



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**  
**FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y**  
**BIOTECNOLOGÍA**  
**CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA**



---

**Tema:** Validación del método analítico por espectrofotometría uv-vis para la determinación de edulcorantes en bebidas azucaradas consumidos en la provincia de Tungurahua.

---

Trabajo de Titulación, modalidad de 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:** Alison Abigail Castillo Mayorga

**Tutor:** Mg. Lander Vinicio Pérez Aldas

**Ambato-Ecuador**

**Marzo-2022**

## **APROBACIÓN DEL TUTOR**

Mg. Lander Vinicio Pérez Aldás

**CERTIFICA:**

Que el presente 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, 10 de febrero de 2022

Mg. Lander Vinicio Pérez Aldás

1802706596

**TUTOR**

## **DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD**

Yo, Alison Abigail Castillo Mayorga, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente trabajo de titulación, modalidad proyecto de investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera Bioquímica son absolutamente originales, auténticos y personales a excepción de las citas bibliográficas.



Alison Abigail Castillo Mayorga

CI: 1804387783

**AUTORA**

## **APROBACIÓN 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.

Para constancia firman:

---

**Presidente del Tribunal**

---

Mg. Orestes Darío López Hernández  
CI: 1754784864

---

Mg. Jeanette Verónica Carrera Cevallos  
CI: 1716192271

Ambato, 11 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, un 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.



Alison Abigail Castillo Mayorga

CI: 1804387783

**AUTORA**

## DEDICATORIA

A mis padres y hermana Elizabeth, Juan Carlos y Alejandra quienes han sido mi motor más importante y que gracias a su amor, paciencia y apoyo incondicional he logrado cumplir una meta más en mi vida. Gracias por inculcarme el ejemplo de esfuerzo y valentía.

A mis tíos Lilibiana y Sebastián quienes han sido un gran apoyo durante todo este proceso, que gracias a su presencia y su cariño me han impulsado a llegar a donde estoy. A mi abuelita Zoila y a toda mi familia que con sus oraciones y palabras de aliento me han acompañado y han hecho de mí una mejor persona.

Finalmente quiero dedicar esta tesis a mi novio Jonathan, quien ha sido un pilar fundamental en mi vida, quiero agradecer por el apoyo que he recibido en todo momento, por estar en mí incondicionalmente y por el amor brindado cada día.

## AGRADECIMIENTO

Quiero expresar mi gratitud en primera instancia a Dios, por permitirme llegar hasta este momento de mi vida, por su amparo y bendición en este largo camino.

Mi profundo agradecimiento a todo el personal que conforma el Laboratorio de Control y Análisis de Alimentos **LACONAL**, por permitirme realizar todo el proceso investigativo dentro de su establecimiento y también por el apoyo brindado.

De igual manera, mi gratitud para la Universidad Técnica de Ambato, para toda la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología, así como a mis profesores quienes con la enseñanza de sus valiosos conocimientos hicieron que pueda formarme como profesional.

Finalmente quiero expresar mi más grande y sincero agradecimiento al Químico **Lander Pérez**, principal colaborador durante todo este proceso, quien con su dirección, conocimiento, enseñanza y apoyo permitió el desarrollo de este trabajo.

## ÍNDICE GENERAL

APROBACIÓN DEL TUTOR.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD .....	iii
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO .....	iv
DERECHOS DE AUTOR.....	v
DEDICATORIA .....	vi
AGRADECIMIENTO.....	vii
ÍNDICE GENERAL.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS .....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiii
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
CAPÍTULO I.....	3
MARCO TEÓRICO.....	3
1.1. Antecedentes Investigativos.....	3
1.1.1. Edulcorantes en bebidas azucaradas.....	3
1.1.1.1. Edulcorantes intensivos sintéticos .....	3
• Acesulfame potásico (E950).....	3
• Aspartamo (E951).....	4
• Sucralosa (E955).....	4
1.1.2. Análisis Instrumental en edulcorantes comerciales.....	4
1.1.2.1. Espectrofotometría UV visible .....	5
1.1.2.2. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	6
1.1.3. Validación del método.....	6

1.1.3.1.	Linealidad .....	7
1.1.3.2.	Sensibilidad.....	7
1.1.3.3.	Límite de detección.....	8
1.1.3.4.	Límite de cuantificación .....	8
1.1.3.5.	Precisión.....	8
1.1.3.6.	Exactitud .....	9
1.1.3.7.	Incertidumbre.....	9
1.2.	Objetivos .....	10
1.2.1.	Objetivo General: .....	10
1.2.2.	Objetivos específicos:.....	10
CAPÍTULO II .....		11
METODOLOGÍA .....		11
2.1.	Localización geográfica de la investigación .....	11
2.2.	Condiciones ambientales .....	11
2.4.	Diseño experimental .....	12
2.5.	Materiales y equipos .....	14
2.5.1.	Materiales .....	14
2.5.2.	Equipos .....	14
2.6.	Preparación de soluciones estándar.....	15
2.7.	Preparación de soluciones buffer y soluciones del cromóforo .....	16
2.8.	Obtención de las curvas de calibración de Aspartamo, Acesulfame K y Sucralosa 16	
2.9.	Validación de curvas de calibración de soluciones estándar .....	16
2.9.1.	Curvas de calibración y linealidad.....	17
2.9.2.	Sensibilidad .....	17
2.9.3.	Límite de detección y cuantificación.....	17

2.9.4. Incertidumbre.....	18
2.9.5. Precisión .....	18
2.9.6. Repetibilidad.....	18
2.9.7. Reproducibilidad .....	18
2.10. Objetivos de validación de soluciones estándar .....	18
2.11. Planteamiento de la hipótesis .....	19
CAPÍTULO III.....	19
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	19
3.1. Análisis y discusión de resultados .....	19
3.1.1. Curvas de calibración de la solución estándar Sucralosa .....	20
3.1.2. Curvas de calibración de la solución estándar Aspartamo .....	29
3.1.3. Curvas de calibración de la solución estándar Acesulfame K.....	37
3.1.4. Análisis comparativo entre Espectrofotometría UV-Vis y Cromatografía HPLC	45
3.2. Verificación de la hipótesis.....	46
CAPÍTULO IV.....	47
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	47
4.1. Conclusiones .....	47
4.2. Recomendaciones.....	48
BIBLIOGRAFÍA.....	49
ANEXOS.....	54

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Parámetros aplicables para validar el método analítico por espectrofotometría Uv-vis.....	12
Tabla 2	Descripción del diseño experimental.....	13
Tabla 3	Especificaciones del espectrofotómetro 60S UV – Vis. ....	15
Tabla 4	Objetivos de validación de soluciones estándar de edulcorantes sintéticos. ....	18
Tabla 5	Resultados de curvas de calibración – sucralosa – curva 1.....	20
Tabla 6	Resultados de curvas de calibración – sucralosa – curva 2.....	22
Tabla 7	Resultados de curvas de calibración – sucralosa – curva 3.....	23
Tabla 8	Resultados de curvas de calibración – sucralosa – curva 4.....	24
Tabla 9	Resultados de curvas de calibración – sucralosa – curva 5.....	25
Tabla 10	Resumen de resultados de incertidumbres, reproducibilidad y repetibilidad del método para sucralosa .....	26
Tabla 11	Cálculo de incertidumbre para el método aplicado en la solución estándar sucralosa.....	27
Tabla 12	Validación del método aplicado para la determinación de sucralosa .....	28
Tabla 13	Resultados de curvas de calibración – aspartamo – curva 1 .....	29
Tabla 14	Resultados de curvas de calibración – aspartamo – curva 2.....	30
Tabla 15	Resultados de curvas de calibración – aspartamo – curva 3.....	31
Tabla 16	Resultados de curvas de calibración – aspartamo – curva 4.....	32
Tabla 17	Resultados de curvas de calibración – aspartamo – curva 5.....	33
Tabla 18	Resumen de resultados de incertidumbres, reproducibilidad y repetibilidad del método para aspartamo.....	34
Tabla 19	Cálculo de incertidumbre para el método aplicado en la solución estándar aspartamo .....	35
Tabla 12	Validación del método aplicado para la determinación de aspartamo .....	36
Tabla 21	Resultados de curvas de calibración – acesulfame K – curva 1.....	37

Tabla 22 Resultados de curvas de calibración – acesulfame K – curva 2.....	38
Tabla 23 Resultados de curvas de calibración – acesulfame K – curva 3.....	39
Tabla 24 Resultados de curvas de calibración – acesulfame K – curva 4.....	40
Tabla 25 Resultados de curvas de calibración – acesulfame K - curva 5 .....	41
Tabla 26 Resumen de resultados de incertidumbres, reproducibilidad y repetibilidad del método para acesulfame K .....	42
Tabla 27 Cálculo de incertidumbre para el método aplicado en la solución estándar acesulfame K.....	43
Tabla 28 Validación del método aplicado para la determinación de acesulfame K ..	44
Tabla 29 Comparación de parámetros de validación de métodos de análisis de obtención de curvas de calibración. ....	45

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Mapa de ubicación del laboratorio LACONAL. ....	11
Figura 2 Diagrama del proceso de validación de las curvas de calibración de las soluciones estándar.....	17
Figura 3 Obtención de resultados de absorbancia en el espectrofotómetro.....	19

## RESUMEN

La presente investigación se enfoca en la validación de las curvas de calibración del método de análisis por espectrofotometría UV Vis para la detección de edulcorantes sintéticos de sucralosa, aspartame y acesulfame K, el estudio está dirigido a posibles aplicaciones en bebidas azucaradas. Para el análisis se prepararon soluciones estándar con soluciones búfer y de cromóforo en concentraciones conocidas. El estudio se llevó a cabo en un espectrofotómetro UV Vis Thermo Scientific Serie Evolution 60S. Las curvas de calibración se confeccionaron con las concentraciones propuestas para cada solución estándar con lo cual se determinó el valor de R cuadrado, en todos los casos resultó mayor al 99 por ciento, a su vez, se determinaron las ecuaciones de calibración para cada solución. Se determinó una linealidad estadísticamente significativa para el proceso y, una sensibilidad de 0,0252; 0,0018 y 0,2332 para la sucralosa, aspartame y acesulfame K. El límite de detección calculado para cada solución estándar corresponde a 0,0547; 0,0249 microgramo por mililitro, 0,0459 miligramo por mililitro para la sucralosa, aspartame y acesulfame K, respectivamente; la incertidumbre expandida calculada fue de entre 7,44; 19,08 y 21,5 por ciento para la sucralosa, aspartame y acesulfame K, respectivamente. A su vez, mediante una revisión bibliográfica, se pudo determinar que la cromatografía HPLC es un método de detección de edulcorantes sintéticos de gran precisión con límites de detección muy sensibles, sin embargo, la espectrofotometría también es una buena opción para este tipo de análisis puesto que presenta una gran sensibilidad.

**Palabras clave:** Química analítica, métodos analíticos, espectrofotometría uv-vis, aditivos alimentarios, edulcorantes sintéticos, bebidas azucaradas.

## ABSTRACT

The present research focuses on the validation of the calibration curves of the UV Vis spectrophotometry analysis method for the detection of synthetic sweeteners of sucralose, aspartame and acesulfame K, the study is aimed at possible applications in sugary drinks. For the analysis, standard solutions were prepared with buffer and chromophore solutions in known concentrations. The study was carried out in a UV Vis Thermo Scientific Evolution 60S series spectrophotometer. The calibration curves were made with the proposed concentrations for each standard solution with which the value of R squared was determined, in all cases it was greater than 99 percent, in turn, the equations of calibration for each solution. A statistically significant linearity was determined for the process and a sensitivity of 0.0252; 0.0018 and 0.2332 for sucralose, aspartame and acesulfame K. The detection limit calculated for each standard solution corresponds to 0.0547, 0.0249 microgram per milliliter and 0.0459 milligram per milliliter for sucralose, aspartame, and acesulfame K, respectively; the calculated expanded uncertainty was between 7.44, 19.08 and 21.5 percent for sucralose, aspartame and acesulfame K, respectively. In turn, through a bibliographic review, it was possible to determine that HPLC chromatography is a method for detecting high precision synthetic sweeteners with very sensitive detection limits, however, spectrophotometry is also a good option for this type of analysis that presents a great sensitivity.

**Keywords:** Analytical chemistry, analytical methods, uv-vis spectrophotometry, food additives, synthetic sweeteners, sugary drinks.

# CAPÍTULO I

## MARCO TEÓRICO

### 1.1. Antecedentes Investigativos

#### 1.1.1. Edulcorantes en bebidas azucaradas

Los edulcorantes son compuestos ampliamente utilizados en la industria alimentaria como aditivos debido a su dulzor característico similar al que produce el azúcar. Existen edulcorantes calóricos y no calóricos, basados en el aporte energético que brindan dentro del requerimiento calórico de la dieta de cada individuo, el cual genera cierto impacto en la salud de los consumidores (**González, 2013**).

La sacarosa es uno de los componentes de gran consumo humano, por sus características perceptibles al gusto y por sus propiedades energéticas ya que cuenta con el 12% de carbohidratos en promedio como fuentes de energía. Actualmente, los edulcorantes son comercializados como sustitutos de la sacarosa en busca de catalogar ciertos alimentos como “saludables” entre los que más destacan las bebidas en general (**Martha, 2014**).

#### 1.1.1.1. Edulcorantes intensivos sintéticos

Los edulcorantes intensivos se caracterizan especialmente por su alto poder endulzante y su bajo aporte calórico, por lo que su único fin es el de endulzar. Además, no tienden a generar de cariogenicidad ni a afectar la reacción a la insulina. No obstante, estos son clasificados en naturales y sintéticos por su origen (**Barrios, 2020**).

Los edulcorantes intensivos sintéticos son producidos de forma artificial entre los que se destacan el acesulfame potásico, aspartamo, ciclamatos, sacarinas, sucralosa y advantamo.

- **Acesulfame potásico (E950)**

Este edulcorante posee un IDA de 15 mg/kg de peso corporal y es entre 130 a 200 veces más dulce que la sacarosa. Presenta rasgos amargos por lo que se suele combinar con otros edulcorantes como el aspartamo (E951) o el ciclamato (E952) como sinergismo cualitativo. No es tóxico, debido a que no puede ser metabolizado por el organismo además de que posee otras propiedades de interés en la industria alimentaria

como gran estabilidad y buena mezcla dentro de tratamientos y en procesos de almacenamiento. Por esta razón se lo puede encontrar presente en diversas bebidas gracias a su bajo aporte calórico (**Larrea & Hernando, 2021**).

- **Aspartamo (E951)**

Es una sustancia poco soluble en agua, poco estable a altas temperaturas y en presencia de pH inferiores a 3 y superiores a 6. Su sabor dulce no presenta rasgos amargos, ácidos o metálicos por lo que es un gran potenciador de otros edulcorantes. Su poder endulzante es 180 a 200 veces mayor al de la sacarosa y es mayormente usado en bebidas carbonatadas.

En la estructura de este compuesto se puede reconocer la presencia de un éster dipeptídico conformado por los aminoácidos L-ácido aspártico y L-fenilalanina. Al ingerirse, dentro del tracto intestinal se metaboliza a metanol, ácido aspártico y fenilalanina, este último puede generar problemas de salud para personas que padecen del trastorno hereditario conocido como Fenilcetonuria. A pesar de ello, la Autoridad Europea para la Seguridad Alimentaria (EFSA) ha señalado que el aspartamo posee una IDA de 40 mg/kg de peso corporal haciéndolo un aditivo estable y seguro de consumir siempre que se respeten los límites permitidos de aplicación (**Larrea & Hernando, 2021**).

- **Sucralosa (E955)**

La sucralosa se obtiene por halogenación selectiva de la sacarosa, haciéndola 600 a 700 veces más dulce, debido al reemplazo de tres grupos hidroxilo de la molécula por cloro en la reacción. Este es estable y resistente a las altas temperaturas y variaciones de pH por lo que es ideal para emplear en productos de larga duración y procesados como bebidas bajas en calorías. El organismo no lo puede metabolizar, sin embargo, el consumo en altas concentraciones puede generar alteraciones en la microbiota intestinal causando trastornos inflamatorios (**Larrea & Hernando, 2021**).

### **1.1.2. Análisis Instrumental en edulcorantes comerciales**

La espectrofotometría y la cromatografía son unos de los principales métodos analíticos que se utilizan en la identificación y determinación cuantitativa de

componentes disueltos en muestras de diversa índole, entre las que se destacan la espectrofotometría UV Visible y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

### **1.1.2.1. Espectrofotometría UV visible**

La espectrofotometría UV visible permite identificar sustancias químicas y determinar su concentración mediante la obtención de la absorbancia, lo que la hace una técnica ideal para procesos como cuantificación de contaminantes, análisis de aguas residuales y calidad de los alimentos.

La característica fundamental por la que se basa esta técnica es el estudio de la interacción que ocurre entre la radiación electromagnética y la materia. Es decir, mide la cantidad de luz que se absorbe con respecto a la longitud de onda establecida, la cual determinará la variación de color al descomponerse el rayo de luz cuando es reflejado por el objeto a analizar (**Alvares, 2021**).

El rango de longitud de onda aplicable para este tipo de espectrofotometría es de 190 a 780 nm. La concentración aproximada que debe tener una muestra a analizar es de 10 µg para lograr generar una absorbancia de 0,2 a 0,8 empleando una celda de 1 cm de espesor. Estas mediciones van a depender de las condiciones que se establezcan en el medio como la temperatura, pH, fuerza iónica para que la molécula pueda absorber la radiación a una determinada longitud de onda (**Díaz et al., 2010**).

- **Espectrofotómetro UV-Visible Thermo Scientific Serie GENESYS 60S**

Este instrumento permite hacer lecturas de forma rápida debido a que posee una pantalla de fácil manejo en donde se muestra la longitud de onda y las medidas realizadas en tiempo real, no requiere periodo de calentamiento por lo que está listo para su uso en cualquier momento. El espectrofotómetro cuenta con una lámpara de xenón que proporciona una iluminación fuerte y adecuada en toda la zona del ultravioleta, así mismo posee una geometría óptica de doble haz que permite obtener datos de calidad inmejorable en la zona ultravioleta/visible. La extensión de la longitud de onda se encuentra entre 190-1100 nm lo que le agrega sensibilidad a las diferentes aplicaciones en que se lo requiera. Además, este instrumento cuenta con una tecnología de barrido de longitud de onda que lo permite realizar a los 4.200 nm/minuto, lo cual posibilita medir los pequeños cambios en la absorbancia con exactitud, mientras que

el ancho de banda espectral de 5.0 nm lo hace ideal para mediciones de control de calidad (**Thermo, 2010**).

#### **1.1.2.2. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)**

Una de las técnicas más utilizadas en la industria alimentaria es la cromatografía líquida de alta performance (HPLC), debido a que posee un amplio rango de resolución para compuestos orgánicos, cuya metodología de separación es rápida y eficiente (**Romero et al., 2016**).

Esta técnica comprende dos fases líquidas, una móvil y una estacionaria, en las cuales se moviliza el analito dando paso a una afinidad diferencial entre estos y los componentes de la matriz (**Glorio, 2010**). El HPLC separa componentes de una mezcla con un poder de resolución, al elegir una columna de separación cromatográfica adecuada para mantener altos índices de pureza (**Legaz et al., 2011**).

Los equipos de HPLC se clasifican en integrados, cuyas partes se encuentran reunidas de tal forma que impiden el intercambio con otros componentes, y en modulares, en los que se integran los instrumentos acorde a las necesidades específicas de los operarios (**Quattrocchi et al., 1992**). De esta manera, el equipo influye en la precisión de los resultados, en la facilidad de manipulación, en el tiempo de separación y en la preparación o purificación de las muestras (**Ospina & Hernández, 2018**).

#### **1.1.3. Validación del método**

La metodología aplicada en un análisis debe someterse a estudios sistemáticos de laboratorio, para demostrar la proporción de los resultados que son reales y confiables tomando en cuenta la finalidad del trabajo realizado (**De Zan, 2011**). La validación del método analítico determina los parámetros de desempeño del equipo y del operario mediante la determinación del grado de confianza de los resultados evaluando criterios como linealidad, selectividad, sensibilidad del calibrado, límites de detección y cuantificación, precisión y exactitud (**Aguirre, 2017**). Dichos análisis se llevan a cabo mediante pruebas estadísticas y aplicación de expresiones matemáticas que arrojen datos que puedan ser comparables para determinar la calidad del método empleado (**Guerini, 2015**).

### 1.1.3.1. Linealidad

La linealidad corresponde a la proporción que existe entre la concentración del analito y su respuesta, lo cual se llevará a cabo mediante la determinación del rango lineal utilizando un gráfico de concentración de analito versus respuesta. El criterio de aceptación de la linealidad generalmente viene identificado como el coeficiente de correlación (r) de 0,99, aunque no necesariamente se debe alcanzar un valor alto para demostrar que existe una relación lineal (**UNODC, 2010**).

Respuesta del método:

$$y = a + bx$$

Pendiente:

$$b = \frac{\sum(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum(x_i - \bar{x})^2}$$

Estimador del Coeficiente de regresión lineal:

$$r = \frac{\sum X_i Y_i - \frac{\sum X_i \sum Y_i}{n}}{\sqrt{(\sum X_i^2 - \frac{(\sum X_i)^2}{n})(\sum Y_i^2 - \frac{(\sum Y_i)^2}{n})}}$$

Prueba t del coeficiente de regresión lineal:

$$t_r = \frac{|r|\sqrt{(n-2)}}{\sqrt{(1-r^2)}}$$

### 1.1.3.2. Sensibilidad

La sensibilidad del calibrado validará el instrumento utilizado mediante el cálculo de la sensibilidad que relacionará el valor de la pendiente de la curva de calibración global. Mientras mayor sea la pendiente, el método será considerado más sensible (**Rodríguez et al., 2012**).

$$S = \frac{\sum \text{Señal analítica}}{\sum \text{Concentraciones de analito}}$$

### 1.1.3.3. Límite de detección

Los límites de detección se basan en la detección de la menor concentración del analito que no necesariamente puede llegar a cuantificarse en las condiciones establecidas bajo un cierto grado de incertidumbre. Este parámetro se puede ver afectado en ocasiones por cambios menores en las condiciones como la pureza del reactivo, la temperatura, las condiciones instrumentales, etc (**Rodríguez et al., 2012**).

$$LDD = \frac{|a| + 3S_a}{b * \sqrt{n}}$$

### 1.1.3.4. Límite de cuantificación

El límite de cuantificación determina la menor concentración del analito cuantificable que presente una precisión y exactitud aceptables dentro de las condiciones establecidas. Este al generar un valor indicativo no deberá influir en la toma de decisiones con respecto al método (**Rodríguez et al., 2012**).

$$LDC = \frac{|a| + 10S_a}{b * \sqrt{n}}$$

### 1.1.3.5. Precisión

La precisión expresa el grado de dispersión que existe entre una serie de datos tomados a partir de una muestra en común. En condiciones de repetibilidad y reproducibilidad se refleja los errores aleatorios que se evidencian al usar el método a validar. Se habla de repetibilidad cuando las mediciones de las muestras las realiza el mismo analista con el mismo instrumento y en el mismo periodo de tiempo; cualquier cambio en estas condiciones demuestran que sólo serán reproducibles (**UNODC, 2010**).

Coefficiente de variación:

$$CV = \frac{S}{\bar{X}} * 100$$

Desviación estándar relativa:

$$DSR = \frac{S * 100}{\bar{X}}$$

### 1.1.3.6. Exactitud

La exactitud es el grado de concordancia que existe entre el resultado del ensayo frente a un valor de referencia. Este es el error sistemático que se genera entre el valor de la media y el verdadero, este debe ser expresado como el porcentaje de recuperación del analito añadido a la muestra **(Rodríguez et al., 2012)**.

Porcentaje de recuperación:

$$\%R = \frac{\bar{X}}{\hat{X}} * 100$$

### 1.1.3.7. Incertidumbre

La incertidumbre es un parámetro que permite cuantificar la variación de diferentes factores que pueden afectar en los resultados de las mediciones de un mesurando, lectura de datos o materiales de referencia. **(Herrera, 2020)** menciona que algunos de los parámetros que pueden aportar variabilidad en los resultados de medición de absorbancias empleando un Espectrofotómetro UV-VIS pueden ser factores asociados con la resolución, luz difusa, derivas y precisión del equipo, uso de filtros, densidades de las condiciones del experimento y densidades de los analitos.

## **1.2.Objetivos**

### **1.2.1. Objetivo General:**

Validar el método analítico por Espectrofotometría UV-VIS y comparar con la técnica de cromatografía para la determinación de edulcorantes en bebidas azucaradas en la provincia de Tungurahua.

### **1.2.2. Objetivos específicos:**

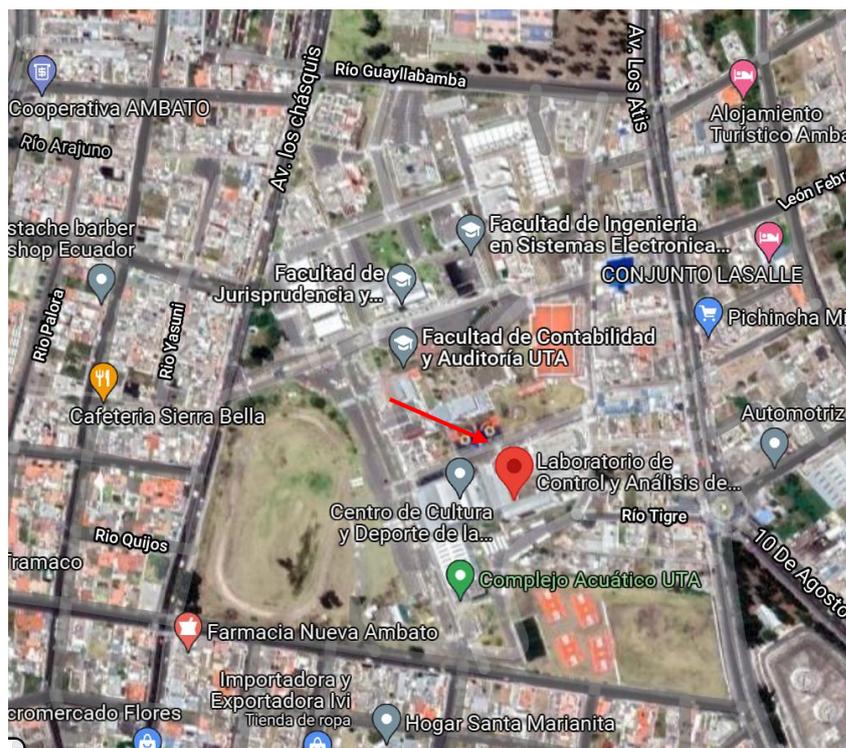
- Establecer la linealidad y sensibilidad del método para la medición de la respuesta del analito mediante curvas de calibración.
- Determinar el límite de detección y límite de cuantificación del método para determinar la mínima concentración del analito cuantificable y no cuantificable, mediante la aplicación de ecuaciones matemáticas.
- Calcular la precisión y exactitud del método para valorar la confiabilidad de los resultados mediante análisis matemáticos.
- Comparar las técnicas espectrofotométricas y cromatográficas para presencia de edulcorantes sintéticos en bebidas azucaradas.

## CAPÍTULO II

### METODOLOGÍA

#### 2.1. Localización geográfica de la investigación

La investigación se llevó a cabo en la ciudad de Ambato en la Universidad Técnica de Ambato en los laboratorios de la facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología. El laboratorio destinado a la fase experimental corresponde a LACONAL (Laboratorio de Control y Análisis de Alimentos).



**Figura 1** Mapa de ubicación del laboratorio LACONAL.

**Fuente:** (Google Maps, 2022).

#### 2.2. Condiciones ambientales

Las condiciones de experimentación dentro del laboratorio fueron:

Temperatura ambiente: 25°C

Humedad relativa: 85%

### 2.3. Parámetros aplicables para validar el método analítico por espectrofotometría Uv-vis

Para la validación de un método analítico, es importante determinar los parámetros que servirán para evaluar el desempeño del método. Para ello se definen las necesidades analíticas con sus respectivas características de desempeño relacionadas, así como se detalla en la Tabla 1 (Eurachem).

**Tabla 1** Parámetros aplicables para validar el método analítico por espectrofotometría Uv-vis.

<b>Elementos de las necesidades analíticas</b>	<b>Características de desempeño relacionadas</b>
<b>Respuesta cuantitativa</b>	Límite de detección
	Límite de cuantificación
<b>Precisión y exactitud de la respuesta y grado de incertidumbre permitido</b>	Exactitud
	Precisión de repetibilidad
	Precisión de reproducibilidad
	Incertidumbre
<b>Grado de sensibilidad del método</b>	Sensibilidad
<b>Proporción que existe entre la concentración del analito y su respuesta</b>	Linealidad

**Fuente:** (EURACHEM, 1998)

### 2.4. Diseño experimental

Este trabajo forma parte del proyecto de investigación “La Política Tributaria y el Consumo de Bebidas Azucaradas en el Ecuador”, cuya finalidad es determinar el impacto del consumo de bebidas azucaradas en la salud de la población. En relación con este estudio, el presente proyecto tiene como finalidad validar las curvas de calibración de soluciones estándar de edulcorantes sintéticos presentes en bebidas azucaradas que se comercializan en el país. A continuación, se describen los parámetros seleccionados para el trabajo experimental previamente aprobado por Consejo Universitario.

**Tabla 2** Descripción del diseño experimental.

<b>Parámetro</b>	<b>Objetivo</b>
<b>Linealidad</b>	Se obtuvo curvas de calibración de 3 soluciones estándar con los siguientes parámetros: <ul style="list-style-type: none"><li>- Sucralosa: Longitud de onda (obtenida del barrido) 610 nm 7 mediciones de concentraciones conocidas según la metodología propuesta</li><li>- Aspartamo: Longitud de onda (obtenida del barrido) 585 nm 8 mediciones de concentraciones conocidas según la metodología propuesta</li><li>- Acesulfame K: Longitud de onda (obtenida del barrido) 246 nm 7 mediciones de concentraciones conocidas según la metodología propuesta</li></ul>
<b>Límite de Detección</b>	Se obtuvieron a partir de las fórmulas de límite de detección con los resultados de las tres curvas de calibración.
<b>Límite de Cuantificación</b>	Se obtuvieron a partir de las fórmulas de límite de cuantificación con los resultados de las tres curvas de calibración.
<b>Exactitud</b>	Los resultados de absorbancia de las soluciones estándar se compararon con valores de referencia obtenidos de la búsqueda bibliográfica.
<b>Repetibilidad</b>	Se tomaron 4 grupos de mediciones adicionales para cada solución estándar en días diferentes bajo las mismas condiciones de las curvas de calibración.
<b>Reproducibilidad</b>	Se tomaron 4 mediciones adicionales por cada concentración conocida para cada una de las soluciones estándar.
<b>Incertidumbre</b>	Para la obtención de la incertidumbre expandida se combinaron los valores referentes a la incertidumbre de las mediciones, conocida también como repetibilidad, la incertidumbre del equipo y la repetibilidad de las mediciones, con un nivel de confianza del 95%.
<b>Tratamiento estadístico</b>	Para la validación de la hipótesis se llevó a cabo un análisis ANOVA.

## **2.5. Materiales y equipos**

### **2.5.1. Materiales**

- **Reactivos**
  - Sucralosa (Lot #BCCD3883)
  - Aspartamo (Lot #LRAC7356)
  - Acesulfame K (Lot #BCCF4723)
  - Agua destilada
  - Ácido acético
  - Acetato de sodio
  - Acetonitrilo
  - Etanol absoluto
  - Ninhidrina
  - Tampón fosfato
  - Permanganato de potasio
  - Hidróxido de sodio
- **Instrumental**
  - Tubos de ensayo
  - Matraz
  - Balón volumétrico
  - Vaso de precipitación
  - Pipeta
  - Varilla de agitación

### **2.5.2. Equipos**

Balanza analítica BOECO BBL – rango de pesaje de muestras (0,1 mg – 6 kg)  
**(BOECO, 2004).**

Equipo espectrofotométrico UV – Visible, marca Thermo Scientific, Serie Evolution 60S. En la tabla 3 se presentan las especificaciones técnicas del equipo.

**Tabla 3** Especificaciones del espectrofotómetro 60S UV – Vis.



<b>Diseño óptico</b>	Doble haz con detector interno de referencia
<b>Ancho de banda espectral</b>	1,0 nm
<b>Fuente de luz</b>	Lámpara flash de xenón
<b>Detector</b>	Doble fotodiodos de silicio
<b>Longitud de onda</b>	190 – 1100 nm
<b>Exactitud</b>	± 1,0 nm
<b>Repetibilidad</b>	± 0,5 nm
<b>Incertidumbre</b>	± 0,0003 A
<b>Velocidad de barrido</b>	4200 nm/min

**Fuente:** (Thermo, 2010) y |(Cáceres Núñez, 2016).

## 2.6.Preparación de soluciones estándar

Para preparar las soluciones estándar de aspartamo, se siguió la metodología descrita por (Kabirul, 2017), para ello se disolvió 25 mg de aspartamo en 25 mL de agua destilada hasta formar una solución de 1 mg/mL, posteriormente se prepararon 6 diluciones seriadas con concentraciones entre 5 µg/mL y 50 µg/mL. De igual forma se disolvió 25 mg de acesulfame K en 25 mL de agua destilada; a continuación, se realizaron 6 diluciones a concentraciones conocidas (Sastry et al., 1995). Finalmente, para la solución estándar de sucralosa se disolvió 25 mg en 25 mL de acetonitrilo, a partir de allí se realizaron 6 diluciones con concentraciones desde 4 µg/mL a 16 µg/mL (Rasha et al., 2010).

## **2.7.Preparación de soluciones buffer y soluciones del cromóforo**

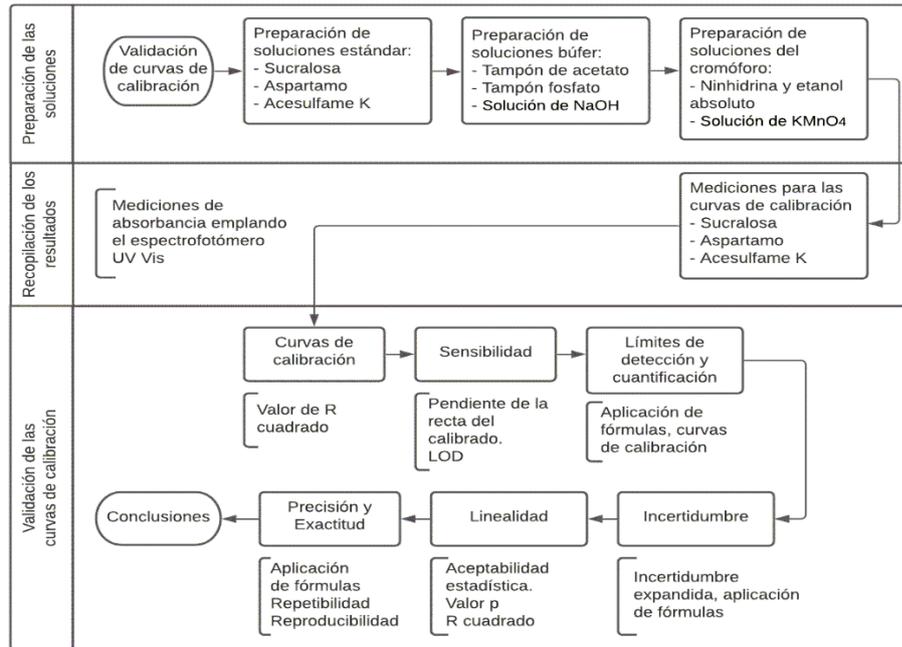
Al trabajar con aspartamo se preparó un tampón de acetato y para ello se mezclarán 50 mL de ácido acético (0,2 M) con 50 mL de acetato de sodio (0,2 M) hasta ajustar un pH de 3,5. Para el cromóforo se disolvió 0,4 g de ninhidrina con 10 mL de etanol absoluto (**Kabirul, 2017**). Para acesulfame K se preparó un tampón fosfato donde se mezclaron 61,2 mL de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ( $0,06 \text{ mol L}^{-1}$ ) con 38,8 mL de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $0,06 \text{ mol L}^{-1}$ ) hasta ajustar un pH de 7,0 (**Sastry et al., 1995**). En cuanto a la sucralosa se preparó una solución de  $\text{KMnO}_4$  ( $5 \times 10^{-3} \text{ M}$ ) la cual actuará como cromóforo y una solución de NaOH (0,5 M) para ajustar el pH (**Rasha et al., 2010**).

## **2.8.Obtención de las curvas de calibración de Aspartamo, Acesulfame K y Sucralosa**

Para realizar la curva de calibración de aspartame, se midieron las absorbancias a 585 nm de las 6 diluciones preparadas con anterioridad añadiendo 0,5 mL del buffer y 2 mL ninhidrina, y se sometieron a baño maría por 20 min, luego se diluyó a 10 mL (**Lau et al., 1988**). Para acesulfame K se añadió a las diluciones estándar 2 mL del tampón fosfato y aforó hasta 10 mL con agua destilada. Se agitó por 2 min y se realizó la lectura a 246 nm para trazar la curva de calibración (**Sastry et al., 1995**). Finalmente, a las diluciones estándar de sucralosa se añadió 3 mL de solución  $\text{KMnO}_4$  ( $5 \times 10^{-3} \text{ M}$ ) y 1 mL de NaOH (0,5 M) hasta obtener 10 mL. Se agitó las mezclas y se diluyó a volumen con agua destilada, se midió la absorbancia en los primeros 30 min a 246 nm (**Rasha et al., 2010**).

## **2.9.Validación de curvas de calibración de soluciones estándar**

Para la validación de las curvas de calibración de las soluciones estándar se emplearon los parámetros descritos en el capítulo 1 siguiendo el proceso de la figura 1 en donde se hace referencia a los parámetros medidos para la comprobación de los resultados.



**Figura 2** Diagrama del proceso de validación de las curvas de calibración de las soluciones estándar.

### 2.9.1. Curvas de calibración y linealidad

Para este parámetro se emplearon las curvas de calibración, mediante las cuales se puso a elaborar una regresión lineal verificando el valor de R cuadrado y la pendiente de la recta. Los datos de significancia estadística de linealidad fueron corroborados mediante una curva comparativa con valores de referencia de otras investigaciones de soluciones estándar similares, para lo cual se verificó la aceptabilidad estadística con el valor de p.

### 2.9.2. Sensibilidad

Este parámetro se determinó a través de la pendiente de la curva de calibración de las soluciones estándar; a su vez, este parámetro se pudo comparar con el límite de detección que permitió obtener una idea más general del funcionamiento del equipo de medición.

### 2.9.3. Límite de detección y cuantificación

Estos valores se determinaron aplicando las ecuaciones descritas en los antecedentes investigativos, en función de los datos obtenidos en las curvas de calibración, de donde se extrajo puntos relevantes de las mediciones de los analitos.

#### 2.9.4. Incertidumbre

En este análisis se tomó en cuenta la incertidumbre expandida que incluye el factor de cobertura para un nivel de confianza del 95%, además de una incertidumbre combinada referente al equipo, repetibilidad y reproducibilidad de cada solución estándar; para ello se siguió la formulación descrita en cada tabla.

#### 2.9.5. Precisión

Para este parámetro se verificó el nivel de precisión con respecto a un valor de referencia obtenido bibliográficamente para cada solución estándar, también se conoce como el porcentaje de recuperación.

#### 2.9.6. Repetibilidad

Se hicieron cinco repeticiones de las mediciones de absorbancia para cada concentración por cada solución estándar.

#### 2.9.7. Reproducibilidad

Cada análisis se llevó a cabo en diferentes días en donde se tomaron las mediciones de cada solución estándar bajo las mismas condiciones iniciales.

#### 2.10. Objetivos de validación de soluciones estándar

Luego de definir las condiciones de análisis de los resultados de las mediciones de las soluciones estándar, se plantearon los siguientes objetivos para definir los parámetros de verificación de la validación del método propuesto para soluciones estándar de edulcorantes sintéticos.

**Tabla 4** Objetivos de validación de soluciones estándar de edulcorantes sintéticos.

Parámetro	Objetivo
<b>Linealidad</b>	Las curvas de calibración y regresión lineal presentan un $R^2 \geq 0,99$
<b>Límite de Detección</b>	$LOD \leq 0,08 \text{ mg/mL}$
<b>Límite de Cuantificación</b>	$LOC \leq 0,1 \text{ mg/mL}$
<b>% Sr Precisión repetibilidad</b>	5%
<b>% SR Precisión reproducibilidad</b>	10%
<b>Sesgo</b>	10%

---

**2.11. Planteamiento de la hipótesis**

Debido a que el tema planteado corresponde a la validación del método analítico, uno de los parámetros principales para este fin, es la precisión del método relacionada con la variación entre las mediciones de las absorbancias, para ello se tomó en cuenta un análisis ANOVA para verificar si existen diferencias significativas en las medias de dos o más grupos diferentes.

La hipótesis para verificarse por cada solución estándar corresponde a:

*$H_0 =$  Todas las medias son iguales*

*$H_1 =$  No todas las medias son iguales*

*Nivel de significancia  $\alpha = 0,05$*

## CAPÍTULO III

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Análisis y discusión de resultados



**Figura 3** Obtención de resultados de absorbancia en el espectrofotómetro

En la figura 3 se presenta la ejecución del proceso de preparación de soluciones estándar y de medición de los resultados de absorbancia obtenida en el espectrofotómetro, los valores medidos se muestran en las siguientes tablas donde se presentan las curvas de calibración.

### 3.1.1. Curvas de calibración de la solución estándar Sucralosa

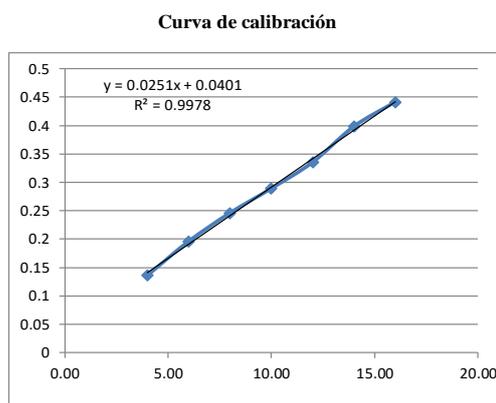
**Tabla 5** Resultados de curvas de calibración – sucralosa – curva 1

INCERTIDUMBRE DE CALIBRACION INSTRUMENTAL - SUCRALOSA 610 nm								
Curva 1	$u_{cal. instr.} = \sqrt{(u_{Sx,y})^2 + (Estabilidad eq.)^2 + (u_{resolución})^2}$				$u_{Sx,y} = \frac{Sx,y}{\sqrt{3}}$			
Concentración µg/L	Absorbancia	Absorbancia calculada	Concentración calculada	u Sx,y %	u estabilidad del equipo, %	u resolución, %	u, %	U, %
4.00	0.136	0.141	3.81					
6.00	0.196	0.191	6.20	2.092	0.741	0.278	2.236	4.473
8.00	0.246	0.241	8.19	1.584	0.561	0.210	1.693	3.386
10.00	0.289	0.292	9.90	1.310	0.464	0.174	1.401	2.801
12.00	0.335	0.342	11.73	1.106	0.392	0.147	1.182	2.364
14.00	0.398	0.392	14.23	0.911	0.323	0.121	0.974	1.948
16.00	0.441	0.442	15.94	0.813	0.288	0.108	0.870	1.739

pendiente	0.0251	0.0401	intercepto
desv. Pendiente	0.0005	0.0057	desv. Intercepto
R2	0.9978	0.0056	error típico
		0.1297	u error típ. mg/l

VALIDACION			
m	0.0251	m	0.0251
lo	0.0401	lo	0.0401
Sx,y	0.0056	Sx,y	0.0056

Reproducibilidad del equipo	Resolución equipo	0.002	0.0015
u Reproducibil. mg/l	Resolución mg/l	0.04593	0.05966
factor de coherencia (k)	2 u resolución		0.01722



En la tabla 5 de resultados de curvas de calibración se observan los valores obtenidos de la absorbancia para cada concentración de 4 a 16 µg/mL. El análisis determina un comportamiento lineal con un R cuadrado de 99,78% que se ajusta muy bien a los datos recolectados, se puede determinar que la curva de calibración es aceptable ya que cumple con el objetivo de validación debido a que esta es una representación gráfica de una propiedad cuantitativa en función de otra, en este caso, la concentración con respecto a la absorbancia, se necesita establecer una alta exactitud y confiabilidad para demostrar la validez del modelo de cálculo aplicado (Fajardo et al., 2018) . Se observa que a medida que aumenta la concentración aumenta la absorbancia. Con estos resultados se obtuvo una sensibilidad calculada en base a los datos de entrada:

$$S = \frac{0,441 - 0,136}{16 - 4}$$

$$S = 0,025$$

También se determinó el límite de detección empleando la siguiente fórmula, propuesta en (EURACHEM, 1998):

$$LoD = \bar{x}_{blanco} + 3s$$

Donde:

*LoD*:límite de detección

$\bar{x}_{blanco}$ :media de las mediciones

*s*: desviación estándar de las mediciones

Para el caso del límite de cuantificación se aplicó la siguiente fórmula, propuesta en (EURACHEM, 1998):

$$LoQ = \bar{x}_{blanco} + 10s$$

Donde:

*LoQ*:Límite de cuantificación

Aplicando las fórmulas se obtuvo un límite de detección de 0,0556 µg/mL y un límite de cuantificación de 0,0747 µg/mL

**Tabla 6** Resultados de curvas de calibración – sucralosa – curva 2

**INCERTIDUMBRE DE CALIBRACION INSTRUMENTAL - SUCRALOSA 610 nm**

Curva 2

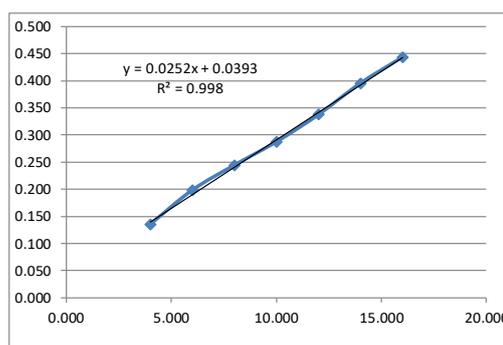
$$u_{cal. instr.} = \sqrt{(u_{Sx,y})^2 + (Estabilidad eq.)^2 + (u_{resolución})^2}$$

$$u_{Sx,y} = \frac{S_{x,y}}{\sqrt{3}}$$

Concentración µg/L	Absorbancia	Absorbancia calculada	Concentración calculada	u Sx,y %	u estabilidad del equipo, %	u resolución, %	u, %	U, %
4.000	0.135	0.140	3.797					
6.000	0.198	0.191	6.298	1.933	0.728	0.273	2.083	4.167
8.000	0.244	0.241	8.123	1.498	0.564	0.212	1.615	3.230
10.000	0.287	0.291	9.830	1.238	0.466	0.175	1.335	2.669
12.000	0.337	0.342	11.814	1.030	0.388	0.145	1.111	2.221
14.000	0.395	0.392	14.116	0.862	0.325	0.122	0.929	1.859
16.000	0.443	0.442	16.021	0.760	0.286	0.107	0.819	1.638

Curva de calibración

pendiente	0.0252	0.0393	intercepto
desv. Pendiente	0.0005	0.0054	desv. Intercepto
R2	0.9980	0.0053	error típico
		0.1217	u error típ. mg/l
<b>VALIDACION</b>			
m	0.0252	m	0.0252
lo	0.0393	lo	0.0393
Sx,y	0.0053	Sxy	0.0053
<hr/>			
Reproducibilidad ad equipo	0.002	Resolución equipo, abs	0.0015
u			
Reproducibil. mg/l	0.04583	Resolución mg/l	0.05953
factor de coberura (k)	2	u resolución, m	0.01719



En la tabla 6 de resultados de curvas de calibración se observan los valores obtenidos de la absorbancia para cada concentración de 4 a 16 µg/mL. El análisis determina un comportamiento lineal con un R cuadrado de 99,80% que se ajusta muy bien a los datos recolectados. Se observa que a medida que aumenta la concentración aumenta la absorbancia. Con estos resultados se obtuvo una sensibilidad calculada en base a los datos de entrada:

$$S = 0,0252$$

También se determinó el límite de detección y de cuantificación, empleando las fórmulas propuestas en (EURACHEM, 1998), con lo cual se obtuvo:

$$LoD = 0,0549 \mu\text{g/mL}$$

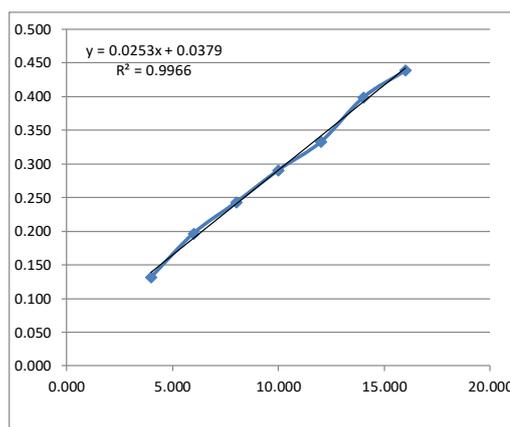
$$LoQ = 0,0741 \mu\text{g/mL}$$

**Tabla 7** Resultados de curvas de calibración – sucralosa – curva 3

INCERTIDUMBRE DE CALIBRACION INSTRUMENTAL - SUCRALOSA 610 nm								
Curva 3								
$u_{cal. instr.} = \sqrt{(u_{Sx,y})^2 + (Estabilidad eq.)^2 + (u_{resolucion})^2}$					$u_{Sx,y} = \frac{S_{x,y}}{\sqrt{3}}$			
Concentración µg/L	Absorbancia	Absorbancia calculada	Concentración calculada	u Sx,y %	u estabilidad del equipo, %	u resolucion, %	u, %	U, %
4.000	0.132	0.139	3.72					
6.000	0.197	0.190	6.30	2.533	0.726	0.272	2.649	5.298
8.000	0.243	0.240	8.12	1.965	0.563	0.211	2.055	4.110
10.000	0.291	0.291	10.02	1.592	0.456	0.171	1.665	3.331
12.000	0.333	0.341	11.68	1.366	0.391	0.147	1.428	2.857
14.000	0.399	0.392	14.29	1.116	0.320	0.120	1.167	2.334
16.000	0.439	0.442	15.87	1.005	0.288	0.108	1.051	2.102

<b>pendiente</b>	0.0253	<b>0.0379 intercepto</b>
<b>desv. Pendiente</b>	0.0007	<b>0.0071 desv. Intercepto</b>
<b>R2</b>	0.9966	<b>0.0070 error típico</b>
		<b>0.1595 u error típ. mg/l</b>
VALIDACION		
<b>m</b>	0.0253	<b>m</b> 0.0253
<b>lo</b>	0.0379	<b>lo</b> 0.0379
<b>Sx,y</b>	0.0070	<b>Sxy</b> 0.0070
<b>Reproducibilidad ad equipo</b>	<b>Resolución equipo</b> 0.002	<b>0.0015</b>
<b>u Reproducibil. mg/l</b>	<b>Resolución mg/l</b> 0.04570	<b>0.05936</b>
<b>factor de coberura (k)</b>	<b>2 u resolución</b>	<b>0.01714</b>

Curva de calibración



En la tabla 7 de resultados de curvas de calibración se observan los valores obtenidos de la absorbancia para cada concentración de 4 a 16 µg/mL. El análisis determina un comportamiento lineal con un R cuadrado de 99,66% que se ajusta muy bien a los datos recolectados. Se observa que a medida que aumenta la concentración aumenta la absorbancia. Con estos resultados se obtuvo una sensibilidad calculada en base a los datos de entrada:

$$S = 0,0253$$

También se determinó el límite de detección y de cuantificación, empleando las fórmulas propuestas en (EURACHEM, 1998), con lo cual se obtuvo:

$$LoD = 0,0536 \text{ µg/mL}$$

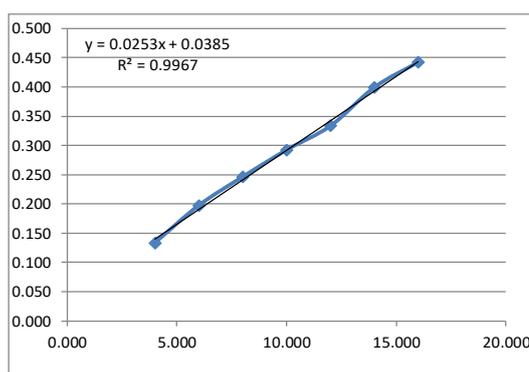
$$LoQ = 0,0729 \text{ µg/mL}$$

**Tabla 8** Resultados de curvas de calibración – sucralosa – curva 4

INCERTIDUMBRE DE CALIBRACION INSTRUMENTAL - SUCRALOSA 610 nm								
Curva4								
$u_{cal. instr.} = \sqrt{(u_{Sx,y})^2 + (Estabilidad eq.)^2 + (u_{resolucion})^2}$ $u_{Sx,y} = \frac{S_{x,y}}{\sqrt{3}}$								
Concentración $\mu\text{g/L}$	Absorbancia	Absorbancia calculada	Concentración calculada	$u_{Sx,y}$ %	$u_{estabilidad del equipo}$ %	$u_{resolucion}$ %	$u$ , %	$U$ , %
4.000	0.133	0.140	3.73					
6.000	0.197	0.190	6.26	2.523	0.729	0.273	2.640	5.280
8.000	0.246	0.241	8.19	1.927	0.556	0.209	2.017	4.033
10.000	0.292	0.292	10.01	1.577	0.456	0.171	1.651	3.302
12.000	0.333	0.342	11.63	1.358	0.392	0.147	1.421	2.842
14.000	0.399	0.393	14.24	1.109	0.320	0.120	1.161	2.322
16.000	0.442	0.444	15.94	0.991	0.286	0.107	1.037	2.074

**Curva de calibración**

<b>pendiente</b>	0.0253	0.0385	<b>intercepto</b>
<b>desv. Pendiente</b>	0.0007	0.0070	<b>desv. Intercepto</b>
<b>R2</b>	0.9967	0.0069	<b>error típico</b>
		0.1579	<b>u error típ. mg/l</b>
<b>VALIDACION</b>			
<b>m</b>	0.0253	<b>m</b>	0.0253
<b>lo</b>	0.0385	<b>lo</b>	0.0385
<b>Sx,y</b>	0.0069	<b>Sxy</b>	0.0069
<b>Reproducibilidad ad equipo</b>	0.002	<b>Resolución equipo</b>	0.0015
<b>u Reproducibil. mg/l</b>	0.04560	<b>Resolución mg/l</b>	0.05924
<b>factor de coberura (k)</b>	2	<b>u resolución</b>	0.01710



En la tabla 8 de resultados de curvas de calibración se observan los valores obtenidos de la absorbancia para cada concentración de 4 a 16  $\mu\text{g/mL}$ . El análisis determina un comportamiento lineal con un R cuadrado de 99,67% que se ajusta muy bien a los datos recolectados. Se observa que a medida que aumenta la concentración aumenta la absorbancia. Con estos resultados se obtuvo una sensibilidad calculada en base a los datos de entrada:

$$S = 0,0253$$

También se determinó el límite de detección y de cuantificación, empleando las fórmulas propuestas en (EURACHEM, 1998), con lo cual se obtuvo:

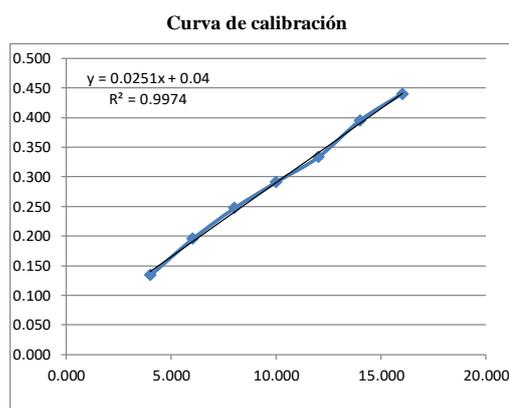
$$LoD = 0,0542 \mu\text{g/mL}$$

$$LoQ = 0,0736 \mu\text{g/mL}$$

**Tabla 9** Resultados de curvas de calibración – sucralosa – curva 5

INCERTIDUMBRE DE CALIBRACION INSTRUMENTAL - SUCRALOSA 610 nm								
Curva 5								
$u_{cal. instr.} = \sqrt{(u_{Sx,y})^2 + (Estabilidad\ eq.)^2 + (u_{resolución})^2}$					$u_{Sx,y} = \frac{S_{x,y}}{\sqrt{3}}$			
Concentración µg/L	Absorbancia	Absorbancia calculada	Concentración calculada	u Sx,y %	u estabilidad del equipo, %	u resolución, %	u, %	U, %
4.000	0.134	0.140	3.75					
6.000	0.195	0.190	6.18	2.240	0.745	0.279	2.377	4.755
8.000	0.247	0.241	8.26	1.677	0.558	0.209	1.780	3.560
10.000	0.291	0.291	10.01	1.383	0.460	0.173	1.468	2.936
12.000	0.333	0.341	11.69	1.185	0.394	0.148	1.258	2.515
14.000	0.395	0.391	14.16	0.978	0.325	0.122	1.038	2.076
16.000	0.440	0.441	15.95	0.868	0.289	0.108	0.921	1.842

<b>pendiente</b>	0.0251	<b>intercepto</b>	0.0400
<b>desv. Pendiente</b>	0.0006	<b>desv. Intercepto</b>	0.0061
<b>R2</b>	0.9974	<b>error típico</b>	0.0060
		<b>u error típ. mg/l</b>	0.1385
VALIDACION			
<b>m</b>	0.0251	<b>m</b>	0.0251
<b>lo</b>	0.0400	<b>lo</b>	0.0400
<b>Sx,y</b>	0.0060	<b>Sxy</b>	0.0060
<b>Reproducibilid ad equipo</b>	0.002	<b>Resolución equipo</b>	0.0015
<b>u Reproducibil. mg/l</b>	0.04606	<b>Resolución mg/l</b>	0.05983
<b>factor de coberura (k)</b>	2	<b>u resolución</b>	0.01727



En la tabla 9 de resultados de curvas de calibración se observan los valores obtenidos de la absorbancia para cada concentración de 4 a 16 µg/mL. El análisis determina un comportamiento lineal con un R cuadrado de 99,74% que se ajusta muy bien a los datos recolectados. Se observa que a medida que aumenta la concentración aumenta la absorbancia. Con estos resultados se obtuvo una sensibilidad calculada en base a los datos de entrada:

$$S = 0,0251$$

También se determinó el límite de detección y de cuantificación, empleando las fórmulas propuestas en (EURACHEM, 1998), con lo cual se obtuvo:

$$LoD = 0,0555 \mu\text{g/mL}$$

$$LoQ = 0,0745 \mu\text{g/mL}$$

En las siguientes tablas se muestra un resumen del tratamiento estadístico de las curvas de calibración obtenidas para la sucralosa, los valores del análisis ANOVA se encuentran en los anexos.

**Tabla 10** Resumen de resultados de incertidumbres, reproducibilidad y repetibilidad del método para sucralosa

RESUMEN										
Pendiente, Intercepto al eje e Incertidumbre de calibración instrumental por curva										
	m	Validacion	lo	Validacion	u cal. Instrum.	Validacion	Sxy	Validacion		
<b>Curva 1</b>	0.0251	ok	0.0401	ok	4.4728	ok	0.0056	ok		
<b>Curva 2</b>	0.0252	ok	0.0393	ok	4.1666	ok	0.0053	ok		
<b>Curva 3</b>	0.0253	ok	0.0379	ok	5.2983	ok	0.007	ok		
<b>Curva 4</b>	0.0253	ok	0.0385	ok	5.2803	ok	0.0069	ok		
<b>Curva 5</b>	0.0251	ok	0.0400	ok	4.7546	ok	0.006	ok		
<b>Promedio</b>	0.0252		0.0392		4.7945		0.0062			
<b>desv.estand</b>	0.0001		0.0010		0.4973		0.0008			
<b>Máximo</b>	0.0253		0.0401				0.0070			
<b>mínimo</b>	0.0251		0.0379		4.1666		0.0053			
Precisión por Repetibilidad y Reproducibilidad										
	Valor nominal	Conc. promedio	Matriz	SR	% SR	Sr	% Sr	Sesgo	% Sesgo	% Recuperación
<b>Nivel1</b>	0.14	0.1328	4 µg/mL	0.0019	1.4386	0.0019	1.4243	0.0072	5.39	95
<b>Nivel2</b>	0.19	0.1958	6 µg/mL	0.0016	0.8259	0.0015	0.7676	-0.0054	2.78	103
<b>Nivel3</b>	0.24	0.2456	8 µg/mL	0.0044	1.7812	0.0043	1.7373	-0.0048	1.94	102
<b>Nivel4</b>	0.29	0.2899	10 µg/mL	0.0014	0.4809	0.0013	0.4550	0.0015	0.51	99
<b>Nivel5</b>	0.34	0.3345	12 µg/mL	0.0019	0.5773	0.0018	0.5348	0.0071	2.13	98
<b>Nivel6</b>	0.39	0.3966	14 µg/mL	0.0022	0.5434	0.0020	0.5055	-0.0046	1.16	101
<b>Nivel7</b>	0.44	0.4417	16 µg/mL	0.0027	0.6060	0.0025	0.5719	0.0005	0.12	100
<b>Máximo</b>				0.0044	1.7812	0.0043	1.7373	0.0000	5.39	
Incertidumbres de calibración instrumental de los patrones de calibración de las curvas de calibración										
	curva 1	curva 2	curva 3	curva 4	curva 5	Maximo				
<b>PC1</b>	4.47	4.17	5.30	5.28	4.75	5.30				
<b>PC2</b>	3.39	3.23	4.11	4.03	3.56	4.11				
<b>PC3</b>	2.80	2.67	3.33	3.30	2.94	3.33				
<b>PC4</b>	2.36	2.22	2.86	2.84	2.52	2.86				
<b>PC5</b>	1.95	1.86	2.33	2.32	2.08	2.33				
<b>PC6</b>	1.74	1.64	2.10	2.07	1.84	2.10				

En la tabla 10 se observan los porcentajes de repetibilidad, reproducibilidad y sesgo, y se determina que se encuentran dentro de los límites establecidos por los objetivos planteados.

**Tabla 11** Cálculo de incertidumbre para el método aplicado en la solución estándar sucralosa

CALCULO INCERTIDUMBRE DEL MÉTODO DE ENSAYO								
$U = k * u + CNR$								
$u = \sqrt{(u \text{ lectura instrumental})^2 + (u \text{ resolución})^2 + SR^2}$								
lectura instrumental = calibración instrumental								
Niveles	Matriz	Conc. Promedio mg/l	u cal instru, %	u res, %	SR, %	u método, %	Sesgo	U método, %
Nivel1	4 µg/mL	0.13	2.65	2.17	1.44	3.72	0.01	7.44
Nivel2	6 µg/mL	0.20	2.06	1.47	0.83	2.66	-0.01	5.33
Nivel3	8 µg/mL	0.25	1.67	1.18	1.78	2.71	0.00	5.42
Nivel4	10 µg/mL	0.29	1.43	1.00	0.48	1.81	0.00	3.61
Nivel5	12 µg/mL	0.33	1.17	0.86	0.58	1.56	0.01	3.13
Nivel6	14 µg/mL	0.40	1.05	0.73	0.54	1.39	0.00	2.78
Nivel7	16 µg/mL	0.44	0.00	0.65	0.61	0.89	0.00	1.78
Máximo								7.44

En la tabla 11 se observa el sesgo obtenido en cada nivel de medición de la sucralosa y la incertidumbre del método, el máximo valor obtenido es de 7,44% y se encuentra dentro de los objetivos planteados de validación. Así también, el sesgo calculado es mínimo, oscila entre - 0,01 y 0,01 valores muy cercanos a la medición esperada por cada nivel.

En la tabla 12 se presenta un resumen del cumplimiento de los objetivos de validación para el método de análisis y determinación de soluciones estándar, en este caso, se presentan los resultados de la sucralosa con una longitud de onda de 610 nm y un rango de trabajo de 4 a 16 µg/mL con un porcentaje de incertidumbre de 7,44% y una exactitud dentro de los límites calculados, como se presenta en la tabla.

**Tabla 12** Validación del método aplicado para la determinación de sucralosa

**a. VERIFICACION DE CUMPLIMIENTO DE OBJETIVOS Y RESULTADOS**

Parámetro	Objetivo	Resultado	Cumple/ No cumple
Linealidad/Función respuesta	mínimo 0,99	0.997	cumple
Límite de detección	0.08	0.0547	cumple
Límite de cuantificación	0.1	0.0740	cumple
% Sr Precisión repetibilidad	5.00%	1.74	cumple
% SR Precisión Reproducibilidad	10.00%	1.78	cumple
Sesgo	10.00%	5.39	cumple
% U	10.00%	7.44	cumple

**Incertidumbre de metodo validado**

Niveles	Conc., ppm	U, %
Nivel1	0.13	7.44
Nivel2	0.20	5.33
Nivel3	0.25	5.42
Nivel4	0.29	3.61
Nivel5	0.33	3.13
Nivel6	0.40	2.78
Nivel7	0.44	1.78

m promedio	lo promedio	s m	s lo	Sxy máximo
0.0252	0.0392	0.0001	0.0010	0.0070

**b. CRITERIOS DE ACEPTACION Y RECHAZO PARA LA VALIDEZ DE LOS RESULTADOS**

**1. Precisión**

Sr	ts (90%)	Límite Alarma	ts (95%)	Límite Crítico
1.74	1.66	4.08	1.98	4.87

**2. Exactitud**

Nivel	Valor nominal	U, %	u	ts (90%)	Límite Alarma	ts (95%)	Límite Crítico
Nivel1	0.14	7.44	3.72	1.66	8.73	1.98	10.44
Nivel2	0.19	5.33	2.66	1.66	6.25	1.98	7.47
Nivel3	0.24	5.42	2.71	1.66	6.36	1.98	7.60
Nivel4	0.29	3.61	1.81	1.66	4.24	1.98	5.07
Nivel5	0.34	3.13	1.57	1.66	3.68	1.98	4.39
Nivel6	0.39	2.78	1.39	1.66	3.27	1.98	3.90
Nivel7	0.44	1.78	0.89	1.66	2.09	1.98	2.50

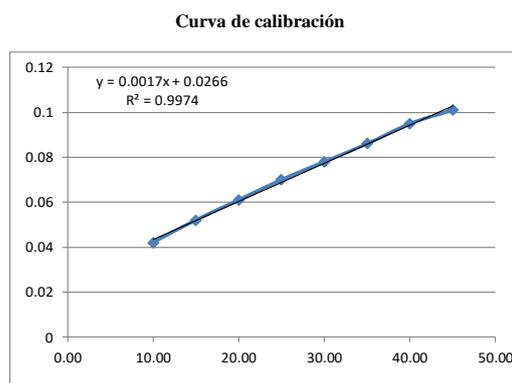
El método de ensayo: Procedimiento de método de análisis de solución estándar de sucralosa

### 3.1.2. Curvas de calibración de la solución estándar Aspartamo

**Tabla 13** Resultados de curvas de calibración – aspartamo – curva 1

INCERTIDUMBRE DE CALIBRACION INSTRUMENTAL - ASPARTAMO 585 nm								
Análisis 1								
$u_{cal. instr.} = \sqrt{(u_{Sx,y})^2 + (Estabilidad eq.)^2 + (u_{resolución})^2}$					$u_{Sx,y} = \frac{S_{x,y}}{\sqrt{3}}$			
Concentración $\mu\text{g/L}$	Absorbancia	Absorbancia calculada	Concentración calculada	$u_{Sx,y} \%$	$u_{estabilidad del equipo, \%}$	$u_{resolución, \%}$	$u, \%$	$U, \%$
10.00	0.042	0.044	9.11					
15.00	0.052	0.052	15.02	2.592	4.541	1.703	5.499	10.998
20.00	0.061	0.060	20.34	1.915	3.354	1.258	4.062	8.123
25.00	0.07	0.069	25.65	1.518	2.659	0.997	3.220	6.440
30.00	0.078	0.077	30.38	1.282	2.245	0.842	2.719	5.438
35.00	0.086	0.086	35.11	1.109	1.943	0.729	2.353	4.706
40.00	0.095	0.094	40.42	0.963	1.687	0.633	2.044	4.087
45.00	0.101	0.103	43.97	0.886	1.551	0.582	1.879	3.758

<b>pendiente</b>	0.0017	<b>intercepto</b>	0.0266
<b>desv. Pendiente</b>	0.0000	<b>desv. Intercepto</b>	0.0010
<b>R2</b>	0.9974	<b>error típico</b>	0.0011
		<b>u error típ. mg/l</b>	0.3894
<b>VALIDACION</b>			
<b>m</b>	0.0017	<b>m</b>	0.0017
<b>lo</b>	0.0266	<b>lo</b>	0.0266
<b>Sx,y</b>	0.0011	<b>Sx,y</b>	0.0011
<b>Reproducibilidad equipo</b>	0.002	<b>Resolución equipo</b>	0.0015
<b>u Reproducibil. mg/l</b>	0.68210	<b>Resolución mg/l</b>	0.88608
<b>factor de cobertura (k)</b>	2	<b>u resolución</b>	0.25579



En la tabla 13 de resultados de curvas de calibración se observan los valores obtenidos de la absorbancia para cada concentración de 10 a 45  $\mu\text{g/mL}$ . El análisis determina un comportamiento lineal con un R cuadrado de 99,74% que se ajusta muy bien a los datos recolectados, se puede determinar que la curva de calibración es aceptable ya que cumple con el objetivo de validación debido a que esta es una representación gráfica de una propiedad cuantitativa en función de otra, en este caso, la concentración con respecto a la absorbancia, se necesita establecer una alta exactitud y confiabilidad para demostrar la validez del modelo de cálculo aplicado (Fajardo et al., 2018) . Se observa que a medida que aumenta la concentración aumenta la absorbancia. Con estos resultados se obtuvo una sensibilidad calculada en base a los datos de entrada:

$$S = 0,0017$$

También se determinó el límite de detección y de cuantificación, empleando las fórmulas propuestas en (EURACHEM, 1998), con lo cual se obtuvo:

$$LoD = 0,0268 \text{ mg/mL}$$

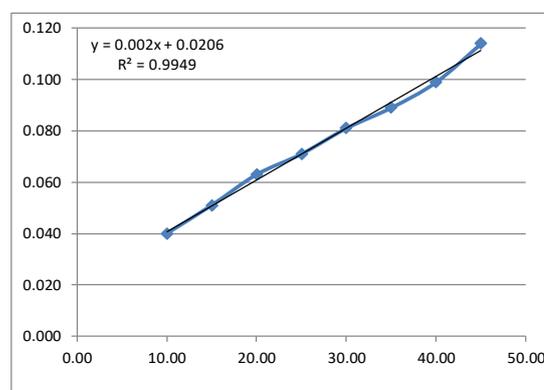
$$LoQ = 0,0270 \text{ mg/mL}$$

**Tabla 14** Resultados de curvas de calibración – aspartamo – curva 2

INCERTIDUMBRE DE CALIBRACION INSTRUMENTAL - ASPARTAMO 585 nm									
Análisis 2									
$u \text{ cal. instr.} = \sqrt{(u_{Sx,y})^2 + (\text{Estabilidad eq.})^2 + (u \text{ resolución})^2}$						$u_{Sx,y} = \frac{S_{x,y}}{\sqrt{3}}$			
Concentración $\mu\text{g/L}$	Absorbancia	Absorbancia calculada	Concentración calculada	$u_{Sx,y} \%$	$u$ estabilidad del equipo, %	$u$ resolución, %	$u$ , %	U, %	
10.00	0.040	0.041	9.628						
15.00	0.051	0.051	15.089	3.620	3.799	1.425	5.438	10.875	
20.00	0.063	0.061	21.046	2.595	2.724	1.021	3.898	7.797	
25.00	0.071	0.071	25.018	2.183	2.291	0.859	3.279	6.559	
30.00	0.081	0.081	29.982	1.822	1.912	0.717	2.736	5.473	
35.00	0.089	0.091	33.954	1.609	1.688	0.633	2.416	4.833	
40.00	0.099	0.101	38.918	1.403	1.473	0.552	2.108	4.216	
45.00	0.114	0.111	46.365	1.178	1.236	0.464	1.770	3.539	

Curva de calibración

pendiente	0.0020	0.0206	intercepto
desv. Pendiente	0.0001	0.0018	desv. Intercepto
R2	0.9949	0.0019	error típico
		0.5462	$u$ error típ. mg/l
<b>VALIDACION</b>			
$m$	0.0020	$m$	0.0020
$lo$	0.0206	$lo$	0.0206
$S_{x,y}$	0.0019	$S_{xy}$	0.0019
Reproducibilidad equipo	0.002	Resolución equipo, abs	0.0015
$u$ Reproducibil. mg/l	0.57326	Resolución mg/l	0.74468
factor de coberura (k)	2	$u$ resolución, $\pi$	0.21497



En la tabla 14 de resultados de curvas de calibración se observan los valores obtenidos de la absorbancia para cada concentración de 10 a 45  $\mu\text{g/mL}$ . El análisis determina un comportamiento lineal con un R cuadrado de 99,49% que se ajusta muy bien a los datos recolectados. Se observa que a medida que aumenta la concentración aumenta la absorbancia. Con estos resultados se obtuvo una sensibilidad calculada en base a los datos de entrada:

$$S = 0,0020$$

También se determinó el límite de detección y de cuantificación, empleando las fórmulas propuestas en (EURACHEM, 1998), con lo cual se obtuvo:

$$LoD = 0,0209 \text{ mg/mL}$$

$$LoQ = 0,0212 \text{ mg/mL}$$

**Tabla 15** Resultados de curvas de calibración – aspartamo – curva 3

INCERTIDUMBRE DE CALIBRACION INSTRUMENTAL - ASPARTAMO 585 nm								
Análisis 3								
$u \text{ cal. instr.} = \sqrt{(uSx,y)^2 + (\text{Estabilidad eq.})^2 + (u \text{ resolución})^2}$					$u Sx,y = \frac{Sx,y}{\sqrt{3}}$			
Concentración $\mu\text{g/L}$	Absorbancia	Absorbancia calculada	Concentración calculada	u Sx,y %	u estabilidad del equipo, %	u resolución, %	u, %	U, %
10.00	0.041	0.043	8.57					
15.00	0.053	0.052	15.67	3.712	4.359	1.635	5.955	11.909
20.00	0.061	0.060	20.40	2.851	3.348	1.256	4.573	9.147
25.00	0.069	0.069	25.13	2.314	2.718	1.019	3.712	7.425
30.00	0.078	0.077	30.46	1.910	2.243	0.841	3.063	6.127
35.00	0.087	0.086	35.78	1.626	1.909	0.716	2.608	5.215
40.00	0.095	0.094	40.51	1.436	1.686	0.632	2.303	4.606
45.00	0.100	0.103	43.47	1.338	1.571	0.589	2.146	4.293

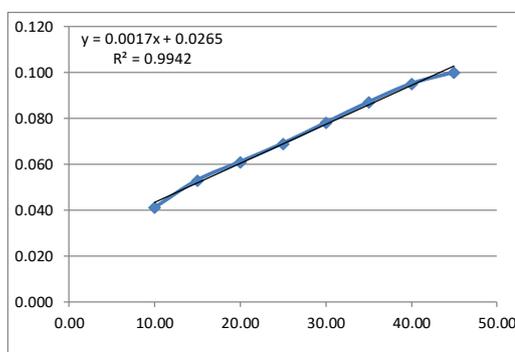
Curva de calibración

pendiente	0.0017	0.0265	intercepto
desv. Pendiente	0.0001	0.0016	desv. Intercepto
R2	0.9942	0.0017	error típico
		0.5817	u error típ. mg/l

**VALIDACION**

m	0.0017	m	0.0017
lo	0.0265	lo	0.0265
Sx,y	0.0017	Sxy	0.0017

Reproducibilidad ad equipo	0.002	Resolución equipo	0.0015
u			
Reproducibil. mg/l	0.68306	Resolución mg/l	0.88732
factor de coberura (k)	2	u resolución	0.25615



En la tabla 15 de resultados de curvas de calibración se observan los valores obtenidos de la absorbancia para cada concentración de 10 a 45  $\mu\text{g/mL}$ . El análisis determina un comportamiento lineal con un R cuadrado de 99,42% que se ajusta muy bien a los datos recolectados. Se observa que a medida que aumenta la concentración aumenta la absorbancia. Con estos resultados se obtuvo una sensibilidad calculada en base a los datos de entrada:

$$S = 0,0017$$

También se determinó el límite de detección y de cuantificación, empleando las fórmulas propuestas en (EURACHEM, 1998), con lo cual se obtuvo:

$$LoD = 0,0267 \text{ mg/mL}$$

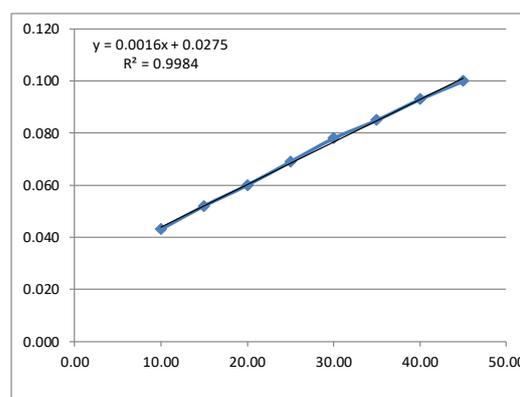
$$LoQ = 0,0269 \text{ mg/mL}$$

**Tabla 16** Resultados de curvas de calibración – aspartamo – curva 4

INCERTIDUMBRE DE CALIBRACION INSTRUMENTAL - ASPARTAMO 585 nm									
Análisis 4									
$u \text{ cal. instr.} = \sqrt{(u_{Sx,y})^2 + (\text{Estabilidad eq.})^2 + (u \text{ resolución})^2}$ $u_{Sx,y} = \frac{S_{x,y}}{\sqrt{3}}$									
Concentración $\mu\text{g/L}$	Absorbancia	Absorbancia calculada	Concentración calculada	$u_{Sx,y} \%$	$u$ estabilidad del equipo, %	$u$ resolución, %	$u$ , %	U, %	
10.00	0.043	0.044	9.49						
15.00	0.052	0.052	14.99	2.031	4.704	1.764	5.419	10.838	
20.00	0.060	0.060	19.87	1.532	3.548	1.330	4.087	8.174	
25.00	0.069	0.068	25.36	1.200	2.779	1.042	3.202	6.403	
30.00	0.078	0.077	30.86	0.987	2.284	0.857	2.632	5.263	
35.00	0.085	0.085	35.13	0.867	2.007	0.752	2.312	4.623	
40.00	0.093	0.093	40.01	0.761	1.762	0.661	2.029	4.059	
45.00	0.100	0.101	44.29	0.687	1.592	0.597	1.834	3.667	

pendiente	0.0016	intercepto	0.0275
desv. Pendiente	0.0000	desv. Intercepto	0.0008
R2	0.9984	error típico	0.0009
		$u$ error típ. mg/l	0.3044
VALIDACION			
$m$	0.0016	$m$	0.0016
$lo$	0.0275	$lo$	0.0275
$S_{x,y}$	0.0009	$S_{xy}$	0.0009
Reproducibilidad ad equipo	0.002	Resolución equipo	0.0015
$u$ Reproducibil. mg/l	0.70490	Resolución mg/l	0.91570
factor de coberura (k)	2	$u$ resolución	0.26434

Curva de calibración



En la tabla 16 de resultados de curvas de calibración se observan los valores obtenidos de la absorbancia para cada concentración de 10 a 45  $\mu\text{g/mL}$ . El análisis determina un comportamiento lineal con un R cuadrado de 99,84% que se ajusta muy bien a los datos recolectados. Se observa que a medida que aumenta la concentración aumenta la absorbancia. Con estos resultados se obtuvo una sensibilidad calculada en base a los datos de entrada:

$$S = 0,0016$$

También se determinó el límite de detección y de cuantificación, empleando las fórmulas propuestas en (EURACHEM, 1998), con lo cual se obtuvo:

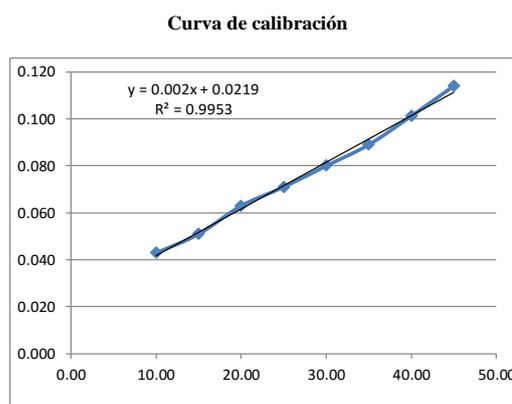
$$LoD = 0,0277 \text{ mg/mL}$$

$$LoQ = 0,0279 \text{ mg/mL}$$

**Tabla 17** Resultados de curvas de calibración – aspartamo – curva 5

INCERTIDUMBRE DE CALIBRACION INSTRUMENTAL - ASPARTAMO 585 nm								
Análisis 5								
$u \text{ cal. instr.} = \sqrt{(uS_{x,y})^2 + (\text{Estabilidad eq.})^2 + (u \text{ resolución})^2}$						$u S_{x,y} = \frac{S_{x,y}}{\sqrt{3}}$		
Concentración µg/L	Absorbancia	Absorbancia calculada	Concentración calculada	u S <sub>x,y</sub> %	u estabilidad del equipo, %	u resolución, %	u, %	U, %
10.00	0.043	0.042	10.64					
15.00	0.051	0.052	14.66	3.588	3.962	1.486	5.547	11.095
20.00	0.063	0.062	20.70	2.542	2.806	1.052	3.930	7.859
25.00	0.071	0.072	24.72	2.128	2.349	0.881	3.290	6.580
30.00	0.080	0.081	29.25	1.799	1.986	0.745	2.781	5.562
35.00	0.089	0.091	33.77	1.557	1.720	0.645	2.408	4.816
40.00	0.101	0.101	39.91	1.318	1.455	0.546	2.038	4.076
45.00	0.114	0.111	46.35	1.135	1.253	0.470	1.755	3.509

<b>pendiente</b>	0.0020	<b>intercepto</b>	0.0219
<b>desv. Pendiente</b>	0.0001	<b>desv. Intercepto</b>	0.0017
<b>R2</b>	0.9953	<b>error típico</b>	0.0018
		<b>u error típ. mg/l</b>	0.5260
<b>VALIDACION</b>			
<b>m</b>	0.0020	<b>m</b>	0.0020
<b>lo</b>	0.0219	<b>lo</b>	0.0219
<b>S<sub>x,y</sub></b>	0.0018	<b>S<sub>x,y</sub></b>	0.0018
<b>Reproducibilidad equipo</b>	0.002	<b>Resolución equipo</b>	0.0015
<b>u</b>			
<b>Reproducibil. mg/l</b>	0.58081	<b>Resolución mg/l</b>	0.75449
<b>factor de coberura (k)</b>	2	<b>u resolución</b>	0.21780



En la tabla 17 de resultados de curvas de calibración se observan los valores obtenidos de la absorbancia para cada concentración de 10 a 45 µg/mL. El análisis determina un comportamiento lineal con un R cuadrado de 99,53% que se ajusta muy bien a los datos recolectados. Se observa que a medida que aumenta la concentración aumenta la absorbancia. Con estos resultados se obtuvo una sensibilidad calculada en base a los datos de entrada:

$$S = 0,0020$$

También se determinó el límite de detección y de cuantificación, empleando las fórmulas propuestas en (EURACHEM, 1998), con lo cual se obtuvo:

$$LoD = 0,0221 \text{ mg/mL}$$

$$LoQ = 0,0225 \text{ mg/mL}$$

En las siguientes tablas se muestra un resumen del tratamiento estadístico de las curvas de calibración obtenidas para la sucralosa, los valores del análisis ANOVA se encuentran en los anexos.

**Tabla 18** Resumen de resultados de incertidumbres, reproducibilidad y repetibilidad del método para aspartamo

RESUMEN									
Pendiente, Intercepto al eje e Incertidumbre de calibración instrumental por curva									
	m	Validacion	lo	Validacion	u cal. Instrum.	Validacion	Sxy	Validacion	
Curva 1	0.0017	ok	0.0266	ok	10.9982	ok	0.0011	ok	
Curva 2	0.0020	ok	0.0206	ok	10.8751	ok	0.0019	ok	
Curva 3	0.0017	ok	0.0265	ok	11.9092	ok	0.0017	ok	
Curva 4	0.0016	ok	0.0275	ok	10.8380	ok	0.0009	ok	
Curva 5	0.0020	ok	0.0219	ok	11.0949	ok	0.0018	ok	
Promedio	0.0018		0.0246		11.1431		0.0015		
desv.estand	0.0002		0.0031		0.4402		0.0004		
Máximo	0.0020		0.0275				0.0019		
mínimo	0.0016		0.0206		10.8380		0.0009		

Precisión por Repetibilidad y Reproducibilidad										
	Valor nominal	Conc. promedio	Matriz	SR	% SR	Sr	% Sr	Sesgo	% Sesgo	% Recuperación
Nivel1	0.04	0.0418	10 µg/mL	0.0012	2.7885	0.0006	1.4368	0.0004	1.05	99
Nivel2	0.05	0.0522	15 µg/mL	0.0016	3.0723	0.0015	2.9157	-0.0006	1.23	101
Nivel3	0.06	0.0620	20 µg/mL	0.0019	3.0177	0.0017	2.8047	-0.0012	1.87	102
Nivel4	0.07	0.0708	25 µg/mL	0.0016	2.3308	0.0015	2.1618	-0.0006	0.79	101
Nivel5	0.08	0.0796	30 µg/mL	0.0032	4.0494	0.0032	3.9588	-0.0002	0.30	100
Nivel6	0.09	0.0881	35 µg/mL	0.0035	3.9447	0.0032	3.6117	-0.0001	0.09	100
Nivel7	0.10	0.1014	40 µg/mL	0.0005	0.4970	0.0005	0.4591	-0.0032	3.13	103
Nivel8	0.11	0.1166	45 µg/mL	0.0038	3.2989	0.0036	3.0539	-0.0090	7.72	108
Máximo				0.0032	4.0494	0.0032	3.9588	0.0000	1.87	

Incertidumbres de calibración instrumental de los patrones de calibración de las curvas de calibración

	curva 1	curva 2	curva 3	curva 4	curva 5	Maximo
PC1	11.00	10.88	11.91	10.84	11.09	11.91
PC2	8.12	7.80	9.15	8.17	7.86	9.15
PC3	5.44	5.47	6.13	5.26	5.56	6.13
PC4	4.71	4.83	5.22	4.62	4.82	5.22
PC5	4.09	4.22	4.61	4.06	4.08	4.61
PC6	3.76	3.54	4.29	3.67	3.51	4.29

En la tabla 18 se observan los porcentajes de repetibilidad, reproducibilidad y sesgo, y se determina que se encuentran dentro de los límites establecidos por los objetivos planteados.

**Tabla 19** Cálculo de incertidumbre para el método aplicado en la solución estándar aspartamo

CALCULO INCERTIDUMBRE DEL MÉTODO DE ENSAYO								
$U = k * u + CNR$								
$u = \sqrt{(u \text{ lectura instrumental})^2 + (u \text{ resolución})^2 + SR^2}$								
lectura instrumental = calibración instrumental								
Niveles	Matriz	Conc. Promedio mg/l	u cal instru, %	u res, %	SR, %	u método, %	Sesgo	U metodo, %
Nivel1	10 µg/mL	0.04	5.95	6.91	2.79	9.54	0.00	19.08
Nivel2	15 µg/mL	0.05	4.57	5.53	3.07	7.80	0.00	15.61
Nivel3	20 µg/mL	0.06	3.06	4.66	3.02	6.34	0.00	12.68
Nivel4	25 µg/mL	0.07	2.61	4.08	2.33	5.37	0.00	10.75
Nivel5	30 µg/mL	0.08	2.30	3.62	4.05	5.90	0.00	11.81
Nivel6	35 µg/mL	0.09	2.15	3.28	3.94	5.56	0.00	11.12
Nivel7	40 µg/mL	0.10	0.00	2.85	0.50	2.89	0.00	5.78
Nivel8	45 µg/mL	0.12	0.00	2.48	3.30	4.12	-0.01	8.26
Máximo								19.08

En la tabla 19 se observa el sesgo obtenido en cada nivel de medición de la sucralosa y la incertidumbre del método, el máximo valor obtenido es de 19,08% y se encuentra dentro de los objetivos planteados de validación. Así también, el sesgo calculado es mínimo, oscila entre 0,0 y 0,01 valores muy cercanos a la medición esperada por cada nivel.

En la tabla 20 se presenta un resumen del cumplimiento de los objetivos de validación para el método de análisis y determinación de soluciones estándar, en este caso, se presentan los resultados de la sucralosa con una longitud de onda de 585 nm y un rango de trabajo de 10 a 45 µg/mL con un porcentaje de incertidumbre de 19,08% y una exactitud dentro de los límites calculados, como se presenta en la tabla.

**Tabla 20** Validación del método aplicado para la determinación de aspartamo

**a. VERIFICACION DE CUMPLIMIENTO DE OBJETIVOS Y RESULTADOS**

Parámetro	Objetivo	Resultado	Cumple/ No cumple
Linealidad/Función respuesta	mínimo 0,99	0.996	cumple
Límite de detección	0.08	0.0249	cumple
Límite de cuantificación	0.1	0.0252	cumple
% Sr Precisión repetibilidad	5.00%	3.96	cumple
% SR Precisión Reproducibilidad	10.00%	4.05	cumple
Sesgo	10.00%	1.87	cumple
% U	25.00%	19.08	cumple

**Incertidumbre de metodo validado**

Niveles	Conc., ppm	U, %
Nivel1	0.04	19.08
Nivel2	0.05	15.61
Nivel3	0.06	12.68
Nivel4	0.07	10.75
Nivel5	0.08	11.81
Nivel6	0.09	11.12
Nivel7	0.10	5.78

m promedio	lo promedio	s m	s lo	Sxy máximo
0.0018	0.0246	0.0002	0.0031	0.0019

**b. CRITERIOS DE ACEPTACION Y RECHAZO PARA LA VALIDEZ DE LOS RESULTADOS**

**1. Precisión**

Sr	ts (90%)	Límite Alarma	ts (95%)	Límite Crítico
3.96	1.66	9.29	1.98	11.11

**2. Exactitud**

Nivel	Valor nominal	U, %	u	ts (90%)	Límite Alarma	ts (95%)	Límite Crítico
Nivel1	0.04	19.08	9.54	1.66	22.40	1.98	26.77
Nivel2	0.05	15.61	7.80	1.66	18.32	1.98	21.89
Nivel3	0.06	12.68	6.34	1.66	14.89	1.98	17.79
Nivel4	0.07	10.75	5.37	1.66	12.62	1.98	15.08
Nivel5	0.08	11.81	5.90	1.66	13.86	1.98	16.56
Nivel6	0.09	11.12	5.56	1.66	13.05	1.98	15.60
Nivel7	0.10	5.78	2.89	1.66	6.79	1.98	8.12
Nivel8	0.11	8.26	4.13	1.66	9.69	1.98	11.59

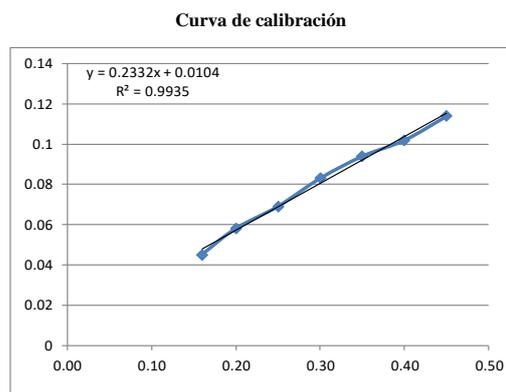
El método de ensayo: Procedimiento de método de análisis de solución estándar de aspartamo

### 3.1.3. Curvas de calibración de la solución estándar Acesulfame K

**Tabla 21** Resultados de curvas de calibración – acesulfame K – curva 1

INCERTIDUMBRE DE CALIBRACION INSTRUMENTAL - ACESULFAME K 246 nm								
Análisis 1		$u_{cal. instr.} = \sqrt{(u_{Sx,y})^2 + (Estabilidad eq.)^2 + (u_{resolución})^2}$			$u_{Sx,y} = \frac{Sx,y}{\sqrt{3}}$			
Concentración mg/L	Absorbancia	Absorbancia calculada	Concentración calculada	u Sx,y %	u estabilidad del equipo, %	u resolución, %	u, %	U, %
0.16	0.045	0.048	0.15					
0.20	0.058	0.057	0.20	2.652	2.427	0.910	3.708	7.417
0.25	0.069	0.069	0.25	2.154	1.971	0.739	3.012	6.024
0.30	0.083	0.080	0.31	1.738	1.591	0.597	2.431	4.862
0.35	0.094	0.092	0.36	1.509	1.382	0.518	2.111	4.222
0.40	0.102	0.104	0.39	1.378	1.261	0.473	1.927	3.853
0.45	0.114	0.115	0.44	1.218	1.115	0.418	1.703	3.407

pendiente	0.2332	0.0104	intercepto
desv. Pendiente	0.0084	0.0027	desv. Intercepto
R2	0.9935	0.0022	error típico
		0.0054	u error típ. mg/l
<b>VALIDACION</b>			
m	0.2332	m	0.2332
lo	0.0104	lo	0.0104
Sx,y	0.0022	Sx,y	0.0022
Reproducibilidad equipo	0.002	Resolución equipo	0.0015
u Reproducibil. mg/l	0.00495	Resolución mg/l	0.00643
factor de cobertura (k)	2	u resolución	0.00186



En la tabla 21 de resultados de curvas de calibración se observan los valores obtenidos de la absorbancia para cada concentración de 0,16 a 0,45 mg/mL. El análisis determina un comportamiento lineal con un R cuadrado de 99,35% que se ajusta muy bien a los datos recolectados, se puede determinar que la curva de calibración es aceptable ya que cumple con el objetivo de validación debido a que esta es una representación gráfica de una propiedad cuantitativa en función de otra, en este caso, la concentración con respecto a la absorbancia, se necesita establecer una alta exactitud y confiabilidad para demostrar la validez del modelo de cálculo aplicado (Fajardo et al., 2018). Se observa que a medida que aumenta la concentración aumenta la absorbancia. Con estos resultados se obtuvo una sensibilidad calculada en base a los datos de entrada:

$$S = 0,2332$$

También se determinó el límite de detección y de cuantificación, empleando las fórmulas propuestas en (EURACHEM, 1998), con lo cual se obtuvo:

$$LoD = 0,0465 \text{ mg/mL}$$

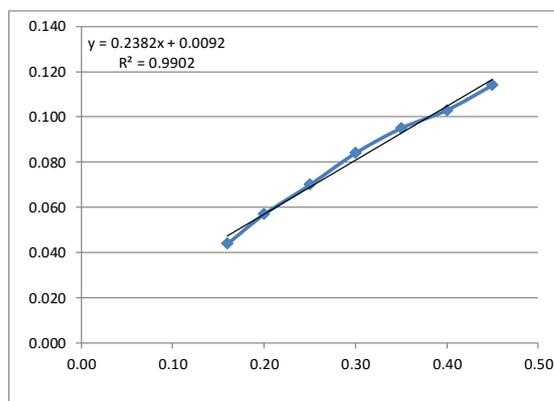
$$LoQ = 0,0869 \text{ mg/mL}$$

**Tabla 22** Resultados de curvas de calibración – acesulfame K – curva 2

INCERTIDUMBRE DE CALIBRACION INSTRUMENTAL - ACESULFAME K 246 nm								
Análisis 2		$u \text{ cal. instr.} = \sqrt{(u_{Sx,y})^2 + (\text{Estabilidad eq.})^2 + (u \text{ resolución})^2}$				$u_{Sx,y} = \frac{S_{x,y}}{\sqrt{3}}$		
Concentración mg/L	Absorbancia	Absorbancia calculada	Concentración calculada	u Sx,y %	u estabilidad del equipo, %	u resolución, %	u, %	U, %
0.16	0.044	0.047	0.146					
0.20	0.057	0.057	0.201	3.309	2.416	0.906	4.196	8.391
0.25	0.070	0.069	0.255	2.601	1.899	0.712	3.299	6.597
0.30	0.084	0.081	0.314	2.114	1.544	0.579	2.681	5.362
0.35	0.095	0.093	0.360	1.843	1.346	0.505	2.337	4.675
0.40	0.103	0.104	0.394	1.686	1.231	0.462	2.138	4.276
0.45	0.114	0.116	0.440	1.509	1.102	0.413	1.914	3.827

Curva de calibración

pendiente	0.2382	0.0092	intercepto
desv. Pendiente	0.0106	0.0034	desv. Intercepto
R2	0.9902	0.0027	error típico
		0.0066	u error típ. mg/l
VALIDACION			
m	0.2382	m	0.2382
lo	0.0092	lo	0.0092
Sx,y	0.0027	Sxy	0.0027
Reproducibil. ad equipo	0.002	Resolución equipo, abs	0.0015
u Reproducibil. mg/l	0.00485	Resolución mg/l	0.00630
factor de coberura (k)	2	u resolución, m	0.00182



En la tabla 22 de resultados de curvas de calibración se observan los valores obtenidos de la absorbancia para cada concentración de 0,16 a 0,45 mg/mL. El análisis determina un comportamiento lineal con un R cuadrado de 99,02% que se ajusta muy bien a los datos recolectados. Se observa que a medida que aumenta la concentración aumenta la absorbancia. Con estos resultados se obtuvo una sensibilidad calculada en base a los datos de entrada:

$$S = 0,2382$$

También se determinó el límite de detección y de cuantificación, empleando las fórmulas propuestas en (EURACHEM, 1998), con lo cual se obtuvo:

$$LoD = 0,0465 \text{ mg/mL}$$

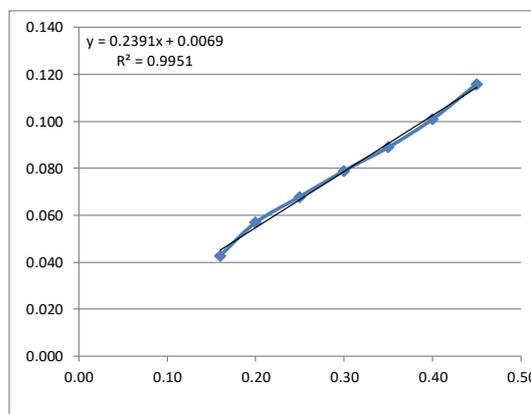
$$LoQ = 0,0887 \text{ mg/mL}$$

**Tabla 23** Resultados de curvas de calibración – acesulfame K – curva 3

INCERTIDUMBRE DE CALIBRACION INSTRUMENTAL - ACESULFAME K 246 nm								
Análisis 3								
$u \text{ cal. instr.} = \sqrt{(u_{Sx,y})^2 + (\text{Estabilidad eq.})^2 + (u \text{ resolución})^2}$					$u_{Sx,y} = \frac{S_{x,y}}{\sqrt{3}}$			
Concentración mg/L	Absorbancia	Absorbancia calculada	Concentración calculada	u Sx,y %	u estabilidad del equipo, %	u resolución, %	u, %	U, %
0.16	0.043	0.045	0.15					
0.20	0.057	0.055	0.21	2.241	2.306	0.865	3.330	6.660
0.25	0.068	0.067	0.26	1.837	1.891	0.709	2.730	5.460
0.30	0.079	0.079	0.30	1.557	1.602	0.601	2.313	4.627
0.35	0.089	0.091	0.34	1.367	1.407	0.528	2.031	4.063
0.40	0.101	0.103	0.39	1.193	1.227	0.460	1.772	3.545
0.45	0.116	0.115	0.46	1.029	1.059	0.397	1.529	3.057

<b>pendiente</b>	0.2391	<b>intercepto</b>	0.0069
<b>dev. Pendiente</b>	0.0075	<b>dev. Intercepto</b>	0.0024
<b>R2</b>	0.9951	<b>error típico</b>	0.0019
		<b>u error típ. mg/l</b>	0.0047
VALIDACION			
<b>m</b>	0.2391	<b>m</b>	0.2391
<b>lo</b>	0.0069	<b>lo</b>	0.0069
<b>Sx,y</b>	0.0019	<b>Sxy</b>	0.0019
<b>Reproducibilidad ad equipo</b>	0.002	<b>Resolución equipo</b>	0.0015
<b>u Reproducibil. mg/l</b>	0.00483	<b>Resolución mg/l</b>	0.00627
<b>factor de coberura (k)</b>	2	<b>u resolución</b>	0.00181

Curva de calibración



En la tabla 23 de resultados de curvas de calibración se observan los valores obtenidos de la absorbancia para cada concentración de 0,16 a 0,45  $\mu\text{g/mL}$ . El análisis determina un comportamiento lineal con un R cuadrado de 99,51% que se ajusta muy bien a los datos recolectados. Se observa que a medida que aumenta la concentración aumenta la absorbancia. Con estos resultados se obtuvo una sensibilidad calculada en base a los datos de entrada:

$$S = 0,2391$$

También se determinó el límite de detección y de cuantificación, empleando las fórmulas propuestas en (EURACHEM, 1998), con lo cual se obtuvo:

$$LoD = 0,0439 \text{ mg/mL}$$

$$LoQ = 0,0863 \text{ mg/mL}$$

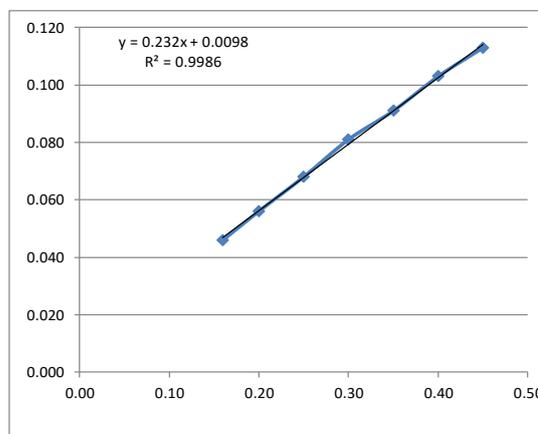
**Tabla 24** Resultados de curvas de calibración – acesulfame K – curva 4

INCERTIDUMBRE DE CALIBRACION INSTRUMENTAL - ACESULFAME K 246 nm								
Análisis 4		$u \text{ cal. instr.} = \sqrt{(u_{Sx,y})^2 + (\text{Estabilidad eq.})^2 + (u \text{ resolución})^2}$				$u_{Sx,y} = \frac{S_{x,y}}{\sqrt{3}}$		
Concentración mg/L	Absorbancia	Absorbancia calculada	Concentración calculada	$u_{Sx,y} \%$	u estabilidad del equipo, %	u resolución, %	u, %	U, %
0.16	0.046	0.047	0.16					
0.20	0.056	0.056	0.20	1.260	2.499	0.937	2.951	5.902
0.25	0.068	0.068	0.25	1.000	1.984	0.744	2.343	4.685
0.30	0.081	0.079	0.31	0.818	1.621	0.608	1.915	3.830
0.35	0.091	0.091	0.35	0.717	1.422	0.533	1.679	3.358
0.40	0.103	0.103	0.40	0.625	1.239	0.465	1.463	2.926
0.45	0.113	0.114	0.44	0.564	1.119	0.420	1.321	2.643

pendiente	0.2320	0.0098	intercepto
desv. Pendiente	0.0039	0.0012	desv. Intercepto
R2	0.9986	0.0010	error típico
		0.0025	u error típ. mg/l
VALIDACION			
m	0.2320	m	0.2320
lo	0.0098	lo	0.0098
Sx,y	0.0010	Sxy	0.0010

Reproducibilidad ad equipo	0.002	Resolución equipo	0.0015
u			
Reproducibil. mg/l	0.00498	Resolución mg/l	0.00647
factor de coberura (k)	2	u resolución	0.00187

Curva de calibración



En la tabla 24 de resultados de curvas de calibración se observan los valores obtenidos de la absorbancia para cada concentración de 0,16 a 0,45 mg/mL. El análisis determina un comportamiento lineal con un R cuadrado de 99,86% que se ajusta muy bien a los datos recolectados. Se observa que a medida que aumenta la concentración aumenta la absorbancia. Con estos resultados se obtuvo una sensibilidad calculada en base a los datos de entrada:

$$S = 0,2320$$

También se determinó el límite de detección y de cuantificación, empleando las fórmulas propuestas en (EURACHEM, 1998), con lo cual se obtuvo:

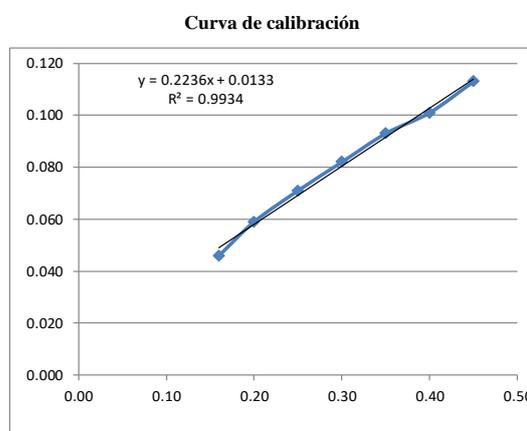
$$LoD = 0,0453 \text{ mg/mL}$$

$$LoQ = 0,0852 \text{ mg/mL}$$

**Tabla 25** Resultados de curvas de calibración – acesulfame K - curva 5

INCERTIDUMBRE DE CALIBRACION INSTRUMENTAL - ACESULFAME K 246 nm								
Análisis 5								
$u \text{ cal. instr.} = \sqrt{(uS_{x,y})^2 + (\text{Estabilidad eq.})^2 + (u \text{ resolución})^2}$						$u S_{x,y} = \frac{S_{x,y}}{\sqrt{3}}$		
Concentración mg/L	Absorbancia	Absorbancia calculada	Concentración calculada	u S <sub>x,y</sub> %	u estabilidad del equipo, %	u resolución, %	u, %	U, %
0.16	0.046	0.049	0.15	2.664	2.527	0.948	3.792	7.584
0.20	0.059	0.058	0.20	2.110	2.001	0.751	3.004	6.007
0.25	0.071	0.069	0.26	1.772	1.681	0.630	2.523	5.045
0.30	0.082	0.080	0.31	1.528	1.449	0.543	2.174	4.349
0.35	0.093	0.092	0.36	1.388	1.317	0.494	1.976	3.952
0.40	0.101	0.103	0.39	1.221	1.158	0.434	1.738	3.476

pendiente	0.2236	0.0133	intercepto
devs. Pendiente	0.0081	0.0026	devs. Intercepto
R2	0.9934	0.0021	error típico
		0.0054	u error típ. mg/l
VALIDACION			
m	0.2236	m	0.2236
lo	0.0133	lo	0.0133
S <sub>x,y</sub>	0.0021	S <sub>xy</sub>	0.0021
Reproducibilidad ad equipo	0.002	Resolución equipo	0.0015
u Reproducibil. mg/l	0.00516	Resolución mg/l	0.00671
factor de coberura (k)	2	u resolución	0.00194



En la tabla 25 de resultados de curvas de calibración se observan los valores obtenidos de la absorbancia para cada concentración de 0,16 a 0,45 mg/mL. El análisis determina un comportamiento lineal con un R cuadrado de 99,34% que se ajusta muy bien a los datos recolectados. Se observa que a medida que aumenta la concentración aumenta la absorbancia. Con estos resultados se obtuvo una sensibilidad calculada en base a los datos de entrada:

$$S = 0,2236$$

También se determinó el límite de detección y de cuantificación, empleando las fórmulas propuestas en (EURACHEM, 1998), con lo cual se obtuvo:

$$LoD = 0,0473 \text{ mg/mL}$$

$$LoQ = 0,0843 \text{ mg/mL}$$

En las siguientes tablas se muestra un resumen del tratamiento estadístico de las curvas de calibración obtenidas para la sucralosa, los valores del análisis ANOVA se encuentran en los anexos.

**Tabla 26** Resumen de resultados de incertidumbres, reproducibilidad y repetibilidad del método para acesulfame K

RESUMEN								
Pendiente, Intercepto al eje e Incertidumbre de calibración instrumental por curva								
	m	Validacion	lo	Validacion	u cal. Instrum.	Validacion	Sxy	Validacion
Curva 1	0,2332	ok	0,0104	ok	7,4168	ok	0,0022	ok
Curva 2	0,2382	ok	0,0092	ok	8,3912	ok	0,0027	ok
Curva 3	0,2391	ok	0,0069	ok	6,6595	ok	0,0019	ok
Curva 4	0,2320	ok	0,0098	ok	5,9020	ok	0,001	ok
Curva 5	0,2236	ok	0,0133	ok	7,5845	ok	0,0021	ok
Promedio	0,2332		0,0099		7,1908		0,0020	
desv.estand	0,0062		0,0023		0,9474		0,0006	
Máximo	0,2391		0,0133				0,0027	
mínimo	0,2236		0,0069		5,9020		0,0010	

**Precisión por Repetibilidad y Reproducibilidad**

	Valor nominal	Conc. promedio	Matriz	SR	% SR	Sr	% Sr	Sesgo	% Sesgo	% Recuperación
Nivel1	0,05	0,0448	0,16 mg/mL	0,0016	3,5965	0,0015	3,2957	0,0008	1,79	98
Nivel2	0,06	0,0579	0,20 mg/mL	0,0021	3,5993	0,0019	3,3502	-0,0013	2,21	102
Nivel3	0,07	0,0707	0,25 mg/mL	0,0033	4,6427	0,0030	4,2562	-0,0023	3,28	103
Nivel4	0,08	0,0847	0,30 mg/mL	0,0033	3,9297	0,0031	3,6151	-0,0049	5,81	106
Nivel5	0,09	0,0955	0,35 mg/mL	0,0023	2,3624	0,0021	2,1759	-0,0037	3,89	104
Nivel6	0,10	0,1037	0,40 mg/mL	0,0038	3,7120	0,0036	3,4399	-0,0003	0,27	100
Nivel7	0,11	0,1162	0,45 mg/mL	0,0055	4,7467	0,0051	4,3663	-0,0014	1,24	101
Máximo				0,0033	4,6427	0,0031	4,2562	0,0000	5,81	

**Incetidumbres de calibración instrumental de los patrones de calibración de las curvas de calibración**

	curva 1	curva 2	curva 3	curva 4	curva 5	Maximo
PC1	7.42	8.39	6.66	5.90	7.58	8.39
PC2	6.02	6.60	5.46	4.69	6.01	6.60
PC3	4.86	5.36	4.63	3.83	5.05	5.36
PC4	4.22	4.67	4.06	3.36	4.35	4.67
PC5	3.85	4.28	3.54	2.93	3.95	4.28
PC6	3.41	3.83	3.06	2.64	3.48	3.83

En la tabla 26 se observan los porcentajes de repetibilidad, reproducibilidad y sesgo, y se determina que se encuentran dentro de los límites establecidos por los objetivos planteados.

**Tabla 27** Cálculo de incertidumbre para el método aplicado en la solución estándar acesulfame K

CALCULO INCERTIDUMBRE DEL MÉTODO DE ENSAYO								
$U = k * u + CNR$								
$u = \sqrt{(u \text{ lectura instrumental})^2 + (u \text{ resolución})^2 + SR^2}$								
lectura instrumental = calibración instrumental								
Niveles	Matriz	Conc. Promedio mg/l	u cal instru, %	u res, %	SR, %	u método, %	Sesgo	U metodo, %
Nivel1	0,16 mg/mL	0.05	4.20	6.29	7.65	10.76	0.00	21.51
Nivel2	0,20 mg/mL	0.06	3.30	4.92	6.05	8.47	0.00	16.94
Nivel3	0,25 mg/mL	0.07	2.68	4.08	4.64	6.74	0.00	13.48
Nivel4	0,30 mg/mL	0.08	2.34	3.41	3.93	5.70	0.00	11.41
Nivel5	0,35 mg/mL	0.10	2.14	3.02	2.36	4.39	0.00	8.79
Nivel6	0,40 mg/mL	0.10	1.91	2.78	3.71	5.02	0.00	10.04
Nivel7	0,45 mg/mL	0.12	0.00	2.48	4.75	5.36	0.00	10.72
Máximo								21.51

En la tabla 27 se observa el sesgo obtenido en cada nivel de medición de la sucralosa y la incertidumbre del método, el máximo valor obtenido es de 21,51% y se encuentra dentro de los objetivos planteados de validación. Así también, el sesgo calculado es mínimo, oscila entre 0,0 y 0,01 valores muy cercanos a la medición esperada por cada nivel.

En la tabla 28 se presenta un resumen del cumplimiento de los objetivos de validación para el método de análisis y determinación de soluciones estándar, en este caso, se presentan los resultados de la sucralosa con una longitud de onda de 585 nm y un rango de trabajo de 0,16 a 0,45 mg/mL con un porcentaje de incertidumbre de 21,51% y una exactitud dentro de los límites calculados, como se presenta en la tabla.

**Tabla 28** Validación del método aplicado para la determinación de acesulfame K

**a. VERIFICACION DE CUMPLIMIENTO DE OBJETIVOS Y RESULTADOS**

Parámetro	Objetivo	Resultado	Cumple/ No cumple
Linealidad/Función respuesta	mínimo 0,99	0.994	cumple
Límite de detección	0.08	0.0459	cumple
Límite de cuantificación	0.1	0.0863	cumple
% Sr Precisión repetibilidad	5.00%	7.12	cumple
% SR Precisión Reproducibilidad	10.00%	7.65	cumple
Sesgo	10.00%	5.81	cumple
% U	25.00%	21.51	cumple

**Incertidumbre de metodo validado**

Niveles	Conc., ppm	U, %
Nivel1	0.05	21.51
Nivel2	0.06	16.94
Nivel3	0.07	13.48
Nivel4	0.08	11.41
Nivel5	0.10	8.79
Nivel6	0.10	10.04
Nivel7	0.12	10.72

m promedio	lo promedio	s m	s lo	Sxy máximo
0.2332	0.0099	0.0062	0.0023	0.0027

**b. CRITERIOS DE ACEPTACION Y RECHAZO PARA LA VALIDEZ DE LOS RESULTADOS**

**1. Precisión**

Sr	ts (90%)	Límite Alarma	ts (95%)	Límite Crítico
7.12	1.66	16.73	1.98	19.99

**2. Exactitud**

Nivel	Valor nominal	U, %	u	ts (90%)	Límite Alarma	ts (95%)	Límite Crítico
Nivel1	0.05	21.51	10.76	1.66	25.25	1.98	30.18
Nivel2	0.06	16.94	8.47	1.66	19.89	1.98	23.77
Nivel3	0.07	13.48	6.74	1.66	15.82	1.98	18.91
Nivel4	0.08	11.41	5.70	1.66	13.39	1.98	16.01
Nivel5	0.09	8.79	4.39	1.66	10.32	1.98	12.33
Nivel6	0.10	10.04	5.02	1.66	11.79	1.98	14.08
Nivel7	0.11	10.72	5.36	1.66	12.58	1.98	15.03

El método de ensayo: Procedimiento de método de análisis de solución estándar de acesulfame K

### 3.1.4. Análisis comparativo entre Espectrofotometría UV-Vis y Cromatografía HPLC

**Tabla 29** Comparación de parámetros de validación de métodos de análisis de obtención de curvas de calibración.

<b>Parámetro de validación</b>	<b>Espectrofotometría UV</b> <b>VIS: Sucralosa /</b> <b>Aspartame /</b> <b>Acesulfame K</b>	<b>Cromatografía</b> <b>HPLC: Sucralosa /</b> <b>Aspartame /</b> <b>Acesulfame K</b>	<b>Fuentes de información</b> <b>cromatografía HPLC:</b> <b>Sucralosa /</b> <b>Aspartame /</b> <b>Acesulfame K</b>
<b>Sensibilidad</b>	0,0252 / 0,0018 / 0,2332	0,01 / 0,510 / 0,979	(Ferrer & Thurman, 2010) / (Grembecka et al., 2014) / (Grembecka et al., 2014)
<b>Límites de detección</b>	0,0547 µg/mL / 0,0249 µg/mL / 0,0459 mg/mL	0,01 µg/L / 0,008 µg/mL / 0,20 µg/mL	(Ferrer & Thurman, 2010) / (Grembecka et al., 2014) / (Grembecka et al., 2014)
<b>Límites de cuantificación</b>	0,0740 µg/mL / 0,0252 µg/mL / 0,0863 mg/mL	0,1 µg/L / 0,23 µg/mL / 0,61 µg/mL	(Ferrer & Thurman, 2010) / (Grembecka et al., 2014) / (Grembecka et al., 2014)
<b>R<sup>2</sup></b>	0,997 / 0,996 / 0,994	0,999 / 0,9999 / 0,9999	(Ferrer & Thurman, 2010) / (Grembecka et al., 2014) / (Grembecka et al., 2014)
<b>Precisión y exactitud</b>	97,57% / 99,9% / 99,9%	73% / 99,3% / 99,6%	(Ferrer & Thurman, 2010) / (Ferrer & Thurman, 2010) / (Grembecka et al., 2014)

En la tabla 29 se muestra la comparación entre las técnicas espectrofotométricas y cromatográficas en la validación de curvas de calibración para la detección de edulcorantes sintéticos. En los datos obtenidos de la experimentación se observa un factor de respuesta superior al de los datos obtenidos en cromatografía, sin embargo, este parámetro por sí solo no asegura una mejor definición de los resultados, por lo tanto, al comparar los límites de detección se aprecia que los resultados de cromatografía HPLC son más exactos al momento de determinar una mínima concentración del analito. Cabe resaltar que las condiciones de las experimentaciones de cromatografía HPLC pueden diferir de las condiciones expuestas en este análisis

para la espectrofotometría UV Vis, sin embargo, estos valores sirven como referencia para ajustar la metodología en futuras investigaciones.

En cuanto a los valores de R cuadrado y de exactitud de los dos métodos de análisis son eficientes para este tipo de estudios por lo que se puede emplear curvas de calibración de cualquiera de los dos métodos con un procedimiento de medición adecuado.

### **3.2.Verificación de la hipótesis**

En la verificación de la hipótesis se elaboró un análisis ANOVA de un solo factor para cada concentración de cada solución estándar, en donde se verificó que no existen diferencias significativas en las mediciones de absorbancias.

En los anexos se observa el análisis de cada una de las soluciones estándar para cada concentración planteada.

Se acepta la hipótesis nula que indica que todas las medias son iguales.

## CAPÍTULO IV

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 4.1. Conclusiones

Se verificó que existe linealidad en las curvas de calibración a través del análisis estadístico de los datos, dando como resultado un R cuadrado al 99% y existe una relación lineal directa de las mediciones por cada concentración, por lo que las curvas de calibración son aceptables.

El límite de detección también corresponde a un parámetro muy importante dentro del estudio, por lo que se pudo obtener resultados de 0,0547  $\mu\text{g/mL}$  / 0,0249  $\mu\text{g/mL}$  / 0,0459 mg/mL para la sucralosa, aspartamo y acesulfame K, respectivamente. La concentración mínima que permite una medición con exactitud en los resultados se obtuvo por el límite de cuantificación para sucralosa, aspartamo y acesulfame K con 0,0740  $\mu\text{g/mL}$  / 0,0252  $\mu\text{g/mL}$  y 0,0863 mg/mL.

Se obtuvo una buena repetibilidad y reproducibilidad del método para cada edulcorante, además, la incertidumbre calculada para cada método propuesto por cada solución estándar brindó resultados favorables puesto que se obtuvo valores de 7,44% / 19,08% y 21,5% para la sucralosa, aspartamo y acesulfame K, respectivamente. Estos parámetros calculados se encuentran dentro de los objetivos de calibración propuestos.

El sesgo de las mediciones también es aceptable puesto que el valor obtenido por cada solución estándar es cercano a cero en todos los casos.

Bibliográficamente se pudo determinar que la cromatografía HPLC es un método de detección de edulcorantes sintéticos de gran precisión con límites de detección muy sensibles, sin embargo, la espectrofotometría también es una buena opción para este tipo de análisis puesto que presenta una gran sensibilidad. Las curvas de calibración obtenidas son válidas y se pueden emplear en futuros trabajos de medición de espectrofotometría UV – VIS para la determinación de edulcorantes sintéticos.

Se pudo determinar que se acepta la hipótesis nula que indica que, todas las medias de las absorbancias observadas para cada concentración son iguales, para la metodología

de validación de curvas de calibración de soluciones estándar de edulcorantes sintéticos propuestas.

#### **4.2.Recomendaciones**

Realizar la validación de la metodología analítica por espectrofotometría infrarrojo y comparar los resultados con los obtenidos en el presente trabajo para evaluar la mejor metodología a emplear en la determinación de edulcorantes en bebidas azucaradas.

Verificar que las sustancias y reactivos se encuentran bajo condiciones aceptables previo a su utilización.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre, S. L. (2017). Validación del método para la determinación de vitamina C (ácido ascórbico) en alimentos por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC) en el laboratorio ECUACHEMLAB Cía. Ltda.  
<https://repositorio.uta.edu.ec:8443/jspui/handle/123456789/26329>
- Alvares, J. D. (2021). Determinación de clorofila A como indicador de polución en los embalses de las hidroeléctricas Agoyán y Pisayambo por el método espectrofotométrico UV visible.  
<https://repositorio.uta.edu.ec:8443/jspui/handle/123456789/32081>
- Barrios, A. (2020). Sustitutos del azúcar: Nuevos edulcorantes intensivos.  
<https://riull.ull.es/xmlui/handle/915/20462>
- BOECO. (2004). Boeco BBL Models | Manualzz. manualzz.com.  
<https://manualzz.com/doc/es/5440915/boeco-bbl-models>
- Cáceres Núñez, J. E. (2016). Evaluación del desempeño del método de ensayo de sulfatos en matrices de aguas claras en el Laboratorio de Control y Análisis de Alimentos LACONAL de la Universidad Técnica de Ambato.  
<https://repositorio.uta.edu.ec:8443/jspui/handle/123456789/23208>
- De Zan, M. M. (2011). Utilización de Quimiometría para Mejorar el Rendimiento de la Cromatografía Líquida de Alta Resolución. Aplicación a la Determinación de Sustancias de Interés Biológico en Muestras de Composición Compleja.  
<https://bibliotecavirtual.unl.edu.ar/handle/11185/299>
- Díaz, N. A., Ruiz, J. A. B., Reyes, E. F., Cejudo, A. G., Novo, J. J., Peinado, J. P., Meléndez-Valdés, F. T., & Fiñana, I. T. (2010). 8. Espectrofotometría: Espectros

de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas. 8.  
[https://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-  
mol/pdfs/08\\_ESPECTROFOTOMETRIA.pdf](https://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/08_ESPECTROFOTOMETRIA.pdf)

EURACHEM (Ed.). (1998). The fitness for purpose of analytical methods: A laboratory guide to method validation and related topics (Engl. ed. 1.0). LGC.

Fajardo, J., Caicedo, R., & Pinilla, J. (2018). Curva de calibración: Laboratorio de Ingeniería Química.  
[https://www.academia.edu/37439349/Lab\\_IQ\\_1\\_CURVA\\_DE\\_CALIBRACION](https://www.academia.edu/37439349/Lab_IQ_1_CURVA_DE_CALIBRACION)

Ferrer, I., & Thurman, E. M. (2010). Analysis of sucralose and other sweeteners in water and beverage samples by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217(25), 4127-4134.  
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.02.020>

Glorio, P. (2010). Técnicas modernas de investigación en Ciencia de Alimentos. Aplicaciones de Biología Molecular y uso de Lector de Micropozos.  
<http://repositorioslatinoamericanos.uchile.cl/handle/2250/1369179>

González, A. (2013). Posición de consenso sobre las bebidas con edulcorantes no calóricos y su relación con la salud.  
[http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=s0188-  
21982013000200001](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s0188-21982013000200001)

Grembecka, M., Baran, P., Błażewicz, A., Fijałek, Z., & Szefer, P. (2014). Simultaneous determination of aspartame, acesulfame-K, saccharin, citric acid and sodium benzoate in various food products using HPLC–CAD–UV/DAD.

European Food Research and Technology, 238(3), 357-365.  
<https://doi.org/10.1007/s00217-013-2111-x>

Guerini, P. S. (2015). Estudio comparativo sobre la eficiencia para la determinación cualitativa y cuantitativa de ácido ascórbico entre un método cromatográfico y un método electroquímico. <http://repositorio.usfq.edu.ec/handle/23000/5646>

Herrera, J. (2020). Validación y estimación de incertidumbre de un método analítico para cuantificar hierro total por el método colorimétrico de la fenantrolina en agua potable y natural. *Revista Científica de FAREM-Estelí: Medio ambiente, tecnología y desarrollo humano*, 34, 154-168.  
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7543837>

Kabirul, K. (2017). Quantitative determination of artificial sweeteners and sucrose in energy drinks and mango juice available in Dhaka city by UV-Spectrophotometric method [Thesis, BRAC University].  
<http://dspace.bracu.ac.bd/xmlui/handle/10361/9100>

Larrea, V., & Hernando, I. (2021). Aditivos edulcorantes intensivos.  
<https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/167345/Larrea?sequence=1>

Lau, O.-W., Luk, S.-F., & Chan, W.-M. (1988). Spectrophotometric determination of aspartame in soft drinks with ninhydrin as reagent. *Analyst*, 113(5), 765-768.  
<https://doi.org/10.1039/AN9881300765>

Legaz, M. E., San Cristóbal, M. S., Díaz, E. M., Borja, A., & Córdoba, C. V. (2011). Curso de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC): Prácticas de laboratorio y cuestiones teórico-prácticas. Parte I. Introducción y práctica de laboratorio: cálculo de la eficiencia y representación gráfica de la ecuación de

- van Deemter. REDUCA (Biología), 4(3), Article 3.  
<http://www.revistareduca.es/index.php/biologia/article/view/841>
- Martha, V. (2014). Universidad Privada Antenor Orrego: Estado actual y perspectivas del uso de edulcorantes en bebidas alimenticias.  
<http://200.62.226.186/handle/20.500.12759/822>
- Ospina, D. S., & Hernández, Y. M. (2018). Principios básicos de la cromatografía líquida de alto rendimiento para la separación y análisis de mezclas. 4, 8.  
<https://repository.uamerica.edu.co/bitstream/20.500.11839/7731/1/6131978-2018-1-IQ.pdf>
- Quattrocchi, O. A., Andrizzi, S. I., & Laba, R. F. (1992). Introducción a la HPLC: aplicación y práctica. Artes Gráficas Farro.
- Rasha, Y., Mohamed, K., Essam, K., Hoda, M., & Miranda, K. (2010). Kinetic spectrophotometric methods for the determination of artificial sweetener (sucralose) in tablets—Youssef—2011—Drug Testing and Analysis—Wiley Online Library.  
<https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/dta.208>
- Rodríguez, S. C., Pelleramo, R., Romero, C., Acevedo, H., & Vázquez, F. (2012). Validación de un método analítico para la determinación de boro en muestras foliares de Citrus reticulata. Tumbaga, 1(7), 9.  
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4550292>
- Romero, A., Escalada, J., Bregliani, M., & Pajares, A. (2016). Utilización de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) para determinar consumo

de sustrato. Informes Científicos - Técnicos UNPA, 8, 52.  
<https://doi.org/10.22305/ict-unpa.v8i2.172>

Sastry, C. S. P., Srinivas, K. R., Prasad, K. M. M. K., & Krishnamacharyulu, A. G. (1995). Rapid, routine method for the analysis of the non-nutritive sweeteners in foodstuffs. *Analyst*, 120(6), 1793-1797.  
<https://doi.org/10.1039/AN9952001793>

Thermo. (2010). Espectrofotómetros UV-Visible Thermo Scientific Serie GENESYS 10S. [https://www.tecnofrom.com/moduloProductos/noti\\_23/file.pdf](https://www.tecnofrom.com/moduloProductos/noti_23/file.pdf)

UNODC. (2010). Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos. 76.  
[https://www.unodc.org/documents/scientific/Validation\\_Manual\\_STNAR41\\_Ebook\\_S.pdf](https://www.unodc.org/documents/scientific/Validation_Manual_STNAR41_Ebook_S.pdf)

## ANEXOS



**Anexo 1** Pesaje de estándares.



**Anexo 2** Disolución de estándares.



**Anexo 3** Preparación de soluciones estándar del aspartamo.



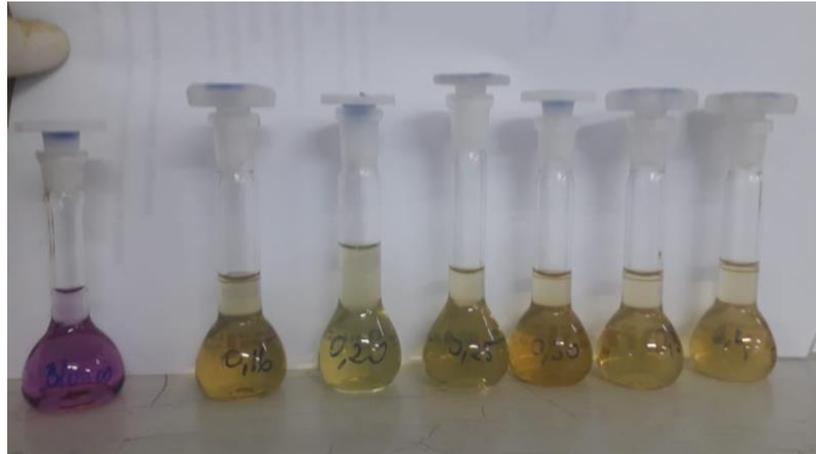
**Anexo 4** Preparación de soluciones estándar del acesulfame K.



**Anexo 5** Preparación de soluciones búfer.



**Anexo 6** Preparación de soluciones cromóforo.



**Anexo 7** Soluciones estándar de la sucralosa.



**Anexo 8** Soluciones en Baño María.



**Anexo 9** Mediciones de las muestras con el espectrofotómetro.

## Resultados del análisis ANOVA

### Anexo 10 Resultados ANOVA Sucralosa

#### DETERMINACIÓN DE SUCRALOSA 610 nm

<b>Condiciones ambientales</b>	25 °C 85%	25 °C 85%	25 °C 85%	25 °C 85%	25 °C 85%
<b>Responsable de la realizacion</b>	Alison C.	Alison C.	Alison C.	Alison C.	Alison C.
<b>Fecha de realizacion</b>	12/28/2021	12/28/2021	12/28/2021	12/28/2021	12/28/2021
<b>Matriz</b>	<b>4 µg/mL</b>				
<b>Repeticiones/Grupos</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>1</b>	0.130	0.135	0.132	0.133	0.134
<b>2</b>	0.134	0.133	0.131	0.132	0.136
<b>3</b>	0.135	0.132	0.130	0.131	0.134
<b>4</b>	0.134	0.131	0.134	0.134	0.135
<b>5</b>	0.136	0.130	0.133	0.132	0.130
<b>Li</b>	0.134	0.132	0.132	0.132	0.134
<b>L</b>			0.13		
<b>n</b>			25		
<b>B</b>			5		
<b>W</b>			5		
<b>Var. grupos</b>	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
<b>C</b>			0.29		
<b>C tabla</b>			0.54		
<b>Uniformidad</b>			UNIFORME		
<b>Valor nominal</b>			0.14		
<b>Sesgo</b>			0.007		

#### ANOVA

<b>(xi-Li)^2</b>	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
<b>SDCB</b>			0.0000		
<b>SDCw</b>			0.0001		
<b>DCMB</b>			0.0000		
<b>DCMw</b>			0.0000		
<b>F calc.</b>			1.10		
<b>F tablas</b>			2.87		
<b>Aceptacion o Rechazo</b>	No existe diferencia significativa				
<b>SL<sup>2</sup></b>			0.0000		
<b>Sr</b>			0.0019		
<b>SR</b>			0.0019		

### DETERMINACIÓN DE SUCR.

<b>Condiciones ambientales</b>	25 °C 85%	25 °C 85%	25 °C 85%	25 °C 85%	25 °C 85%
<b>Responsable de la realizacion</b>	Alison C.	Alison C.	Alison C.	Alison C.	Alison C.
<b>Fecha de realizacion</b>	12/28/2021	12/28/2021	12/28/2021	12/28/2021	12/28/2021
<b>Matriz</b>	<b>6 µg/mL</b>				
<b>Repeticiones/Grupos</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>1</b>	0.196	0.198	0.197	0.197	0.195
<b>2</b>	0.194	0.195	0.198	0.196	0.194
<b>3</b>	0.197	0.197	0.195	0.197	0.193
<b>4</b>	0.193	0.194	0.196	0.195	0.196
<b>5</b>	0.196	0.199	0.195	0.198	0.195
<b>Li</b>	0.195	0.197	0.196	0.197	0.195
<b>L</b>	0.20				
<b>n</b>	25				
<b>B</b>	5				
<b>W</b>	5				
<b>Var. grupos</b>	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
<b>C</b>	0.38				
<b>C tabla</b>	0.54				
<b>Uniformidad</b>	UNIFORME				
<b>Valor nominal</b>	0.19				
<b>Sesgo</b>	-0.005				

### ANOVA

<b>(xi-Li)^2</b>	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
<b>SDCB</b>	0.0000				
<b>SDCw</b>	0.0000				
<b>DCMB</b>	0.0000				
<b>DCMw</b>	0.0000				
<b>F calc.</b>	1.79				
<b>F tablas</b>	2.87				
<b>Aceptacion o Rechazo</b>	No existe diferencia significativa				
<b>SL<sup>2</sup></b>	0.00000				
<b>Sr</b>	0.0015				
<b>SR</b>	0.0016				

### DETERMINACIÓN DE SUCR.

<b>Condiciones ambientales</b>	25 °C 85%	25 °C 85%	25 °C 85%	25 °C 85%	25 °C 85%
<b>Responsable de la realizacion</b>	Alison C.	Alison C.	Alison C.	Alison C.	Alison C.
<b>Fecha de realizacion</b>	12/28/2021	12/28/2021	12/28/2021	12/28/2021	12/28/2021
<b>Matriz</b>	<b>8 µg/mL</b>				
<b>Repeticiones/Grupos</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>1</b>	0.246	0.244	0.243	0.246	0.240
<b>2</b>	0.245	0.243	0.242	0.245	0.246
<b>3</b>	0.247	0.255	0.250	0.260	0.245
<b>4</b>	0.243	0.243	0.242	0.246	0.246
<b>5</b>	0.246	0.244	0.243	0.244	0.245
<b>Li</b>	0.245	0.246	0.244	0.248	0.244
<b>L</b>	0.25				
<b>n</b>	25				
<b>B</b>	5				
<b>W</b>	5				
<b>Var. grupos</b>	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
<b>C</b>	0.49				
<b>C tabla</b>	0.54				
<b>Uniformidad</b>	UNIFORME				
<b>Valor nominal</b>	0.24				
<b>Sesgo</b>	-0.005				

### ANOVA

<b>(xi-Li)^2</b>	0.0000	0.0001	0.0000	0.0002	0.0000
<b>SDCB</b>	0.0001				
<b>SDCw</b>	0.0004				
<b>DCMB</b>	0.0000				
<b>DCMw</b>	0.0000				
<b>F calc.</b>	0.74				
<b>F tablas</b>	2.87				
<b>Aceptacion o Rechazo</b>	No existe diferencia significativa				
<b>SL<sup>2</sup></b>	0.0000				
<b>Sr</b>	0.0043				
<b>SR</b>	0.0044				

**DETERMINACIÓN DE SUCR.**

<b>Condiciones ambientales</b>	25 °C 85%	25 °C 85%	25 °C 85%	25 °C 85%	25 °C 85%
<b>Responsable de la realizacion</b>	Alison C.	Alison C.	Alison C.	Alison C.	Alison C.
<b>Fecha de realizacion</b>	12/28/2021	12/28/2021	12/28/2021	12/28/2021	12/28/2021
<b>Matriz</b>	<b>10 µg/mL</b>				
<b>Repeticiones/Grupos</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>1</b>	0.289	0.291	0.291	0.292	0.290
<b>2</b>	0.290	0.287	0.290	0.291	0.292
<b>3</b>	0.287	0.289	0.289	0.290	0.289
<b>4</b>	0.291	0.288	0.289	0.290	0.291
<b>5</b>	0.291	0.290	0.290	0.292	0.289
<b>Li</b>	0.290	0.289	0.290	0.291	0.290
<b>L</b>	0.29				
<b>n</b>	25				
<b>B</b>	5				
<b>W</b>	5				
<b>Var. grupos</b>	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
<b>C</b>	0.32				
<b>C tabla</b>	0.54				
<b>Uniformidad</b>	UNIFORME				
<b>Valor nominal</b>	0.29				
<b>Sesgo</b>	0.001				

**ANOVA**

<b>(xi-Li)^2</b>	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
<b>SDCB</b>	0.0000				
<b>SDCw</b>	0.0000				
<b>DCMB</b>	0.0000				
<b>DCMw</b>	0.0000				
<b>F calc.</b>	1.59				
<b>F tablas</b>	2.87				
<b>Aceptacion o Rechazo</b>	No existe diferencia significativa				
<b>SL<sup>2</sup></b>	0.0000				
<b>Sr</b>	0.0013				
<b>SR</b>	0.0014				

### DETERMINACIÓN DE SUCR.

<b>Condiciones ambientales</b>	25 °C 85%	25 °C 85%	25 °C 85%	25 °C 85%	25 °C 85%
<b>Responsable de la realizacion</b>	Alison C.	Alison C.	Alison C.	Alison C.	Alison C.
<b>Fecha de realizacion</b>	12/28/2021	12/28/2021	12/28/2021	12/28/2021	12/28/2021
<b>Matriz</b>	<b>12 µg/mL</b>				
<b>Repeticiones/Grupos</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>1</b>	0.335	0.337	0.333	0.333	0.333
<b>2</b>	0.337	0.333	0.332	0.333	0.335
<b>3</b>	0.336	0.333	0.336	0.335	0.337
<b>4</b>	0.334	0.333	0.335	0.337	0.333
<b>5</b>	0.333	0.335	0.337	0.333	0.334
<b>Li</b>	0.335	0.334	0.335	0.334	0.334
<b>L</b>	0.33				
<b>n</b>	25				
<b>B</b>	5				
<b>W</b>	5				
<b>Var. grupos</b>	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
<b>C</b>	0.27				
<b>C tabla</b>	0.54				
<b>Uniformidad</b>	UNIFORME				
<b>Valor nominal</b>	0.34				
<b>Sesgo</b>	0.007				

### ANOVA

<b>(xi-Li)^2</b>	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
<b>SDCB</b>	0.0000				
<b>SDCw</b>	0.0001				
<b>DCMB</b>	0.0000				
<b>DCMw</b>	0.0000				
<b>F calc.</b>	0.18				
<b>F tablas</b>	2.87				
<b>Aceptacion o Rechazo</b>	No existe diferencia significativa				
<b>SL<sup>2</sup></b>	0.0000				
<b>Sr</b>	0.0018				
<b>SR</b>	0.0019				

**DETERMINACIÓN DE SUCR.**

<b>Condiciones ambientales</b>	25 °C 85%	25 °C 85%	25 °C 85%	25 °C 85%	25 °C 85%
<b>Responsable de la realizacion</b>	Alison C.	Alison C.	Alison C.	Alison C.	Alison C.
<b>Fecha de realizacion</b>	12/28/2021	12/28/2021	12/28/2021	12/28/2021	12/28/2021
<b>Matriz</b>	<b>14 µg/mL</b>				
<b>Repeticiones/Grupos</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>1</b>	0.398	0.395	0.399	0.399	0.395
<b>2</b>	0.395	0.399	0.397	0.395	0.398
<b>3</b>	0.399	0.399	0.395	0.398	0.395
<b>4</b>	0.394	0.395	0.395	0.395	0.399
<b>5</b>	0.395	0.398	0.398	0.394	0.396
<b>Li</b>	0.396	0.397	0.397	0.396	0.397
<b>L</b>	0.40				
<b>n</b>	25				
<b>B</b>	5				
<b>W</b>	5				
<b>Var. grupos</b>	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
<b>C</b>	0.23				
<b>C tabla</b>	0.54				
<b>Uniformidad</b>	UNIFORME				
<b>Valor nominal</b>	0.39				
<b>Sesgo</b>	-0.005				

**ANOVA**

<b>(xi-Li)^2</b>	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
<b>SDCB</b>	0.0000				
<b>SDCw</b>	0.0001				
<b>DCMB</b>	0.0000				
<b>DCMw</b>	0.0000				
<b>F calc.</b>	0.22				
<b>F tablas</b>	2.87				
<b>Aceptacion o Rechazo</b>	No existe diferencia significativa				
<b>SL<sup>2</sup></b>	0.0000				
<b>Sr</b>	0.0020				
<b>SR</b>	0.0022				

**DETERMINACIÓN DE SUCR.**

<b>Condiciones ambientales</b>	25 °C 85%	25 °C 85%	25 °C 85%	25 °C 85%	25 °C 85%
<b>Responsable de la realizacion</b>	Alison C.	Alison C.	Alison C.	Alison C.	Alison C.
<b>Fecha de realizacion</b>	12/28/2021	12/28/2021	12/28/2021	12/28/2021	12/28/2021
<b>Matriz</b>	<b>16 µg/mL</b>				
<b>Repeticiones/Grupos</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>1</b>	0.441	0.443	0.439	0.442	0.440
<b>2</b>	0.443	0.439	0.442	0.440	0.441
<b>3</b>	0.439	0.442	0.440	0.441	0.443
<b>4</b>	0.442	0.447	0.448	0.443	0.439
<b>5</b>	0.440	0.441	0.443	0.439	0.445
<b>Li</b>	0.441	0.442	0.442	0.441	0.442
<b>L</b>	0.44				
<b>n</b>	25				
<b>B</b>	5				
<b>W</b>	5				
<b>Var. grupos</b>	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
<b>C</b>	0.39				
<b>C tabla</b>	0.54				
<b>Uniformidad</b>	UNIFORME				
<b>Valor nominal</b>	0.44				
<b>Sesgo</b>	0.001				

**ANOVA**

<b>(xi-Li)^2</b>	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
<b>SDCB</b>	0.0000				
<b>SDCw</b>	0.0001				
<b>DCMB</b>	0.0000				
<b>DCMw</b>	0.0000				
<b>F calc.</b>	0.39				
<b>F tablas</b>	2.87				
<b>Aceptacion o Rechazo</b>	No existe diferencia significativa				
<b>SL<sup>2</sup></b>	0.0000				
<b>Sr</b>	0.0025				
<b>SR</b>	0.0027				

**Anexo 11 Resultados ANOVA Aspartamo**

**DETERMINACIÓN DE ASPARTAMO 585 nm**

<b>Condiciones ambientales</b>	25 °C 85%	25 °C 85%	25 °C 85%	25 °C 85%	25 °C 85%
<b>Responsable de la realizacion</b>	Alison C.	Alison C.	Alison C.	Alison C.	Alison C.
<b>Fecha de realizacion</b>	12/28/2021	12/28/2021	12/28/2021	12/28/2021	12/28/2021
<b>Matriz</b>	<b>10 µg/mL</b>				
<b>Repeticiones/Grupos</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>1</b>	0.042	0.040	0.041	0.043	0.043
<b>2</b>	0.042	0.041	0.041	0.042	0.043
<b>3</b>	0.042	0.042	0.041	0.043	0.043
<b>4</b>	0.042	0.040	0.040	0.041	0.043
<b>5</b>	0.042	0.040	0.041	0.043	0.043
<b>Li</b>	0.042	0.041	0.041	0.042	0.043
<b>L</b>			0.0418		
<b>n</b>			25		
<b>B</b>			5		
<b>W</b>			5		
<b>Var. grupos</b>	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
<b>C</b>			0.44		
<b>C tabla</b>			0.54		
<b>Uniformidad</b>			UNIFORME		
<b>Valor nominal</b>			0.04		
<b>Sesgo</b>			0.000		
<b>ANOVA</b>					
<b>(xi-Li)^2</b>	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
<b>SDCB</b>			0.0000		
<b>SDCW</b>			0.0000		
<b>DCMB</b>			0.0000		
<b>DCMW</b>			0.0000		
<b>F calc.</b>			14.83		
<b>F tablas</b>			2.87		
<b>Aceptacion o Rechazo</b>			Existe diferencia significativa		
<b>SL<sup>2</sup></b>			0.0000		
<b>Sr</b>			0.0006		
<b>SR</b>			0.0012		

## DETERMINACIÓN DE ASPAR

<b>Condiciones ambientales</b>	25 °C 85%	25 °C 85%	25 °C 85%	25 °C 85%	25 °C 85%
<b>Responsable de la realizacion</b>	Alison C.	Alison C.	Alison C.	Alison C.	Alison C.
<b>Fecha de realizacion</b>	12/28/2021	12/28/2021	12/28/2021	12/28/2021	12/28/2021
<b>Matriz</b>	<b>15 µg/mL</b>				
<b>Repeticiones/Grupos</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>1</b>	0.052	0.051	0.053	0.052	0.051
<b>2</b>	0.051	0.053	0.054	0.051	0.051
<b>3</b>	0.053	0.052	0.051	0.051	0.053
<b>4</b>	0.052	0.051	0.052	0.053	0.052
<b>5</b>	0.055	0.052	0.051	0.052	0.057
<b>Li</b>	0.053	0.052	0.052	0.052	0.053
<b>L</b>	0.05				
<b>n</b>	25				
<b>B</b>	5				
<b>W</b>	5				
<b>Var. grupos</b>	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
<b>C</b>	0.53				
<b>C tabla</b>	0.54				
<b>Uniformidad</b>	UNIFORME				
<b>Valor nominal</b>	0.05				
<b>Sesgo</b>	-0.001				
<b>ANOVA</b>					
<b>(xi-Li)^2</b>	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
<b>SDCB</b>	0.0000				
<b>SDCw</b>	0.0000				
<b>DCMB</b>	0.0000				
<b>DCMw</b>	0.0000				
<b>F calc.</b>	0.45				
<b>F tablas</b>	2.87				
<b>Aceptacion o Rechazo</b>	No existe diferencia significativa				
<b>SL<sup>2</sup></b>	0.00000				
<b>Sr</b>	0.0015				
<b>SR</b>	0.0016				

### DETERMINACIÓN DE ASPAR

<b>Condiciones ambientales</b>	25 °C 85%	25 °C 85%	25 °C 85%	25 °C 85%	25 °C 85%
<b>Responsable de la realizacion</b>	Alison C.	Alison C.	Alison C.	Alison C.	Alison C.
<b>Fecha de realizacion</b>	12/28/2021	12/28/2021	12/28/2021	12/28/2021	12/28/2021
<b>Matriz</b>	<b>20 µg/mL</b>				
<b>Repeticiones/Grupos</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>1</b>	0.061	0.063	0.061	0.060	0.063
<b>2</b>	0.065	0.061	0.060	0.063	0.061
<b>3</b>	0.061	0.064	0.063	0.061	0.063
<b>4</b>	0.060	0.063	0.061	0.066	0.061
<b>5</b>	0.063	0.061	0.063	0.061	0.060
<b>Li</b>	0.062	0.062	0.062	0.062	0.062
<b>L</b>			0.06		
<b>n</b>			25		
<b>B</b>			5		
<b>W</b>			5		
<b>Var. grupos</b>	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
<b>C</b>			0.38		
<b>C tabla</b>			0.54		
<b>Uniformidad</b>			UNIFORME		
<b>Valor nominal</b>			0.06		
<b>Sesgo</b>			-0.001		
<b>ANOVA</b>					
<b>(xi-Li)^2</b>	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
<b>SDCB</b>			0.0000		
<b>SDCw</b>			0.0001		
<b>DCMB</b>			0.0000		
<b>DCMw</b>			0.0000		
<b>F calc.</b>			0.21		
<b>F tablas</b>			2.87		
<b>Aceptacion o Rechazo</b>	No existe diferencia significativa				
<b>SL<sup>2</sup></b>			0.0000		
<b>Sr</b>			0.0017		
<b>SR</b>			0.0019		

## DETERMINACIÓN DE ASPAR

<b>Condiciones ambientales</b>	25 °C 85%	25 °C 85%	25 °C 85%	25 °C 85%	25 °C 85%
<b>Responsable de la realizacion</b>	Alison C.	Alison C.	Alison C.	Alison C.	Alison C.
<b>Fecha de realizacion</b>	12/28/2021	12/28/2021	12/28/2021	12/28/2021	12/28/2021
<b>Matriz</b>	<b>25 µg/mL</b>				
<b>Repeticiones/Grupos</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>1</b>	0.070	0.071	0.069	0.071	0.071
<b>2</b>	0.071	0.069	0.071	0.071	0.070
<b>3</b>	0.069	0.071	0.075	0.070	0.073
<b>4</b>	0.071	0.071	0.070	0.072	0.069
<b>5</b>	0.073	0.070	0.071	0.069	0.071
<b>Li</b>	0.071	0.070	0.071	0.071	0.071
<b>L</b>	0.07				
<b>n</b>	25				
<b>B</b>	5				
<b>W</b>	5				
<b>Var. grupos</b>	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
<b>C</b>	0.44				
<b>C tabla</b>	0.54				
<b>Uniformidad</b>	UNIFORME				
<b>Valor nominal</b>	0.07				
<b>Sesgo</b>	-0.001				
<b>ANOVA</b>					
<b>(xi-Li)^2</b>	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
<b>SDCB</b>	0.0000				
<b>SDCw</b>	0.0000				
<b>DCMB</b>	0.0000				
<b>DCMw</b>	0.0000				
<b>F calc.</b>	0.19				
<b>F tablas</b>	2.87				
<b>Aceptacion o Rechazo</b>	No existe diferencia significativa				
<b>SL<sup>2</sup></b>	0.0000				
<b>Sr</b>	0.0015				
<b>SR</b>	0.0016				

## DETERMINACIÓN DE ASPAR

<b>Condiciones ambientales</b>	25 °C 85%	25 °C 85%	25 °C 85%	25 °C 85%	25 °C 85%
<b>Responsable de la realizacion</b>	Alison C.	Alison C.	Alison C.	Alison C.	Alison C.
<b>Fecha de realizacion</b>	12/28/2021	12/28/2021	12/28/2021	12/28/2021	12/28/2021
<b>Matriz</b>	<b>30 µg/mL</b>				
<b>Repeticiones/Grupos</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>1</b>	0.079	0.081	0.078	0.078	0.077
<b>2</b>	0.081	0.078	0.083	0.077	0.079
<b>3</b>	0.078	0.073	0.087	0.079	0.081
<b>4</b>	0.085	0.077	0.079	0.081	0.087
<b>5</b>	0.077	0.079	0.081	0.078	0.078
<b>Li</b>	0.080	0.078	0.082	0.079	0.080
<b>L</b>			0.08		
<b>n</b>			25		
<b>B</b>			5		
<b>W</b>			5		
<b>Var. grupos</b>	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
<b>C</b>			0.32		
<b>C tabla</b>			0.54		
<b>Uniformidad</b>			UNIFORME		
<b>Valor nominal</b>			0.08		
<b>Sesgo</b>			0.000		
<b>ANOVA</b>					
<b>(xi-Li)^2</b>	0.0000	0.0000	0.0001	0.0000	0.0001
<b>SDCB</b>			0.0000		
<b>SDCw</b>			0.0002		
<b>DCMB</b>			0.0000		
<b>DCMw</b>			0.0000		
<b>F calc.</b>			1.23		
<b>F tablas</b>			2.87		
<b>Aceptacion o Rechazo</b>	No existe diferencia significativa				
<b>SL<sup>2</sup></b>			0.0000		
<b>Sr</b>			0.0032		
<b>SR</b>			0.0032		

## DETERMINACIÓN DE ASPAR

<b>Condiciones ambientales</b>	25 °C 85%	25 °C 85%	25 °C 85%	25 °C 85%	25 °C 85%
<b>Responsable de la realizacion</b>	Alison C.	Alison C.	Alison C.	Alison C.	Alison C.
<b>Fecha de realizacion</b>	12/28/2021	12/28/2021	12/28/2021	12/28/2021	12/28/2021
<b>Matriz</b>	<b>35 µg/mL</b>				
<b>Repeticiones/Grupos</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>1</b>	0.088	0.086	0.087	0.085	0.089
<b>2</b>	0.086	0.093	0.085	0.089	0.088
<b>3</b>	0.087	0.085	0.089	0.095	0.086
<b>4</b>	0.085	0.089	0.088	0.086	0.091
<b>5</b>	0.095	0.088	0.090	0.087	0.085
<b>Li</b>	0.088	0.088	0.088	0.088	0.088
<b>L</b>			0.09		
<b>n</b>			25		
<b>B</b>			5		
<b>W</b>			5		
<b>Var. grupos</b>	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
<b>C</b>			0.31		
<b>C tabla</b>			0.54		
<b>Uniformidad</b>			UNIFORME		
<b>Valor nominal</b>			0.09		
<b>Sesgo</b>			0.000		
<b>ANOVA</b>					
<b>(xi-Li)^2</b>	0.0001	0.0000	0.0000	0.0001	0.0000
<b>SDCB</b>			0.0000		
<b>SDCw</b>			0.0002		
<b>DCMB</b>			0.0000		
<b>DCMw</b>			0.0000		
<b>F calc.</b>			0.04		
<b>F tablas</b>			2.87		
<b>Aceptacion o Rechazo</b>	No existe diferencia significativa				
<b>SL<sup>2</sup></b>			0.0000		
<b>Sr</b>			0.0032		
<b>SR</b>			0.0035		

### DETERMINACIÓN DE ASPAR

<b>Condiciones ambientales</b>	25 °C 85%	25 °C 85%	25 °C 85%	25 °C 85%	25 °C 85%
<b>Responsable de la realizacion</b>	Alison C.	Alison C.	Alison C.	Alison C.	Alison C.
<b>Fecha de realizacion</b>	12/28/2021	12/28/2021	12/28/2021	12/28/2021	12/28/2021
<b>Matriz</b>	<b>40 µg/mL</b>				
<b>Repeticiones/Grupos</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>1</b>	0.101	0.101	0.102	0.101	0.101
<b>2</b>	0.101	0.102	0.101	0.101	0.101
<b>3</b>	0.102	0.101	0.101	0.102	0.101
<b>4</b>	0.102	0.101	0.102	0.101	0.102
<b>5</b>	0.101	0.102	0.101	0.102	0.101
<b>Li</b>	0.101	0.101	0.101	0.101	0.101
<b>L</b>	0.10				
<b>n</b>	25				
<b>B</b>	5				
<b>W</b>	5				
<b>Var. grupos</b>	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
<b>C</b>	0.25				
<b>C tabla</b>	0.54				
<b>Uniformidad</b>	UNIFORME				
<b>Valor nominal</b>	0.10				
<b>Sesgo</b>	-0.003				
<b>ANOVA</b>					
<b>(xi-Li)^2</b>	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
<b>SDCB</b>	0.0000				
<b>SDCw</b>	0.0000				
<b>DCMB</b>	0.0000				
<b>DCMw</b>	0.0000				
<b>F calc.</b>	0.14				
<b>F tablas</b>	2.87				
<b>Aceptacion o Rechazo</b>	No existe diferencia significativa				
<b>SL<sup>2</sup></b>	0.0000				
<b>Sr</b>	0.0005				
<b>SR</b>	0.0005				

## DETERMINACIÓN DE ASPAR

<b>Condiciones ambientales</b>	25 °C 85%	25 °C 85%	25 °C 85%	25 °C 85%	25 °C 85%
<b>Responsable de la realizacion</b>	Alison C.	Alison C.	Alison C.	Alison C.	Alison C.
<b>Fecha de realizacion</b>	12/28/2021	12/28/2021	12/28/2021	12/28/2021	12/28/2021
<b>Matriz</b>	<b>45 µg/mL</b>				
<b>Repeticiones/Grupos</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>1</b>	0.116	0.114	0.117	0.115	0.114
<b>2</b>	0.114	0.122	0.115	0.114	0.116
<b>3</b>	0.117	0.115	0.114	0.116	0.114
<b>4</b>	0.115	0.114	0.116	0.114	0.117
<b>5</b>	0.125	0.116	0.119	0.121	0.125
<b>Li</b>	0.117	0.116	0.116	0.116	0.117
<b>L</b>			0.12		
<b>n</b>			25		
<b>B</b>			5		
<b>W</b>			5		
<b>Var. grupos</b>	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
<b>C</b>			0.33		
<b>C tabla</b>			0.54		
<b>Uniformidad</b>			UNIFORME		
<b>Valor nominal</b>			0.11		
<b>Sesgo</b>			-0.009		
<b>ANOVA</b>					
<b>(xi-Li)^2</b>	0.0001	0.0000	0.0000	0.0000	0.0001
<b>SDCB</b>			0.0000		
<b>SDCw</b>			0.0003		
<b>DCMB</b>			0.0000		
<b>DCMw</b>			0.0000		
<b>F calc.</b>			0.17		
<b>F tablas</b>			2.87		
<b>Aceptacion o Rechazo</b>	No existe diferencia significativa				
<b>SL<sup>2</sup></b>			0.0000		
<b>Sr</b>			0.0036		
<b>SR</b>			0.0038		

Anexo 12 Resultados ANOVA Acesulfame K

DETERMINACIÓN DE ACESULFAME K 246 nm

<b>Condiciones ambientales</b>	25 °C 85%	25 °C 85%	25 °C 85%	25 °C 85%	25 °C 85%
<b>Responsable de la realizacion</b>	Alison C.	Alison C.	Alison C.	Alison C.	Alison C.
<b>Fecha de realizacion</b>	28/12/2021	28/12/2021	28/12/2021	28/12/2021	28/12/2021
<b>Matriz</b>	<b>0,16 mg/mL</b>				
<b>Repeticiones/Grupos</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>1</b>	0,045	0,044	0,043	0,046	0,046
<b>2</b>	0,046	0,043	0,046	0,046	0,045
<b>3</b>	0,043	0,046	0,046	0,045	0,043
<b>4</b>	0,046	0,046	0,046	0,044	0,043
<b>5</b>	0,043	0,045	0,044	0,043	0,047
<b>Li</b>	0,045	0,045	0,045	0,045	0,045
<b>L</b>			0,04		
<b>n</b>			25		
<b>B</b>			5		
<b>W</b>			5		
<b>Var. grupos</b>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
<b>C</b>			0,29		
<b>C tabla</b>			0,54		
<b>Uniformidad</b>			UNIFORME		
<b>Valor nominal</b>			0,05		
<b>Sesgo</b>			0,001		
<b>ANOVA</b>					
<b>(xi-Li)^2</b>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
<b>SDCB</b>			0,0000		
<b>SDCw</b>			0,0000		
<b>DCMB</b>			0,0000		
<b>DCMw</b>			0,0000		
<b>F calc.</b>			0,05		
<b>F tablas</b>			2,87		
<b>Aceptacion o Rechazo</b>	No existe diferencia significativa				
<b>SL<sup>2</sup></b>			0,0000		
<b>Sr</b>			0,0015		
<b>SR</b>			0,0016		

## DETERMINACIÓN DE ACEA

<b>Condiciones ambientales</b>	25 °C 85%	25 °C 85%	25 °C 85%	25 °C 85%	25 °C 85%
<b>Responsable de la realizacion</b>	Alison C.	Alison C.	Alison C.	Alison C.	Alison C.
<b>Fecha de realizacion</b>	28/12/2021	28/12/2021	28/12/2021	28/12/2021	28/12/2021
<b>Matriz</b>	<b>0,20 mg/mL</b>				
<b>Repeticiones/Grupos</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>1</b>	0,058	0,057	0,057	0,056	0,063
<b>2</b>	0,057	0,059	0,056	0,059	0,058
<b>3</b>	0,057	0,056	0,059	0,058	0,057
<b>4</b>	0,059	0,058	0,063	0,057	0,057
<b>5</b>	0,058	0,058	0,057	0,057	0,056
<b>Li</b>	0,058	0,058	0,058	0,057	0,058
<b>L</b>			0,06		
<b>n</b>			25		
<b>B</b>			5		
<b>W</b>			5		
<b>Var. grupos</b>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
<b>C</b>			0,41		
<b>C tabla</b>			0,54		
<b>Uniformidad</b>			UNIFORME		
<b>Valor nominal</b>			0,06		
<b>Sesgo</b>			-0,001		
<b>ANOVA</b>					
<b>(xi-Li)^2</b>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
<b>SDCB</b>			0,0000		
<b>SDCW</b>			0,0001		
<b>DCMB</b>			0,0000		
<b>DCMw</b>			0,0000		
<b>F calc.</b>			0,23		
<b>F tablas</b>			2,87		
<b>Aceptacion o Rechazo</b>	No existe diferencia significativa				
<b>SL<sup>2</sup></b>			0,00000		
<b>Sr</b>			0,0019		
<b>SR</b>			0,0021		

**DETERMINACIÓN DE ACEL**

<b>Condiciones ambientales</b>	25 °C 85%	25 °C 85%	25 °C 85%	25 °C 85%	25 °C 85%
<b>Responsable de la realizacion</b>	Alison C.	Alison C.	Alison C.	Alison C.	Alison C.
<b>Fecha de realizacion</b>	12/28/2021	12/28/2021	12/28/2021	12/28/2021	12/28/2021
<b>Matriz</b>	<b>0,25 mg/mL</b>				
<b>Repeticiones/Grupos</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>1</b>	0.069	0.070	0.068	0.068	0.071
<b>2</b>	0.070	0.068	0.078	0.071	0.069
<b>3</b>	0.068	0.076	0.071	0.069	0.070
<b>4</b>	0.074	0.071	0.069	0.070	0.068
<b>5</b>	0.071	0.069	0.070	0.075	0.075
<b>Li</b>	0.070	0.071	0.071	0.071	0.071
<b>L</b>			0.07		
<b>n</b>			25		
<b>B</b>			5		
<b>W</b>			5		
<b>Var. grupos</b>	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
<b>C</b>			0.35		
<b>C tabla</b>			0.54		
<b>Uniformidad</b>			UNIFORME		
<b>Valor nominal</b>			0.07		
<b>Sesgo</b>			-0.002		
<b>ANOVA</b>					
<b>(xi-Li)^2</b>	0.0000	0.0000	0.0001	0.0000	0.0000
<b>SDCB</b>			0.0000		
<b>SDCW</b>			0.0002		
<b>DCMB</b>			0.0000		
<b>DCMW</b>			0.0000		
<b>F calc.</b>			0.05		
<b>F tablas</b>			2.87		
<b>Aceptacion o Rechazo</b>	No existe diferencia significativa				
<b>SL<sup>2</sup></b>			0.0000		
<b>Sr</b>			0.0030		
<b>SR</b>			0.0033		

**DETERMINACIÓN DE ACEA**

<b>Condiciones ambientales</b>	25 °C 85%	25 °C 85%	25 °C 85%	25 °C 85%	25 °C 85%
<b>Responsable de la realizacion</b>	Alison C.	Alison C.	Alison C.	Alison C.	Alison C.
<b>Fecha de realizacion</b>	12/28/2021	12/28/2021	12/28/2021	12/28/2021	12/28/2021
<b>Matriz</b>	<b>0,30 mg/mL</b>				
<b>Repeticiones/Grupos</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>1</b>	0.083	0.084	0.085	0.084	0.082
<b>2</b>	0.084	0.085	0.084	0.082	0.083
<b>3</b>	0.085	0.093	0.082	0.083	0.084
<b>4</b>	0.090	0.082	0.083	0.088	0.085
<b>5</b>	0.082	0.083	0.089	0.085	0.088
<b>Li</b>	0.085	0.085	0.085	0.084	0.084
<b>L</b>	0.08				
<b>n</b>	25				
<b>B</b>	5				
<b>W</b>	5				
<b>Var. grupos</b>	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
<b>C</b>	0.41				
<b>C tabla</b>	0.54				
<b>Uniformidad</b>	UNIFORME				
<b>Valor nominal</b>	0.08				
<b>Sesgo</b>	-0.005				
<b>ANOVA</b>					
<b>(xi-Li)^2</b>	0.0000	0.0001	0.0000	0.0000	0.0000
<b>SDCB</b>	0.0000				
<b>SDCW</b>	0.0002				
<b>DCMB</b>	0.0000				
<b>DCMw</b>	0.0000				
<b>F calc.</b>	0.09				
<b>F tablas</b>	2.87				
<b>Aceptacion o Rechazo</b>	No existe diferencia significativa				
<b>SL<sup>2</sup></b>	0.0000				
<b>Sr</b>	0.0031				
<b>SR</b>	0.0033				

**DETERMINACIÓN DE ACEL**

<b>Condiciones ambientales</b>	25 °C 85%	25 °C 85%	25 °C 85%	25 °C 85%	25 °C 85%
<b>Responsable de la realizacion</b>	Alison C.	Alison C.	Alison C.	Alison C.	Alison C.
<b>Fecha de realizacion</b>	12/28/2021	12/28/2021	12/28/2021	12/28/2021	12/28/2021
<b>Matriz</b>	<b>0,35 mg/mL</b>				
<b>Repeticiones/Grupos</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>1</b>	0.094	0.095	0.096	0.095	0.093
<b>2</b>	0.095	0.098	0.095	0.098	0.094
<b>3</b>	0.096	0.095	0.093	0.094	0.100
<b>4</b>	0.095	0.093	0.099	0.095	0.096
<b>5</b>	0.099	0.094	0.095	0.096	0.095
<b>Li</b>	0.096	0.095	0.096	0.096	0.096
<b>L</b>	0.10				
<b>n</b>	25				
<b>B</b>	5				
<b>W</b>	5				
<b>Var. grupos</b>	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
<b>C</b>	0.34				
<b>C tabla</b>	0.54				
<b>Uniformidad</b>	UNIFORME				
<b>Valor nominal</b>	0.09				
<b>Sesgo</b>	-0.004				
<b>ANOVA</b>					
<b>(xi-Li)^2</b>	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
<b>SDCB</b>	0.0000				
<b>SDCw</b>	0.0001				
<b>DCMB</b>	0.0000				
<b>DCMw</b>	0.0000				
<b>F calc.</b>	0.11				
<b>F tablas</b>	2.87				
<b>Aceptacion o Rechazo</b>	No existe diferencia significativa				
<b>SL<sup>2</sup></b>	0.0000				
<b>Sr</b>	0.0021				
<b>SR</b>	0.0023				

**DETERMINACIÓN DE ACEL**

<b>Condiciones ambientales</b>	25 °C 85%	25 °C 85%	25 °C 85%	25 °C 85%	25 °C 85%
<b>Responsable de la realizacion</b>	Alison C.	Alison C.	Alison C.	Alison C.	Alison C.
<b>Fecha de realizacion</b>	12/28/2021	12/28/2021	12/28/2021	12/28/2021	12/28/2021
<b>Matriz</b>	<b>0,40 mg/mL</b>				
<b>Repeticiones/Grupos</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>1</b>	0.102	0.103	0.101	0.103	0.101
<b>2</b>	0.103	0.101	0.103	0.101	0.102
<b>3</b>	0.110	0.103	0.108	0.102	0.103
<b>4</b>	0.103	0.115	0.102	0.103	0.107
<b>5</b>	0.101	0.102	0.103	0.107	0.103
<b>Li</b>	0.104	0.105	0.103	0.103	0.103
<b>L</b>			0.10		
<b>n</b>			25		
<b>B</b>			5		
<b>W</b>			5		
<b>Var. grupos</b>	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
<b>C</b>			0.52		
<b>C tabla</b>			0.54		
<b>Uniformidad</b>			UNIFORME		
<b>Valor nominal</b>			0.10		
<b>Sesgo</b>			0.000		
<b>ANOVA</b>					
<b>(xi-Li)^2</b>	0.0001	0.0001	0.0000	0.0000	0.0000
<b>SDCB</b>			0.0000		
<b>SDCW</b>			0.0003		
<b>DCMB</b>			0.0000		
<b>DCMW</b>			0.0000		
<b>F calc.</b>			0.18		
<b>F tablas</b>			2.87		
<b>Aceptacion o Rechazo</b>	No existe diferencia significativa				
<b>SL<sup>2</sup></b>			0.0000		
<b>Sr</b>			0.0036		
<b>SR</b>			0.0038		

**DETERMINACIÓN DE ACEA**

<b>Condiciones ambientales</b>	25 °C 85%	25 °C 85%	25 °C 85%	25 °C 85%	25 °C 85%
<b>Responsable de la realizacion</b>	Alison C.	Alison C.	Alison C.	Alison C.	Alison C.
<b>Fecha de realizacion</b>	12/28/2021	12/28/2021	12/28/2021	12/28/2021	12/28/2021
<b>Matriz</b>	<b>0,45 mg/mL</b>				
<b>Repeticiones/Grupos</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>1</b>	0.114	0.114	0.116	0.113	0.113
<b>2</b>	0.124	0.116	0.113	0.113	0.114
<b>3</b>	0.116	0.113	0.125	0.114	0.127
<b>4</b>	0.113	0.128	0.114	0.120	0.116
<b>5</b>	0.113	0.114	0.114	0.116	0.113
<b>Li</b>	0.116	0.117	0.116	0.115	0.117
<b>L</b>			0.12		
<b>n</b>			25		
<b>B</b>			5		
<b>W</b>			5		
<b>Var. grupos</b>	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
<b>C</b>			0.30		
<b>C tabla</b>			0.54		
<b>Uniformidad</b>			UNIFORME		
<b>Valor nominal</b>			0.11		
<b>Sesgo</b>			-0.001		
<b>ANOVA</b>					
<b>(xi-Li)^2</b>	0.0001	0.0002	0.0001	0.0000	0.0001
<b>SDCB</b>			0.0000		
<b>SDCw</b>			0.0005		
<b>DCMB</b>			0.0000		
<b>DCMw</b>			0.0000		
<b>F calc.</b>			0.09		
<b>F tablas</b>			2.87		
<b>Aceptacion o Rechazo</b>	No existe diferencia significativa				
<b>SL<sup>2</sup></b>			0.0000		
<b>Sr</b>			0.0051		
<b>SR</b>			0.0055		

## Anexo 13 Certificados



UNIVERSIDAD TECNICA DE AMBATO  
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERIA EN ALIMENTOS  
**LABORATORIO DE CONTROL Y ANALISIS DE ALIMENTOS, LACONAL**



Dirección: Av. Los Chasquis y Río Payamino, Campus Huachi, Ambato- Ecuador Teléfono: 2400987 Ext. 5518

Certificación N. 2022-LACONAL-03  
Ambato, 25 de enero de 2022

# CERTIFICACIÓN

Por medio del presente, a petición del Interesado, **Certifico** que la Señorita Alison Abigail Castillo Mayorga, con número de cedula 1804387783, estudiante de la carrera de Ingeniería Bioquímica de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología, Universidad Técnica de Ambato - UTA, realizó su proyecto de investigación con el tema: Validación del método analítico por espectrofotometría UV-Vis para la determinación de edulcorantes en bebidas azucaradas consumidos en la Provincia de Tungurahua.

Desde jueves 2 de diciembre del 2021 hasta el 23 de diciembre del 2021.

Actividades realizadas: uso de espectrofotómetro para curvas de calibración para edulcorantes

Equipos:

- Espectrofotómetro THERMO SCIENTIST
- Centrifuga FUNKE GERBER Nova-safety
- Baño ultrasónico BRANSONIC M2800H

La interesada puede hacer uso del presente documento, como considere conveniente.

Atentamente,



Firmado electrónicamente por:  
**MARIA GABRIELA  
FLORES ROSERO**

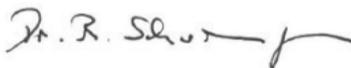
Ing. Gabriela Flores R.  
**DIRECTORA**  
**Laboratorio LACONAL**

MGF

## Certificate of Analysis

**Product Name:** Sucralose  
analytical standard  
**Product Number:** 90984  
**Batch Number:** BCCD3883  
**Brand:** Sigma-Aldrich  
**CAS Number:** 56038-13-2  
**Formula:** C<sub>12</sub>H<sub>19</sub>Cl<sub>3</sub>O<sub>8</sub>  
**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



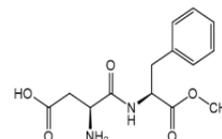
Dr. Reinhold Schwenninger  
Quality Assurance  
Buchs, Switzerland

Sigma-Aldrich warrants that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

## 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.sigmaldrich.com](http://www.sigmaldrich.com) for the most current version.)  
**Chemical formula:** C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>  
**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]

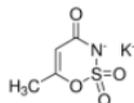
[Mark Pooler - QA]



## 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: C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>KNO<sub>4</sub>S  
 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 (Assay in Weight %)	≥ 99.0 %	99.9 %
Carbon Content 23.87 % (Theory)		23.74 %
Hydrogen Content 2.00 % (Theory)		2.27 %
Nitrogen Content 6.96 % (Theory)		7.08 %
Sulfur (S) 15.93 % (Theory)		16.00 %
Infrared Spectrum	Conforms to Structure	Conforms

Dr. Reinhold Schwenninger  
 Quality Assurance  
 Buchs, Switzerland CH

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at [Sigma-Aldrich.com](http://Sigma-Aldrich.com). For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

