AB)	144,9136889	4	2,17706818	0,112856314	2,927744173
Total	12833,77287	26			

Elaborado por: Daniel Salinas

En la **Tabla 7** se pueden apreciar los valores de F calculada y F crítica o de tabla con las cuales se realizó una comparación y se decidió rechazar la hipótesis nula del factor A, y aceptar las hipótesis nulas de los factores B y AB, de forma más explícita se demuestra que la concentración de edulcorantes varía más entre cada edulcorante que por el cantón del cual fue tomado, por lo que el lugar de muestro no afecta significativamente las concentraciones de edulcorantes en bebidas azucaradas.

3.4 Determinaciones bibliográficas realizadas por cromatografía para edulcorantes en bebidas

Las concentraciones de edulcorantes al ser muy bajas y al estar presentes en matrices de alta complejidad gracias a las diferencias en su composición requieren de métodos analíticos validados que aseguren fiabilidad, sensibilidad y reflejen de forma cuantitativa el resultado de la determinación (Skoog et al., 2015).

De entre la gran variedad de métodos existentes para la determinación de edulcorantes en matrices alimenticias, se encontró que los métodos cromatográficos son los que reciben mayor reconocimiento, siendo la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) la más popular en este campo, se fundamenta en las interacciones específicas que se dan entre la columna y los analitos (Chang & Yeh, 2014).

En un trabajo desarrollado por Franco (2021) en el cual determina acesulfame-K por HPLC con detección UV en bebidas carbonatadas. Los resultados de concentración de acesulfame-K con el detector UV presentan valores de entre 7,3 y 191,4 mg/L, mientras que los resultados por espectrofotometría fueron de 112,03 mg/L.

En otro proyecto de investigación se empleó la técnica HPLC para determinar simultáneamente aspartamo y acesulfame K en bebidas refrescantes y carbonatadas, donde se encontró que los rangos de concentración de aspartamo presentaron valores entre 2,36 y 334,19 mg/L; mientras que los de acesulfame K mostraron niveles en el rango de 8,71 a 165,02 mg/L (Morales, 2013), lo cual refleja la veracidad de los datos obtenidos espectrofotométricamente que fueron de 112,03 mg/L para aspartamo y 59,71 mg/L para acesulfame-K.

En un trabajo más completo realizado por Joyanes (2014) con el fin de determinar de forma simultánea edulcorantes tales como acesulfame K, aspartamo, sacarina, ciclamato y sucralosa en bebidas azucaradas utilizó HPLC-MS con un analizador de tiempo de vuelo y una fuente de ionización.

En cuanto a los edulcorantes analizados, la concentración de aspartamo mínima fue de 15 mg/L y la máxima fue de 465,3 mg/L. Por otra parte, muestras de dicha investigación reflejaron una concentración para acesulfame-K de 26,1 y 195,3 mg/L. Por última instancia, para la sucralosa aunque menor cantidad de bebidas presentaron este edulcorante sus concentraciones estuvieron entre 21,2 y 128,9 mg/L (Joyanes, 2014) en este trabajo fue donde más proximidad y semejanza de datos hubieron debido

a su amplia variedad de bebidas analizadas. Por esta razón se tomaron los siguientes datos expuestos y se compararon mediante una tabla.

Tabla 8

Comparación técnica espectrofotométrica con técnica cromatográfica

Edulcorantes	Concentraciones por espectrofotometría (mg/L)	Concentraciones por cromatografía (mg/L)
Aspartamo	112,03	15,00-465,30
Acesulfame-K	59,71	26,10-195,30
Sucralosa	85,83	21,20-128,90

Elaborado por: Daniel Salinas

En la **Tabla 8** se muestran los valores de concentración de edulcorantes no calóricos en bebidas azucaradas por la técnica espectrofotométrica y cromatográfica. Los datos obtenidos por la vía experimental fueron cercanos o bien estuvieron en los rangos determinados por otras investigaciones que emplearon métodos cromatográficos, lo cual quiere decir que, aunque la cromatografía sirve para determinar edulcorantes en bebidas se puede trabajar con espectrofotometría que es una técnica fiable y segura para realizar determinaciones de distintos aditivos en bebidas azucaradas, como en este caso para verificar el cumplimiento las dosis máximas.

3.5 Verificación de concentración de edulcorantes sintéticos respecto al Codex STAN 192-1995.

Tabla 9.

Cumplimiento del Codex STAN 192-1995 para las bebidas.

Edulcorantes	Concentraciones en bebidas (mg/L)	Dosis Máxima (mg de aditivo/kg de alimento)	Decisión
Aspartamo	112,03	600	CUMPLE
Acesulfame-K	59,71	600	CUMPLE
Sucralosa	85,83	300	CUMPLE

Elaborado por: Daniel Salinas

Por conveniencia, las concentraciones de los edulcorantes fueron expresadas en mg/L con la finalidad de verificar el cumplimiento de la norma Codex STAN 192-1995, asumiendo que dicha expresión es equivalente a mg/kg de alimento. Como se observa en la **Tabla 9**, las diferentes bebidas cumplen con las dosis máximas establecidas, lo que quiere decir que las concentraciones aseguran que la ingestión de dicho aditivo no exceda su Ingesta Diaria Admisible (IDA) lo que determina que es funcionalmente eficaz e inocua en un alimento para personas de cualquier peso (**CODEX STAN 192-1995, 2016**).

CAPÍTULO IV

4.1 CONCLUSIONES

- Se determinó la concentración de los edulcorantes sintéticos aspartamo, acesulfame-K y sucralosa en bebidas con mayor consumo en la provincia de Tungurahua basado en el proyecto de investigación “Política Tributaria y el consumo de bebidas azucaradas en el Ecuador” que fue ejecutado en la FCAUD esto por medio de espectrofotometría, los valores no fueron superiores al valor máximo establecido por la norma CODEX STAN 192-1995 en cada uno de los casos, además como información complementaria con el fin de conocer el grado de confiabilidad y de veracidad de los resultados obtenidos en este trabajo se realizó una comparación bibliográfica con determinaciones realizadas por la técnica de cromatografía.
- Se separaron y cuantificaron edulcorantes sintéticos no calóricos, siendo la concentración de aspartamo en Coca Cola Light de 112,03 mg/L, la concentración de acesulfame-K en Pepsi Light de 59,71 mg/L y la concentración de sucralosa en Monster Energy de 85,83 mg/L, sin duda, el edulcorante con mayor concentración en bebidas azucaradas en la provincia de Tungurahua es el aspartamo.
- Se compararon los resultados obtenidos por espectrofotometría con valores bibliográficos obtenidos por diversas técnicas que tuvieron como base la cromatografía, de lo cual se concluyó que los valores experimentales obtenidos no difieren con los datos recabados.
- Se verificó el cumplimiento de la concentración de edulcorantes sintéticos en bebidas azucaradas consumidas en la provincia de Tungurahua según la norma establecida en el CODEX STAN 192-1995, en la **Tabla 8** se muestran las concentraciones según la bebida y edulcorante, donde el aspartamo tiene una dosis máxima establecida de 600 mg/kg de alimento siendo el valor de Coca Cola Light de 112,03 mg/L, inferior a este valor; por otro lado, la dosis máxima de acesulfame-K de 600 mg/kg de alimento no es rebasada por Pepsi Light con 59,71 mg/L; finalmente para la sucralosa la dosis máxima es de 300 mg/kg de alimento donde el valor de Monster Energy fue de 85,83 mg/L, respetando el límite.

4.2 RECOMENDACIONES

- Se recomienda aplicar otros métodos de desgasificación de bebidas como la desgasificación con membranas o el burbujeo de gas inerte, puesto que en el presente trabajo se presentaron algunos inconvenientes como derrames, vertidos, es decir pérdida de volumen de la muestra.
- Emplear el método de adición de estándar que consiste en añadir diferentes concentraciones del estándar del analito en forma ascendente a un volumen de muestra conocida donde las mediciones deben realizarse antes y después de añadir el estándar, este método con el fin de evitar el efecto matriz ya que las bebidas azucaradas al ser muestras altamente complejas podrían significar errores en la medición.
- Se recomienda ampliar el estudio hacia otros parámetros fisicoquímicos que influyen en las características organolépticas y en la salud como son los °Brix, acidez, pH y el volumen de CO₂ para incluirlos en el control de calidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adhikari, B. (2019). *Estimation of Caffeine present in various soft drinks*. [Tribhuvan University]. [http://202.45.146.37:8080/jspui/bitstream/123456789/140/1/Bharat Thesis.pdf](http://202.45.146.37:8080/jspui/bitstream/123456789/140/1/Bharat%20Thesis.pdf)
- Astudillo, J., & Orellana, A. (2017). *CUANTIFICACIÓN DE ASPARTAME Y ACESULFAME DE POTASIO EN BEBIDAS GASEOSAS EXPENDIDAS EN LOS SUPERMERCADOS DE LA CIUDAD DE CUENCA* [Universidad de Cuenca].
<http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/28564/1/Titulacion.pdf>
- Briand, L., & Salles, C. (2016). Taste perception and integration. In *Flavor* (pp. 101–119). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100295-7.00004-9>
- Brown, C. M., Dulloo, A. G., & Montani, J. P. (2008). Sugary drinks in the pathogenesis of obesity and cardiovascular diseases. *International Journal of Obesity*, 32, S28–S34. <https://doi.org/10.1038/ijo.2008.204>
- Calle, S. (2011). *Determinación analítica de la cafeína en diferentes productos comerciales* [Universitat Politècnica de Catalunya].
<https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2099.1/11148/Memòria.pdf>
- Castillo, A. (2022). *Validación del Método Analítico por Espectrofotometría UV-Vis para la Determinación de Edulcorantes en Bebidas Azucaradas Consumidos en la Provincia de Tungurahua*. UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO.
- Cavagnari, B. M. (2019a). Non-caloric sweeteners: Specific characteristics and safety assessment. *Archivos Argentinos de Pediatría*, 117(1), E1–E7. <https://doi.org/10.5546/aap.2019.eng.e1>
- Cavagnari, B. M. (2019b). NON-CALORIC SWEETENERS AND BODY WEIGHT. *Medicina*, 79(1), 115–122.
- Chakraborty, R., & Das, A. (2019). Artificial sweeteners. *Encyclopedia of Food Chemistry*, 1, 30–34. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.21619-3>
- Chang, C. S., & Yeh, T. S. (2014). Detection of 10 sweeteners in various foods by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Food and Drug Analysis*, 22(3), 318–328. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2014.01.024>
- Chazelas, E., Srour, B., Desmetz, E., Kesse-guyot, E., Julia, C., Deschamps, V., Druesne-pecollo, N., Galan, P., Hercberg, S., Latino-martel, P., Deschasaux, M.,

- & Touvier, M. (2019). Sugary drink consumption and risk of cancer : results from NutriNet-Santé prospective cohort. *BMJ*, 7–20. <https://doi.org/10.1136/bmj.12408>
- CODEX STAN 192-1995. (2016). *NORMA GENERAL PARA LOS ADITIVOS ALIMENTARIOS*. 1–520. http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCXS%2B192-1995%252FCXS_192s.pdf
- Cuellar, L., & Funes, M. (2013). *Determinacion De Aspartame, Acesulfame K Y Sucralosa Por Espectrofotometria Ultravioleta Visible E Infrarrojo En Jugos Dieteticos Comercializados En El Municipio De Soyapango*. 1–111. <http://ri.ues.edu.sv/3269/1/16103238.pdf>
- Das, A., & Chakraborty, R. (2016). Sweeteners: Classification, Sensory and Health Effects. In *Encyclopedia of Food and Health* (pp. 234–240). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00677-2>
- Favaro-Trindade, C. S., Rocha-Selmi, G. A., & dos Santos, M. G. (2015). Microencapsulation of Sweeteners. In *Microencapsulation and Microspheres for Food Applications* (pp. 333–349). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800350-3.00022-4>
- Food Insight. (2020). *Todo lo que necesita saber sobre el aspartamo*. <https://foodinsight.org/everything-you-need-to-know-about-aspartame/>
- Franco, B. (2021). *Determinación de edulcorantes en bebidas carbonatadas mediante técnicas espectroscópicas y cromatográficas* [Universidad de Valladolid]. <https://uvadoc.uva.es/bitstream/handle/10324/49744/TFM-G1441.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Guano, J. G. (2019). *El impuesto a los consumos especiales en la venta de bebidas azucaradas en el Ecuador*. <https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/29973/1/T4584i.pdf>
- Guerrero, T., & Mora, G. (2014). Posibles riesgos para la salud debido al consumo de aspartame (Possible health risks due to the consumption of aspartame). *Enfoque UTE*, 5(2), 1–13. http://scielo.senescyt.gob.ec/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1390-65422014000200001
- Helmenstine, A. (2019). *La diferencia entre sacarosa y sucralosa*. ThoughtCo.

- <https://www.thoughtco.com/difference-between-sucrose-and-sucralose-607389>
- Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos - INVIMA. (2015). *Manual de toma de muestras de alimentos y bebidas para entidades territoriales de salud* (Vol. 1).
- Jorrín, J., Abril, M. A., & Bárcena, J. A. (2014). *Separación de aminoácidos por cromatografía en capa fina y detección mediante reacción con ninhidrina* [Universidad de Rabanales]. [https://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/11 CROMATOLOGRAFIA DE CAPA FINA DE AAs.pdf](https://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/11_CROMATOLOGRAFIA_DE_CAPA_FINA_DE_AA.pdf)
- Joyanes, V. (2014). *Determinación de edulcorantes artificiales en bebidas* [Universidad de Jaén]. http://tauja.ujaen.es/bitstream/10953.1/554/1/TFG_JoyanesCárdenas%20Virginia.pdf
- Kanon, K. I. (2017). *Quantitative Determination of Artificial Sweeteners and Sucrose in Energy Drinks and Mango Juice Available in Dhaka City by UV-Spectrophotometric Method. December.*
- Lara, A. (2021). *Incidencia del consumo de edulcorantes no calóricos (Aspartame y Acesulfame Potásico) en la población de la ciudad de Ambato.* [UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO]. https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/32594/1/AL_778.pdf
- Lau, O. W., Luk, S. F., & Chan, W. M. (1988). Spectrophotometric determination of aspartame in soft drinks with ninhydrin as reagent. *The Analyst*, 113(May), 765–768. <https://doi.org/10.1039/AN9881300765>
- Ma, K., Li, X., Zhang, Y., & Liu, F. (2020). Determining high-intensity sweeteners in white spirits using an ultrahigh performance liquid chromatograph with a photodiode array detector and charged aerosol detector. *Molecules*, 25(1). <https://doi.org/10.3390/molecules25010040>
- Morales, J. (2013). *Cuantificación de Aspartame y Acesulfame-k por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)* [Universidad Zamorano]. <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/662/1/AGI-2007-T030.pdf>
- O'Mullane, M., Fields, B., & Stanley, G. (2014). Food Additives: Sweeteners. *Encyclopedia of Food Safety*, 2, 477–484. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378612-8.00231-6>
- OMS. (2016). Be smart Drink water. *Western Pacific Region.*

- Passos, M., & Saraiva, L. (2018). Detection in UV-visible spectrophotometry : Detectors , detection systems , and detection strategies. *LAQV, REQUIMTE*. <https://doi.org/10.1016/j.measurement.2018.12.045>
- Revenga, J. (2016). ¿SON INSANOS LOS EDULCORANTES? El Comidista. https://elcomidista.elpais.com/elcomidista/2016/01/15/articulo/1452853905_347274.html
- Schwendicke, F., & Stolpe, M. (2017). Taxing sugar-sweetened beverages: Impact on overweight and obesity in Germany. *BMC Public Health*, 17(1), 14–18. <https://doi.org/10.1186/s12889-016-3938-4>
- Shah, R., & Jager, L. (2017). Recent Analytical Methods for the Analysis of Sweeteners in Food : A Regulatory Perspective Recent Analytical Methods for the. *Food and Drug Administration*, 5. <http://digitalcommons.unl.edu/usfda/5%0AThis>
- Shankar, P., Ahuja, S., & Sriram, K. (2013). Non-nutritive sweeteners : Review and update. *Nutrition*, 11, 1293–1299. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2013.03.024>
- Skoog, D., West, D., Holler, J., & Crouch, S. (2015). Introducción a métodos espectroquímicos. In *Fundamentos de química analítica* (Novena Edi, pp. 677–685).
- Thermo Fisher. (2018). *Thermo Scientific™ Espectrofotómetro UV-Visible Evolution™ 60S*. Fisher Scientific. <https://www.fishersci.es/shop/products/evolution-60s-uv-visible-spectrophotometer/p-4532040>
- Tighrine, A., Amir, Y., Alfaro, P., Mamou, M., & Nerín, C. (2019). Simultaneous extraction and analysis of preservatives and artificial sweeteners in juices by salting out liquid-liquid extraction method prior to ultra-high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*, 277, 586–594. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.107>
- Walters, E. (2011). Aspartame, a sweet-tasting dipeptide. *Rosalind Franklin University*. <http://www.chm.bris.ac.uk/motm/aspartame/aspartamec.html>
- Youssef, R. M., Korany, M. A., Khamis, E. F., Mahgoub, H., & Kamal, M. F. (2011). Kinetic spectrophotometric methods for the determination of artificial sweetener (sucralose) in tablets. *Drug Testing and Analysis*, 3(4), 214–220. <https://doi.org/10.1002/dta.208>

- Zou, X., Zhang, N., Li, G., Long, M., Xiao, Z., & Tong, L. (2018). *Determination of eight high-intensity sweeteners in alcohol beverages by HPLC- MS / MS*. *Determination of Eight High-Intensity Sweeteners in Alcohol Beverages by HPLC-MS / MS. 030011*(November), 1–6.
- Zygler, A., Wasik, A., & Namieśnik, J. (2009). Analytical methodologies for determination of artificial sweeteners in foodstuffs. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 28(9), 1082–1102. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.06.008>

ANEXOS

Anexo 1. Descripción y especificaciones del equipo de espectrofotometría para la lectura de edulcorantes.



Ancho de banda espectral	1,0 nm
Rango de onda	190 a 1100 nm
Tipo de detector	Fotodiodos duales de silicio
Precisión de longitud de onda	1,0 nm
Repetitividad de longitud de onda	0,5 nm
Velocidad de barrido	Hasta 3600 nm/min
Velocidad de barrido de longitud de onda	4200 nm/min

Fuente: (Thermo Fisher, 2018)

Anexo 2. Formato de etiquetas

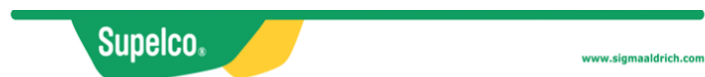
Universidad Técnica de Ambato Muestreo de bebidas Azucaradas	
Punto 1 AMBATO	
Fecha de muestreo	11 /12/ 2021
Marca de la bebida	Coca Cola Light
Parámetro analizar	Aspartamo
Preservante	Hielo 4C°

Universidad Técnica de Ambato	
Muestreo de bebidas Azucaradas	
Punto 2 PELILEO	
Nombre del analista	Daniel Salinas
Fecha de muestreo	12 /12/ 2021
Marca de la bebida	Pepsi Light
Parámetro analizar	Acesulfame-K
Preservante	Hielo 4C°

Universidad Técnica de Ambato	
Muestreo de bebidas Azucaradas	
Punto 3 PATATE	
Nombre del analista	Daniel Salinas
Fecha de muestreo	13 /12/ 2021
Marca de la bebida	Monster Energy
Parámetro analizar	Sucralosa
Preservante	Hielo 4C°

Elaborado por: Daniel Salinas

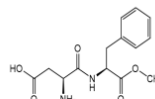
Anexo 3. Certificados de análisis de materiales de referencia



Certificate of Analysis - Analytical Standard

Aspartame

Product no.: 47135
Lot no.: LRAC7356
Description of CRM: WHITE POWDER
Expiry date: September 2023
Storage: REFRIGERATE
Certificate version: LRAC7356.01 (Note: Certificates may be updated due to the availability of new data. Check our website at: www.sigma-aldrich.com for the most current version.)
Chemical formula: C₁₄H₁₈N₂O₅
Molecular mass: 294.30
CAS No.: 22839-47-0



Analyte	Purity (Mass Balance/ basis)
Aspartame	98.5% (Mass Balance/dried basis)

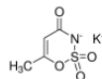
Intended use: Intended for Laboratory Use only. Not for drug, household or other uses
Minimum sample size: 10 mg
Instructions for handling and correct use: Do not dry, use on the as is basis. The internal pressure of the container may be slightly different from the atmospheric pressure at the user's location. Open slowly and carefully to avoid dispersion of the material. Attachment of a 20 mm aluminum crimp seal recommended for unused portions.
Health and safety information: All chemical reference materials should be considered potentially hazardous and should be used only by qualified laboratory personnel. Please refer to the Safety Data Sheet for detailed information about the nature of any hazard and appropriate precautions to be taken.
Certificate issue date: 29-September-2020
Packaging: 500MG IN AMBER VIAL

[Andy Ommen - QC]

[Mark Pooler - QA]

Fuente: SIGMA – ALDRICH

Certificate of Analysis

Product Name:
Acesulfame K - for food analysis, ≥99.0%Product Number: 04054
Batch Number: **BCCF4723**
Brand: SIAL
CAS Number: 55589-62-3
Formula: C₄H₄KNO₄S
Formula Weight: 201.24 g/mol
Quality Release Date: 17 FEB 2021

Test	Specification	Result
Appearance (Colour)	Colorless or White	White
Appearance (Form)	Powder or Crystals	Powder
HPLC	≥ 99.0 %	99.9 %
(Assay in Weight %)		
Carbon Content		23.74 %
23.87 % (Theory)		
Hydrogen Content		2.27 %
2.00 % (Theory)		
Nitrogen Content		7.08 %
6.96 % (Theory)		
Sulfur (S)		16.00 %
15.93 % (Theory)		
Infrared Spectrum	Conforms to Structure	Conforms

Dr. Reinhold Schwenninger
Quality Assurance
Buchs, Switzerland CH

Fuente: SIGMA – ALDRICH

SIGMA-ALDRICH®

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103 USA
Email USA: techserv@sial.com Outside USA: eurtechserv@sial.com

Certificate of Analysis

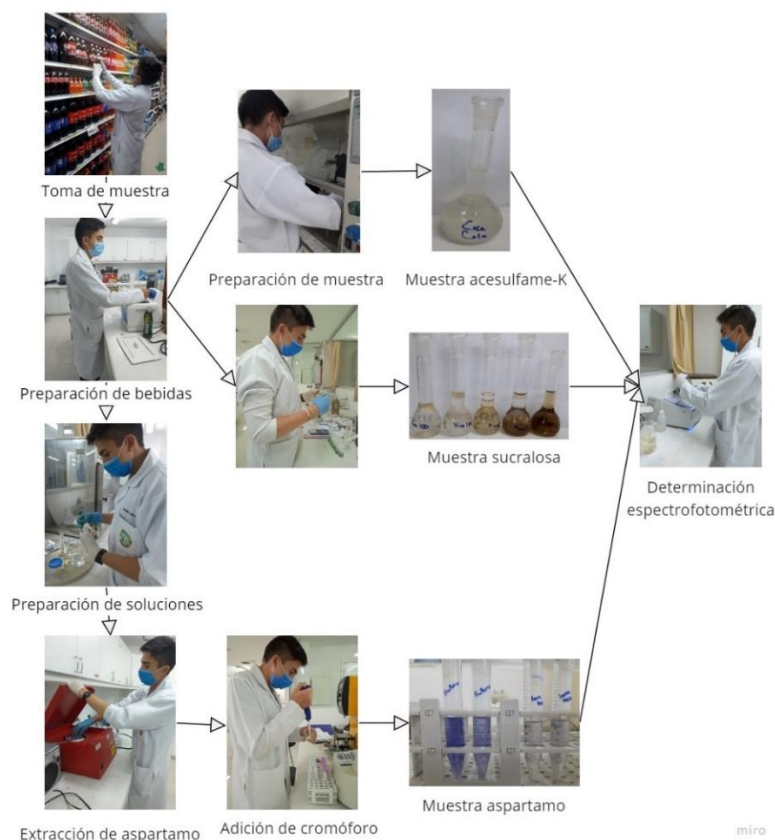
Product Name: Sucralose
analytical standard
Product Number: 90984
Batch Number: **BCCD3883**
Brand: Sigma-Aldrich
CAS Number: 56038-13-2
Formula: C₁₂H₁₉Cl₃O₈
Formula Weight: 397.63
Expiration Date: MAY 2023
Quality Release Date: 29 MAY 2020

TEST	SPECIFICATION	RESULT
APPEARANCE (COLOR)	COLORLESS OR WHITE	WHITE
APPEARANCE (FORM)	POWDER	POWDER
PURITY (HPLC AREA %)	≥ 98.0 %	99.0 %
SPECIFIC ROTATION (20/D)	84.0 - 88.0 DEGREES	85.0 DEGREES
CONCENTRATION	C=1 IN WATER	C=1 IN WATER
CARBON CONTENT	36.25 % (THEORY)	36.15 %
HYDROGEN CONTENT	4.82 % (THEORY)	4.91 %
PROTON NMR SPECTRUM	CONFORMS TO STRUCTURE	CONFORMS

Dr. Reinhold Schwenninger
Quality Assurance
Buchs, Switzerland

Fuente: SIGMA – ALDRICH

Anexo 4. Diagrama de flujo del procedimiento



Elaborado por: Daniel Salinas

Anexo 5. Medición de la absorbancia de aspartamo en una bebida azucarada (Coca Cola Light) de distintos cantones de la provincia de Tungurahua.

Lugar de muestreo	Abs (585 nm)	Concentración (µg/ml)	Concentración por factor de dilución (1/5)	Concentración (mg/L)
Ambato	0,065	22,35	111,75	111,75
	0,063	21,35	106,75	106,75
	0,068	23,85	119,25	119,25
Pelileo	0,064	21,85	109,25	109,25
	0,065	22,35	111,75	111,75
	0,067	23,35	116,75	116,75
Patate	0,064	21,85	109,25	109,25
	0,067	23,35	116,75	116,75
	0,063	21,35	106,75	106,75

Elaborado por: Daniel Salinas

Anexo 6. Medición de la absorbancia de acesulfame-K en una bebida azucarada (Pepsi Light) de distintos cantones de la provincia de Tungurahua.

Lugar de muestreo	Abs (227 nm)	Concentración (mg/ml)	Concentración (mg/L)
Ambato	0,024	0,0583	58,30
	0,023	0,0540	54,00
	0,024	0,0583	58,30
Pelileo	0,023	0,0540	54,00
	0,024	0,0583	58,30
	0,025	0,0626	62,60
Patate	0,026	0,0668	66,80
	0,025	0,0626	62,60
	0,025	0,0626	62,60

Elaborado por: Daniel Salinas

Anexo 7. Medición de la absorbancia de sucralosa en una bebida azucarada (Monster Energy) de distintos cantones de la provincia de Tungurahua.

Lugar de muestreo	Abs (610 nm)	Concentración (µg/ml)	Concentración por factor de dilución (1/25)	Concentración (mg/L)
Ambato	0,124	3,34	83,50	83,50
	0,118	3,10	77,50	77,50
	0,123	3,30	82,50	82,50
Pelileo	0,128	3,50	87,50	87,50
	0,133	3,70	92,50	92,50
	0,132	3,66	91,50	91,50
Patate	0,131	3,62	90,50	90,50
	0,128	3,50	87,50	87,50
	0,122	3,26	81,57	81,57

Elaborado por: Daniel Salinas

Anexo 8. Análisis de varianza con datos obtenidos en Excel

RESUMEN	Ambato	Pelileo	Patate	Total
Cuenta	3	3	3	9
Suma	337,75	337,75	332,75	1008,25
Promedio	112,58333333	112,58333333	110,91666667	112,027778
Varianza	39,58333333	14,58333333	27,08333333	21,0069444
Cuenta	3	3	3	9
Suma	170,6	174,9	192	537,5
Promedio	56,86666667	58,3	64	59,7222222
Varianza	6,16333333	18,49	5,88	18,3119444
Cuenta	3	3	3	9
Suma	243,5	271,5	259,57	774,57
Promedio	81,16666667	90,5	86,52333333	86,0633333
Varianza	10,33333333	7	20,65163333	25,9486
<i>Total</i>				
Cuenta	9	9	9	
Suma	751,85	784,15	784,32	
Promedio	83,53888889	87,12777778	87,14666667	
Varianza	599,2504861	568,9175694	426,34235	

Elaborado por: Daniel Salinas