



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**Desarrollo de un método por cromatografía de líquidos de alta resolución
CLAR para la determinación de edulcorantes naturales y artificiales
(acesulfame de potasio, aspartame, sucralosa, sacarina, fructosa y
sacarosa)**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

PRESENTA

MARIANA MONSERRAT ORTEGA GUTIÉRREZ



MÉXICO, D.F.

AÑO 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado:

Presidente	Prof. Ernestina Cervera Flores
Vocal	Prof. María del Carmen Durán Domínguez
Secretario	Prof. Lucia Cornejo Barrera
1er Suplente	Prof. María de Lourdes Osnaya Suárez
2do Suplente	Prof. Marisela Bernal González

Sitio en donde se desarrolló el tema:

Laboratorios 301-302-303 de Ingeniería Química y de Química Ambiental, Edificio E-3, Conjunto E. Facultad de Química, UNAM

Asesor del tema

Dra. María del Carmen Durán Domínguez de Bazúa

Supervisor técnico

Dra. Marisela Bernal González

Sustentante

Mariana Monserrat Ortega Gutiérrez

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

A la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México por mi formación integral que será una herramienta para toda la vida y por transmitirme más que conocimientos.

A mi madre Josefa Gutiérrez Carbajal por haberme dado la vida, por su apoyo y comprensión durante toda mi vida y sobre todo a lo largo de la carrera, por todo lo que aguantaste.

A mis hermanos Julio y Michel por todo lo que hemos compartido juntos.

A mi primos Daniela Torres y Salvador Silvestre por su apoyo y consejos.

A Iván Parra Malpica, alias “oso”, aunque no quieras que se sepa, por el amor y apoyo incondicional que me has dado, y por todo lo demás. Muchas gracias por estar a mi lado.

A la Sra. Reyna Malpica por abrirme las puertas de su casa.

A mis amigos Araceli Mejorado, Rocío Roa, Monserrat Reyes, Héctor Álvarez, Gaby Monroy por crecer conmigo, por su amor, sus consejos siempre valiosos y su apoyo.

A todos mis compañeros de la Facultad de Química con los que en algún momento compartí parte de mi vida.

A mis compañeros de los Laboratorios de Ingeniería Química Ambiental y de Química Ambiental en especial a Benjamín, Danaé, Juan Carlos, Amalia, Alejandra, Raúl, José Luis, a la Sra. Irene y Don Hilario, por compartir largos días de trabajo, por su apoyo mil gracias.

A todos los compañeros fuera de la Facultad por los buenos momentos y enseñarme otra cara de la vida (Ángeles, Jaqueline, Dulce, Oscar, etc.)

A la Dra. Marisela Bernal por su tiempo, su apoyo, su infinita paciencia y comentarios a la largo de este trabajo “Muchas Gracias”

A la Dra. María del Carmen Durán Domínguez de Bazúa por su apoyo al permitirme realizar este trabajo. Por sus comentarios, gracias.

A todos los profesores, a lo largo de mi vida, por todo lo que aprendí y que me ayudó a terminar este proyecto.

A los miembros de mi jurado por sus valiosos consejos que mejoraron esta tesis.

Al CONACyT por la beca otorgada con el proyecto 82788-13935 y al Proyecto PAPIME “Apoyo a la enseñanza experimental de las asignaturas terminales de las carreras que se imparten en la Facultad de Química de la UNAM, clave PE101709, por el apoyo financiero parcial para la adquisición de reactivos.

- PHILIPUS THEOPHRASTUS BOMBASTUS VON HOHENHEIM -

- PARACELSO -



“Nada es veneno, todo es veneno:
La diferencia está en la dosis”

ÍNDICE

GLOSARIO	Página
ABREVIATURAS	9
RESUMEN	12
	14

CAPÍTULO I PROBLEMATICA

1.1	Introducción	15
1.2	Justificación	16
1.3	Hipótesis	17
1.4	Objetivo general	17
1.5	Objetivos particulares	17

CAPÍTULO II ANTECEDENTES

2.1	Importancia del azúcar en México	19
2.2	Edulcorantes	20
2.2.1	Clasificación de los edulcorantes	20
2.2.2	Poder edulcorante	20
2.3	Edulcorantes artificiales vs edulcorantes naturales	21
2.4	Edulcorantes naturales	23
2.4.1	Sacarosa	24
2.4.1.1	Propiedades fisicoquímicas de la sacarosa (Bubnik et al., 2006)	24
2.4.1.2	Metabolismo de la sacarosa	26
2.4.1.3	Efectos a la salud producidos al ingerir sacarosa	26
2.4.1.4	Usos de la sacarosa en la industria	27
2.4.2	Fructosa	27
2.4.2.1	Producción bioquímica o biotecnológica de la fructosa	28
2.4.2.2	Metabolismo de la fructosa	28
2.4.2.3	Efectos a la salud producidos al ingerir fructosa	29
	I. Exceso de fructosa en el hígado	29
	II. Aumento de triglicéridos por fructosa	30
2.4.2.4	Usos de la fructosa en la industria	30
2.4.2.5	El problema del jarabe de “alta fructosa” (concentrado)	31
2.5	Edulcorantes no nutritivos o artificiales	32
2.5.1	Sacarina	32
2.5.1.1	Propiedades fisicoquímicas de la sacarina	33
2.5.1.2	Metabolismo y efectos a la salud producidos por ingerir sacarina	34
2.5.1.3	Usos en la industria de la sacarina	34
2.5.2	Aspartame	35
2.5.2.1	Propiedades fisicoquímicas del aspartame	36
2.5.2.2	Metabolismo del aspartame	37
2.5.2.3	Efectos a la salud producidos al ingerir aspartame	38
2.5.2.4	Usos del aspartame en la industria	39
2.5.3	Acesulfame de potasio (acesulfame-K)	40
2.5.3.1	Propiedades fisicoquímicas	41
2.5.3.2	Metabolismo del acesulfame-K	42
2.5.3.3	Usos en la industria	42
2.5.4	Sucralosa	43

2.5.4.1	Propiedades fisicoquímicas de la sucralosa	44
2.5.4.2	Metabolismo y efectos a la salud por ingerir sucralosa	44
2.5.4.3	Usos de la sucralosa en la industria	45
2.6	Métodos para la determinación de los edulcorantes	45
2.6.1	Determinación de azúcares (sacarosa y fructosa)	45
2.6.2	Determinación de edulcorantes artificiales	46
2.7	Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)	47
2.7.1	Instrumentación	50
	A. Fase móvil	50
	B. Sistema de bombeo	51
	C. Inyector	52
	D. Columna	53
	E. Detector	53
	F. Sistema de adquisición y procesamiento de datos (registrador)	54
2.8	Muestreo estadístico	54
2.8.1	Concepto de muestreo	55
2.8.2	Tipos de muestreo	55
2.8.2.1	Métodos de muestreo probabilístico (Malhotra, 2004)	56

CAPITULO III METODOLOGÍA

3.1	Material	58
3.2	Muestra	58
3.3	Reactivos	59
3.4	Equipo	59
3.5	Condiciones cromatográficas	60
3.6	Curvas de calibración	61
3.7	Análisis de edulcorantes comerciales	62
3.8	Diseño muestral	63
3.8.1	Objetivo del muestreo	63
3.8.2	Método de muestreo	63
3.8.3	Variable en estudio	63
3.8.4	Cálculo del tamaño de la muestra	63
3.8.4.1	Muestreo a granel	65
3.8.5	Análisis descriptivo	65
3.9	Análisis de las bebidas suministradas en su dieta a las ratas	65
3.10	Análisis estadístico de los datos	66

CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1	Condiciones cromatográficas (fase móvil, λ_{\max})	67
4.2	Curvas de calibración	68
4.3	Análisis de edulcorantes comerciales	70
4.4	Diseño muestral	71
4.4.1	Prueba piloto	71
4.4.2	Cálculo del tamaño de la muestra	72
4.4.3	Análisis descriptivo de los datos	73
4.5	Análisis de las bebidas que se suministran a las ratas en su dieta	81

CAPÍTULO V CONCLUSIONES Y RECOMENTACIONES

5.1	Conclusiones	83
5.2	Recomendaciones	85
ANEXO 1	Cromatogramas de edulcorantes naturales y artificiales	86
ANEXO 2	Curvas de calibración	89
ANEXO 3	Hoja de Excel para muestreo aleatorio simple	90
Bibliografía		92

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1.	Clasificación de los edulcorantes (Baduí, 1999)	21
Tabla 2.2.	Poder edulcorante (Mayer, 1993)	22
Tabla 2.3.	Máxima solubilidad de sacarosa (Fennema, 1993)	26
Tabla 2.4.	Propiedades de las distintas formas de sacarina (O'Brien-Nabors, 2001)	34
Tabla 2.5.	Tipos de cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) (Rubinson y Rubinson, 2000)	49
Tabla 3.1.	Características de las muestras	59
Tabla 3.2.	Condiciones cromatográficas	60
Tabla 3.3.	Estratos de la población "edulcorantes"	64
Tabla 3.4.	Preparación de bebidas	66
Tabla 4.1.	Gradiente de elución	67
Tabla 4.2.	Resultados de las curvas de calibración de los 6 edulcorantes en estudio	69
Tabla 4.3.	Resultados de precisión para cada edulcorante	69
Tabla 4.4.	Límite de detección de edulcorantes	70
Tabla 4.5.	Resultados de la cuantificación de sobres comerciales	71
Tabla 4.6.	Resultados de la prueba piloto para el estrato 1 "Equal"	72
Tabla 4.7.	Resultados de la prueba piloto del estrato 2 "Splenda"	72
Tabla 4.8.	Resultados de la prueba piloto del estrato 3 "Sussly Plus"	72
Tabla 4.9.	Tamaño de la muestra "n"	73
Tabla 4.10.	Resultado del muestreo al estrato 1 "Equal"	74
Tabla 4.11.	Resultado del muestreo al estrato 2 "Splenda"	75
Tabla 4.12.	Resultados del muestreo al estrato 3 "Sussly Plus"	76
Tabla 4.12.	Resultados del muestreo al estrato 3 "Sussly Plus" (continuación)	77
Tabla 4.13.	Resultado del muestreo al estrato 4 "Sweet 'n Low"	78
Tabla 4.14.	Resultados del muestreo al estrato 5 "AlyT"	79
Tabla 4.15.	Resultados del muestreo al estrato 6 "AlyT"	79
Tabla 4.16.	Resultados de la prueba t	80
Tabla 4.17.	Resultado análisis de bebidas	81
Tabla 4.18.	Comparación entre las concentraciones encontradas	82

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1.	Estructura química de la sacarosa (Sánchez-Guillén, 2010)	25
Figura 2.2.	Estructura de la fructosa (Sánchez-Guillén, 2010)	28
Figura 2.3.	Estructura química de la sacarina de sodio (Solano y Badilla, 2010)	33
Figura 2.4.	Estructura química del aspartame (Stegink y Filer, 1992)	35
Figura 2.5.	Estructura química del acesulfame de potasio (O'Brien-Nabors, 2001)	41
Figura 2.6.	Estructura química de la sucralosa (Grenby, 1989)	43
Figura 2.7.	Componentes básicos de un equipo de CLAR (Pérez <i>et al.</i> , 2010)	65
Figura 3.1.	Muestreo de productos a granel (Anónimo, 2009)	51
Figura A1.1.	Cromatograma de aspartame	86
Figura A1.2.	Cromatograma de acesulfame-K	86
Figura A1.3.	Cromatograma de sacarina	86
Figura A1.4.	Cromatograma de sucralosa	87
Figura A1.5.	Cromatograma de fructosa	87
Figura A1.6.	Cromatograma de sacarosa	87
Figura A1.7.	Cromatograma de los 6 edulcorantes (aspartame, acesulfame-K, sacarina, sucralosa, fructosa y sacarosa) detectados simultáneamente	88
Figura A2.1.	Curva de calibración de aspartame	89
Figura A2.2.	Curva de calibración de acesulfame-K	89
Figura A2.3.	Curva de calibración de sacarina	89
Figura A2.4.	Curva de calibración de sucralosa	89
Figura A2.5.	Curva de calibración de fructosa	89
Figura A2.6.	Curva de calibración de sacarosa	89
Figura A3.1.	Cuadro de diálogo "Muestra" con el rango de datos a elegir y el número de individuos a seleccionar	90
Figura A3.2.	Listado de los sobres de SUSSLY PLUS a seleccionar en la muestra definitiva	91

GLOSARIO

Alta fructosa	La alta fructosa o jarabe de maíz de alta fructosa (JMAF) es un edulcorante nutritivo y se obtiene a partir del maíz. Está compuesto por 45% de glucosa y 55% de fructosa, aporta 4 kilocalorías por gramo
Baño ultrasónico	Aparato emisor de ondas ultrasónicas
Calorías	Cantidad de energía que hay que suministrar a un gramo de agua a 1 atmósfera de precisión para elevar su temperatura de 14.5 a 15.5 °C La caloría también es conocida como caloría pequeña, en comparación con la kilocaloría (kcal), que se conoce como caloría grande y es utilizada en nutrición 1 kcal = 1000 cal (el prefijo kilo se abrevia k, ya que la letra mayúscula se dejó para el Kelvin)
Cariogénico	Que es capaz de producir o inducir la producción de caries dental
Circulación portal hepática	Flujo de sangre venosa desde los órganos vaso intestinales y del bazo al hígado antes de regresar al corazón
Consumo <i>per capita</i> (per cápita)	Indicador que se utilizan para estimar la cantidad promedio de consumo anual, de cualquier bien, producto o servicio en la población de un país
Co-transporte	El transporte activo secundario es el transporte de sustancias que normalmente no atraviesan la membrana celular, tales como los aminoácidos y la glucosa, cuya energía requerida para el transporte deriva del gradiente de concentración de los iones sodio de la membrana celular
Cromatograma	Señal que produce un detector en cuando responde a la presencia de un analito
Cromóforo	Se dice del agrupamiento químico causante de la coloración de una sustancia
Difusión facilitada o transporte pasivo	Es un proceso de difusión transmembranal que se produce en todas las células eucariontes. Es además una forma de transporte pasivo, donde las moléculas pasan a través de la bicapa de fosfolípidos, con la ayuda de las proteínas de transporte
Dumping	Voz inglesa. Práctica comercial de vender a precios inferiores al costo,

	para adueñarse del mercado, con grave perjuicio de éste
Error relativo	Errores que afectan la precisión de una medición. Ocasiona que los datos se distribuyan más o menos con simetrías alrededor de un valor promedio. (Se refleja por su grado de precisión)
Hidrólisis	Desdoblamiento de la molécula de ciertos compuestos orgánicos por acción del agua
Higroscopicidad	Propiedad de algunas sustancias de absorber y exhalar la humedad según el medio en que se encuentran
Hipertriacilglicerolemia	Aumento en la concentración de triglicéridos
Infusión intravenosa	Método para incorporar líquidos, como medicamentos, en el torrente sanguíneo. También se llama infusión
Inocuo	Que no hace daño
Isomerización	Consiste en la transformación de una sustancia en otra que posee la misma fórmula química pero diferente estructura.
Melaza	La melaza es un producto líquido espeso derivado de la caña de azúcar y en menor medida de la remolacha azucarera, obtenido del residuo restante en las cubas de cristalización y separación de los cristales de azúcar
Mutarrotación	Es un fenómeno de isomerización que ocurre en monosacáridos referido a la rotación que sufre el carbono anomérico al pasar de un conformero al otro
Reacciones de Maillard	Conjunto complejo de reacciones químicas que se producen entre las proteínas y los azúcares reductores que se dan al calentar los alimentos o mezclas similares.
Remolacha	Planta herbácea anual, de la familia de las Quenopodiáceas, con tallo derecho, grueso, ramoso, de uno a dos metros de altura, hojas grandes, enteras, ovales, con nervio central rojizo, flores pequeñas y verdosas en espiga terminal, fruto seco con una semilla lenticular, y raíz grande, carnosa, fusiforme, generalmente encarnada, que es comestible y de la cual se extrae azúcar (sacarosa)
Resabio	Sabor desagradable que deja algo

Sinergismo	La acción combinada de varias sustancias químicas, las cuales producen un efecto total más grande que el efecto de cada sustancia química separadamente
Sucroquímica	Es la rama de la ciencia y la tecnología cuyo objetivo es aumentar el valor agregado de la sacarosa y sus subproductos mediante su utilización como materia prima para obtener derivados útiles en diferentes industrias

Nota: Esta tesis utiliza el PUNTO DECIMAL

ABREVIATURAS

^{14}C	Carbono 14, radioisótopo del carbono
ADI	Del inglés <i>Acceptable Daily Intake (ADI)</i> , Ingesta Diaria Aceptable o Ingesta Diaria Admisible, IDA
ATP	Adenosina Trifosfato, originalmente por sus siglas en inglés
cal	Caloría, unidad de energía no perteneciente al SI
CLAR	Cromatografía de líquidos de alta resolución
cm	Centímetros
CV	Coefficiente de variación
EEUU	Del inglés <i>United States</i> , Estados Unidos
FAO	Del inglés <i>The Joint Food and Agriculture Organization</i> , Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
FDA	Del inglés <i>Food and Drug Administration</i> , Administración de Alimentos y Fármacos
g	Gramo
mg	Miligramo
HPLC	En inglés <i>High Pressure Liquid Chromatography</i>
H ₂ O	Agua
IR	En inglés <i>Infrared Radiation</i> , Radiación Infrarroja
JECFA	Del inglés <i>Joint FAO/OMS Expert Committee on Food Additives</i> , Comité Mixto FAO/OMS de Expertos sobre Aditivos Alimentarios
KH ₂ PO ₄	Fosfato monobásico de potasio
L	Litro
μL	Microlitro
kJ	Kilojoules, Unidad de energía en el SI
λ	Longitud de onda
λ _{max}	Longitud de onda máxima
MIR	Infrarrojo medio, por sus siglas en inglés
mm	Milímetros
N	Número aleatorio de muestra

N	Población
K	Número de individuos
<i>NIR</i>	Espectroscopía de infrarrojo cercano, por sus siglas en inglés
°C	Grados centígrados
OMS	Organización Mundial de la Salud
pH	Medida de acidez o basicidad de una sustancia: Potencial de iones Hidrógeno
pI	Punto isoeléctrico
R ²	Coefficiente de correlación
S	Desviación estándar
S ²	Varianza
<i>SCF</i>	Siglas en inglés para <i>Scientific Committee on Food</i>
SI	Sistema Internacional de Unidades
UV	Absorción Ultravioleta
X	Media

RESUMEN

El sabor dulce ha sido uno de los más importantes para el ser humano, por la respuesta positiva que ejerce. Actualmente, son muy pocos los sectores del área de producción de alimentos que no utilizan algún edulcorante artificial (sucralosa, aspartame, sacarina, acesulfame de potasio) o natural (azúcar o sacarosa, fructosa o mieles fructosadas). Las primeras sustancias utilizadas para endulzar los alimentos fueron los edulcorantes provenientes de fuentes naturales, principalmente, la miel y el azúcar. Sin embargo, en los últimos años, la utilización de esta última y sus derivados ha sido cuestionada ante todo por el sector salud, que les asocia diversos problemas, tales como obesidad, diabetes, hipertensión, hipoglucemia, problemas digestivos, caries dental, etc. Ante estas situaciones surgió la necesidad de buscar sustitutos al azúcar en los alimentos, con las mismas cualidades y sensaciones que producía el azúcar. Es así como nacen los edulcorantes artificiales, aditivos complementarios que son capaces de simular la presencia del azúcar en los alimentos. Estas sustancias han tenido una amplia aceptación en la población humana por su reducido aporte calórico. Sin embargo, la tendencia a consumir este tipo de productos ha generado problemas de información respecto a su inocuidad, ya que algunos de ellos parecen provocar daños a la salud y transformarse de aditivos a contaminantes. Debido a esto se siguen realizando investigaciones en animales de laboratorio para ver los efectos que causan en el organismo. También los alimentos que contienen edulcorantes son analizados por diversas técnicas. El propósito de esta investigación es el desarrollo de un diseño experimental por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), para el análisis de edulcorantes artificiales (aspartame, acesulfame-K, sucralosa, sacarina y mezcla aspartame-acesulfame-K) de marca comercial (SPLENDA, EQUAL, SWEET'N LOW y SUSSLY PLUS) y de edulcorantes naturales (sacarosa y fructosa) que son utilizados en la elaboración de bebidas que se dan a modelos animales (ratas), con una dieta pre-establecida, en el proyecto de investigación “Efecto biológico de edulcorantes naturales y artificiales en modelos animales”, realizado en los Laboratorios 301 a 303 de Ingeniería Química Ambiental y de Química Ambiental y en la Unidad de Experimentación Animal del Conjunto E de la FQ-UNAM; con el fin de determinar y cuantificar la concentración real de los edulcorantes naturales y artificiales que son ingeridos diariamente por las ratas. Las muestras de cada bebida se analizaron por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) con fase reversa y detección de absorbancia UV directamente sobre una columna C-18, con diferentes gradientes de fase móvil, realizando previamente las curvas de calibración de cada edulcorante utilizado en el estudio. Además, se compararon las concentraciones obtenidas de cada edulcorante con la cantidad reportada en las etiquetas con objeto de validar su confiabilidad para los consumidores. Se realizaron muestreos estadísticos de cada uno de los edulcorantes utilizados en estas dietas, de acuerdo con la presentación comercial (sobres individuales, por caja o a granel), en el que la variable a analizar fue la concentración en mg g^{-1} de las muestras individuales de cada edulcorante en estudio y determinar el coeficiente de variación.

Palabras clave: Edulcorantes naturales y artificiales, acesulfame de potasio, aspartame, sucralosa, sacarina, fructosa, sacarosa, cromatografía de líquidos de alta resolución, muestreo estadístico.

CAPÍTULO I

PROBLEMÁTICA

1.1 Introducción

Las necesidades del ser humano y la forma de satisfacerlas han cambiado por los constantes avances científicos y tecnológicos. Una muestra de ello ha sido el descubrimiento de nuevas y numerosas sustancias llamadas aditivos alimentarios, sustancias añadidas intencionadamente, que les confieren diversas características a los alimentos (para dar color, endulzar, preservar y dar sabor, cambiar su viscosidad, etc.). Los edulcorantes forman una clase importante de aditivos alimentarios que se utilizan en un número cada vez mayor de productos alimenticios y bebidas (Wasik *et al.*, 2007). Las primeras sustancias utilizadas para endulzar los alimentos fueron los edulcorantes provenientes de fuentes naturales, principalmente, la miel y el azúcar. La sacarosa o azúcar de mesa es en la actualidad el azúcar más conocido en la industria y el hogar. Se trata de un disacárido compuesto de glucosa y fructosa, extraído de la caña de azúcar y de la remolacha. La fructosa o levulosa es el más dulce de todos los azúcares naturales, encontrándose principalmente en frutas y miel. La fructosa y la sacarosa están ampliamente distribuidas en gran variedad de alimentos y bebidas. Estos compuestos son, a menudo, utilizados como edulcorantes (Tomoyoshi y Serwe, 2000). En la actualidad, la preocupación con respecto al consumo de azúcar y su relación con diversas enfermedades como obesidad, caries, entre otras, se ha incrementado. Ante estas situaciones surgió la necesidad de buscar aditivos que pudieran sustituir el azúcar de los alimentos, con las mismas cualidades y sensaciones que producía el azúcar. Es así como nacen los edulcorantes artificiales, capaces de simular la presencia del azúcar en los alimentos y con reducido aporte calórico. Sin embargo, los edulcorantes artificiales han creado mayor controversia en cuanto a los posibles problemas por su consumo e inocuidad, por lo que es necesario realizar análisis cualitativos y cuantitativos del uso de los edulcorantes en los alimentos, verificando que las concentraciones cumplan con las regulaciones establecidas y la presencia de ellos sea reportada en sus ingredientes. Para ello, se han publicado varias técnicas y metodologías, en

donde se establecen métodos para su detección y cuantificación, que se basan en separación física por cromatografía de líquidos y cromatografía de gases (Armeta *et al.*, 2004), de las cuales la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) con detección UV es actualmente la técnica más utilizada para la detección individual y simultánea de los edulcorantes artificiales en estudio (Skoog y West, 2001). Por otra parte, los edulcorantes naturales (sacarosa y fructosa) son analizados con técnicas analíticas, principalmente por métodos cromatógraficos siendo la cromatografía de líquidos de alta resolución la técnica más comúnmente utilizada, con detector de índice de refracción (IR) en la mayoría de los estudios (Tomoyoshi y Serwe, 2000). El estudio de edulcorantes naturales o artificiales de manera individual o en muestras de alimentos es esencial e importante en los campos de la nutrición, la biología y la ciencia de los alimentos.

1.2 Justificación

El propósito de esta investigación es el desarrollo de una metodología experimental por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), fase reversa y detección de absorbancia UV directamente sobre una columna C-18, para el análisis de edulcorantes artificiales (aspartame, sucralosa, sacarina, mezcla aspartame-acesulfame-K y acesulfame-K éste último no se vende comercialmente) de marca comercial EQUAL, SPLENDA, SWEET'N LOW, SUSSLY PLUS, respectivamente, de reactivo analítico y de edulcorantes naturales (sacarosa y fructosa) que son utilizados en la elaboración de bebidas que se dan a modelos animales (ratas de laboratorio), con una dieta pre-establecida, en el proyecto de investigación “Efecto biológico de edulcorantes naturales y artificiales en modelos animales”, realizado en los Laboratorios 301 a 303 de Ingeniería Química Ambiental y de Química Ambiental y en la Unidad de Experimentación Animal del Conjunto E de la FQ-UNAM; con el fin de determinar y cuantificar la concentración real de los edulcorantes naturales y artificiales que son ingeridos diariamente por las ratas y comparar las concentraciones obtenidas con las reportadas en la etiqueta de los edulcorantes comerciales. Además, se realizó un muestreo estadístico de cada uno de los edulcorantes utilizados en estas dietas, de acuerdo con la presentación comercial (sobres individuales y a granel), extrayendo una muestra aleatoria y analizando su concentración en mg g^{-1} para cada

edulcorante, por CLAR, para determinar el coeficiente de variación. El muestreo estadístico es una herramienta que permite obtener información de la población total, analizando sólo una muestra representativa de toda la población, con la que se puede evaluar la calidad promedio, determinar su uniformidad, o saber si aceptar o rechazar el producto, a través de la información obtenida del análisis estadístico.

1.3 Hipótesis

- El diseño experimental utilizando cromatografía de líquidos de alta resolución, permite detectar y cuantificar los edulcorantes en estudio.
- La variación de la concentración reportada en las etiquetas de los edulcorantes no debe tener diferencias significativas con respecto de la obtenida por el método de CLAR y el coeficiente de variación debe ser menor al 5% entre las muestras del mismo edulcorante al realizar el muestreo estadístico.

1.4 Objetivo general

- Cuantificar los edulcorantes (acesulfame de potasio, aspartame, sucralosa, sacarina, fructosa y sacarosa) mediante CLAR en bebidas.

1.5 Objetivos particulares

- Establecer las condiciones cromatográficas de trabajo (fase móvil, flujo y longitud de onda)
- Realizar las curvas de calibración respectivas para cada edulcorante (sucralosa, aspartame, sacarina, acesulfame de potasio, sacarosa y fructosa), de acuerdo con las condiciones establecidas
- Realizar un diseño muestral para los edulcorantes en estudio de acuerdo con la presentación comercial (sobres individuales y a granel), haciendo un análisis descriptivo de los datos

- Determinar el coeficiente de variación y la diferencia significativa de la concentración de cada edulcorante en estudio
- Cuantificar la concentración de los edulcorantes en las bebidas suministradas en la dieta de las ratas

CAPÍTULO II

ANTECEDENTES

2.1 Importancia del azúcar en México

El azúcar es un producto fundamental para la nutrición humana, que brinda la energía necesaria para su buen funcionamiento. El azúcar es uno de los productos básicos de consumo. Este producto se obtiene principalmente de la caña de azúcar y/o de la remolacha. Del proceso de industrialización de la caña de azúcar se extraen diversos productos, por ejemplo, el azúcar estándar, el mascabado, la melaza, el alcohol etílico, etc. Estos productos son comercializados a nivel nacional e internacional. En México, el azúcar tiene importancia social y su comercialización influye en el ámbito económico, político y social del país, dando origen a una agroindustria que genera una gran cantidad de empleos, participando directamente en la economía nacional. La caña de azúcar es un cultivo ampliamente difundido en México, como ocurre con todos los países tropicales. Existen más de 15 regiones cañeras distribuidas en la costa del Pacífico, Área Central, Golfo de México y Área del Caribe en la Península de Yucatán (Anónimo, 2010a).

Sin embargo, la industria alimentaria ha reemplazado cada vez más a la sacarosa con fructosa, debido a problemas políticos (bloqueo a Cuba que promovió el uso de los excedentes de maíz de los EEUU para producir glucosa a partir de sus almidones e invertir ésta a fructosa). Como en este país el maíz está fuertemente subsidiado, su costo es muy bajo y, evidentemente, sus productos también. Estos edulcorantes de alta fructosa son un producto “dumping” en todo el mundo. Si bien el consumo per cápita promedio de caña de azúcar refinada y azúcar de remolacha se ha reducido de 1970-1974 a 2000 en un 35%, el consumo de edulcorantes de maíz ha aumentado en un 277%, con jarabe de maíz de alta fructosa, en promedio, de 4,080%. El consumo de fructosa ha aumentado dramáticamente en los últimos treinta años, el jarabe de maíz de alta fructosa se utiliza ampliamente en refrescos, productos horneados, condimentos, postres preparados y otros alimentos procesados (Wylie-Rosset *et al.*, 2004).

2.2 Edulcorantes

Los edulcorantes son sustancias de sabor dulce que se emplean en los alimentos por varias razones: para dar sabor dulce, para dar cuerpo al alimento, para proporcionar un importante aporte calórico y para actuar como conservadores (Belitz y Grosch, 1997). El edulcorante natural por excelencia es el azúcar, con el cual satisfacía el ser humano su ansia por el sabor dulce. Posteriormente, el dulzor proveniente del azúcar de caña y de la remolacha fue suplido, entre otros, por el de la miel de abejas y por los jarabes obtenidos químicamente del sorgo y del maíz, que contienen hidratos de carbono naturales, como el almidón, que son transformados en el monómero de glucosa y este en fructosa. Hasta el final del siglo XIX el hombre sólo disponía de edulcorantes naturales como azúcar, miel, glucosa, derivados de almidón y lactosa. Actualmente, se han abierto nuevas vías en la producción de moléculas orgánicas y biológicas, que van en detrimento del sector de la sucroquímica y se cuenta con una variedad de edulcorantes artificiales tales como el aspartame, la sacarina, el acesulfame de potasio, la sucralosa, etc. (Fennema, 1993).

2.2.1 Clasificación de los edulcorantes

Los edulcorantes desde el punto de vista químico forman parte de los aditivos y se clasifican de acuerdo con su función dentro de la categoría de modificadores del sabor junto con los acidulantes, salinizantes, amargantes y picantes (Rubio y Luis, 2004). En términos muy genéricos se pueden dividir en naturales y artificiales. (Tabla 2.1).

2.2.2 Poder edulcorante

El poder edulcorante de estos agentes se define como la capacidad de una sustancia para causar dicha sensación, la cual se mide subjetivamente tomando como base de comparación la sacarosa a la que se le da un valor arbitrario de 1. Es decir, si un compuesto tiene un poder edulcorante de 2 indica que es 100% más dulce que la sacarosa. En la Tabla 2.2 se muestra el poder edulcorante de los edulcorantes en estudio (Mayer, 1993).

Tabla 2.1. Clasificación de los edulcorantes (Baduí, 1999)

Grupo	Grupo	Edulcorante
Naturales	Carbohidratos o hidratos de carbono	Glucosa Fructosa Sacarosa Jarabes de maíz Miel de abeja
	Alcoholes polihidroxiados	Sorbitol Xilitol
	Proteínas	Miralina Molenina
	Glucósidos	Filodulcina Steviósidos
Artificiales	Acesulfame-K Aspartame L-azúcares Ciclamatos Dulcina Sacarina Sucralosa Neotame Alitame	

2.3 Edulcorantes artificiales vs edulcorantes naturales

Existe un interés creciente por los nuevos edulcorantes. Por un lado, en muchos países industrializados el exceso de masa corporal de la población hace que exista una tendencia a las dietas bajas en calorías y, por otro, desde hace cierto tiempo en algunos países se cuestiona y se vuelve a analizar experimentalmente la inocuidad de edulcorantes conocidos desde hace tiempo, como la sacarina y el ciclamato. La búsqueda de sustancias edulcorantes se ve dificultada por el hecho de que la relación entre estructura y el sabor

dulce no está suficientemente aclarada y porque los compuestos adecuados no deben ser sólo saludables, sino que deben satisfacer otros criterios. Entre ellos se cuenta su solubilidad, su estabilidad en un intervalo amplio de temperaturas y de valores de pH, que el sabor dulce sea lo más puro posible y sin otros sabores secundarios o residuales y, finalmente, que su poder edulcorante respecto a la sacarosa haga que su empleo sea económico. Hoy en día existen algunos edulcorantes nuevos en el mercado (por ejemplo el acesulfame-K, el aspartame, la sucralosa).

Tabla 2.2. Poder edulcorante (Mayer, 1993)

Edulcorante	Fuente	*Poder edulcorante
Fructosa	Natural	1.2-1.8
Aspartame	Artificial	180-220
Acesulfame-K	Artificial	200
Sucralosa	Artificial	600
Sacarina	Artificial	300-500

*En relación con la sacarosa=1

Los edulcorantes artificiales o no nutritivos comprenden una amplia gama de sustancias que producen sabor dulce o mejoran la percepción de los sabores dulces. La prohibición del uso de los ciclamatos en EEUU, junto con las dudas sugeridas sobre la inocuidad de la sacarina, ha estimulado la investigación de edulcorantes alternativos que satisfagan la actual demanda de bebidas y alimentos pobres en calorías. Aunque la lista de edulcorantes no calóricos potencialmente útiles está creciendo, sólo unos cuantos se encuentran normalmente disponibles para su utilización en alimentos (Belitz y Grosh, 1997).

Sin duda alguna, una de las áreas donde mayor impacto ha tenido la biotecnología, no sólo desde el punto de vista tecnológico sino económico y social, es la de los edulcorantes. A partir de los años sesenta del siglo XX, en los países desarrollados se han venido implementando procesos industriales, en su mayoría biotecnológicos para la elaboración de edulcorantes naturales y artificiales, que han modificado la estructura de este mercado. Esta situación ha traído graves consecuencias a los países para los que las exportaciones de

azúcar de caña constituyen una entrada importante de divisas y ha sido un factor determinante en las fluctuaciones del precio internacional del azúcar de caña. En la definición de estrategias de desarrollo agroindustrial de esta nueva era, no puede dejarse a un lado el avance de la biotecnología y el caso de los edulcorantes es el mejor para demostrar la necesidad de buscar diversificación para las materias primas (García-Garibay *et al.*, 2004).

Por diversas causas, siendo probablemente la más importante de ellas, el desarrollo biotecnológico para la producción de jarabes con alto contenido de fructosa (JACF) y nuevos edulcorantes sintéticos no calóricos, el precio internacional de la sacarosa conoció uno de sus niveles más bajos en 1985 (0.0518 dólar americano/kg) y aunque se ha incrementado de nuevo, difícilmente cubre el costo de producción, que en el mejor de los casos es de 0.22-0.28 dólar americano/kg (García-Garibay *et al.*, 2004).

En relación con los edulcorantes no calóricos, cuyo consumo se ha incrementado considerablemente en los últimos años, se podría afirmar que responden a una necesidad o una moda. El resultado global es la tendencia actual hacia la disminución en el consumo de edulcorantes calóricos, sacarosa principalmente, por las dietas controladas o bien por programas de prevención de caries dental, diversas enfermedades (diabetes) y otras. Y se motiva a la industria alimentaria en la investigación de sustitutos de azúcar.

2.4 Edulcorantes naturales

Los edulcorantes naturales pertenecen a la clase general de sustancias llamadas hidratos de carbono o carbohidratos, como se les conoce coloquialmente. El término hidrato de carbono se debe a la composición elemental $(CH_2O)_n$. Los azúcares son hidratos de carbono. Estos son compuestos orgánicos muy abundantes en la naturaleza. Se encuentran en todos los organismos y son indispensables para la vida. Los hidratos de carbono en la alimentación se consideran muy importantes, incluso aquellos que no son digeribles como la fibra, que se considera necesaria para mantener una buena digestión y ayuda a mantener una alimentación equilibrada (McMurry, 1994).

Los azúcares pueden dividirse en cuatro grandes grupos: Monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos. A continuación se mencionan las características más importantes de los edulcorantes naturales en estudio (Baduí, 1999).

2.4.1 Sacarosa

La sacarosa (β -D-fructofuranosil- α -D- glucopiranososa), ver la Figura 2.1, llamada comúnmente “azúcar”, es un disacárido formado por una molécula de glucosa cuyo carbono aldehídico se une al cetónico de una molécula de fructosa, estableciendo un enlace glucosídico β (1,2) que impide que este disacárido sea reductor por no carecer de grupos aldehído o cetona libres; además, no exhibe mutarrotación. Puede llevar a cabo reacciones de Maillard. Su fórmula condensada $C_{12}H_{22}O_{11}$, con una masa¹ molecular $342.30 \text{ g mol}^{-1}$. La sacarosa es el compuesto químico orgánico más común como endulzante en el mundo (McMurry, 1994). Su hidrólisis parcial se aprovecha comercialmente en la elaboración de azúcar invertido usado en bebidas, ya que se reduce el porcentaje de azúcar necesario para proporcionar un dulzor determinado.

La sacarosa abunda en forma natural en casi todas las frutas. Se encuentra hasta en un 20% en masa en la caña de azúcar y en un 15% en masa de la remolacha azucarera, de las cuales se obtiene comercialmente el azúcar de mesa (sacarosa). Su concentración en los diversos alimentos varía de manera considerable según el grado de madurez de estos productos. El azúcar de mesa es el edulcorante más utilizado para endulzar alimentos.

¹ El **peso**, en física, es la medida de la fuerza que ejerce la gravedad sobre la masa de un cuerpo. Normalmente, se considera respecto de la fuerza de gravedad terrestre. El peso depende de la intensidad del campo gravitatorio, de la posición relativa de los cuerpos y de la masa de los mismos. La **masa** es una propiedad característica de los cuerpos: la cantidad de materia, y no depende de la intensidad del campo gravitatorio, ni de su posición en el espacio. Por ejemplo, una persona de 60 kg de **masa**, pesa 60 **kg-fuerza** en la superficie de la Tierra; pero, la misma persona, en la superficie de la Luna pesaría sólo unos 10 **kg-fuerza**; sin embargo, su masa seguirá siendo de 60 kg. Las unidades de **peso** y **masa** tienen una larga historia compartida, en parte porque su diferencia no fue bien entendida cuando dichas unidades comenzaron a utilizarse. Cotidianamente, el término "peso" se utiliza a menudo *erróneamente* como sinónimo de masa. La unidad de masa del SI es el kilogramo, kg

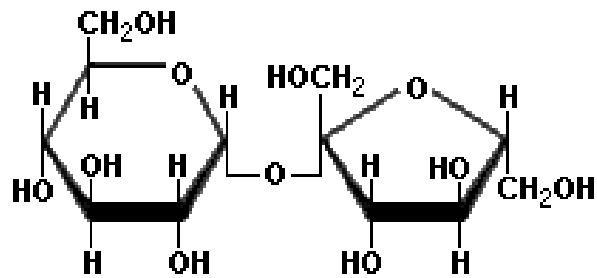


Figura 2.1 Estructura química de la sacarosa (Sánchez-Guillén, 2010)

2.4.1.1 Propiedades fisicoquímicas de la sacarosa (Bubnik *et al.*, 2006)

- Estado de agregación: sólido de sabor dulce
- Transparente cuando forma cristales. En masas de pequeños cristales o en polvo toma color blanco
- Cristaliza fácilmente debido a que, a diferencia de otros azúcares, no presenta mutarrotación
- Soluble en agua (sus datos se presentan en la Tabla 2.3): La sacarosa tiene un grado de solubilidad muy alto, una gran capacidad de hidratación y es menos higroscópica que la fructosa. Todas esas características hacen que se emplee en la elaboración de diversos alimentos
- Se hidroliza a glucosa y fructosa por acción de ácidos o en presencia de la enzima invertasa
- Fermenta por acción de levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) dando alcohol etílico
- Se carameliza y se descompone por el calor a partir de los 150°C, dando una gran variedad de sustancias responsables del color, sabor y olor a caramelo. Su punto de fusión es 170°C.

Tabla 2.3. Máxima solubilidad de sacarosa (Fennema, 1993)

°C	g/100g agua
0	179.2
15	197.0
25	211.4
40	238.1
80	362.1
100	487.2

2.4.1.2 Metabolismo de la sacarosa

La sacarosa, al entrar en el intestino delgado, es hidrolizada por la enzima invertasa en la pared intestinal. De los productos de hidrólisis, la D-Glucosa es absorbida rápidamente, mientras que la D-Fructosa libre lo es más lentamente. Parte de esta D-Fructosa es convertida en D-Glucosa en el propio intestino o se metaboliza directamente sólo después de alcanzar el hígado por la vía de la circulación portal (Fennema, 1993).

2.4.1.3 Efectos a la salud producidos al ingerir sacarosa

Al azúcar se le adjudican muchos de los males de la alimentación moderna. Pero lo dañino no es el azúcar, sino el consumirla en exceso. La distinción es importante para poder cuidar nuestra salud sin dejar de disfrutar del dulce encanto de lo dulce. No hay que satanizar al azúcar, pero tampoco hay que perder de vista que en el siglo XX se consumían 10 kg de azúcar al año por persona y en los últimos años el consumo es de 50 kg por persona al año. Por consumo de chocolates, helados, galletas, caramelos, pasteles, dulces y refrescos embotellados (México tiene el segundo lugar global en el consumo de refrescos), en particular estos últimos, se consumían cantidades importante en México (López-Munguía, 2009), aunque en los últimos años, la fructosa ha reemplazado a la sacarosa en este tipo de bebidas y en muchos alimentos por su poder edulcorante, bajo costo, propiedades funcionales y estabilidad del producto. El consumo excesivo de azúcar se relaciona de

alguna manera con las enfermedades siguientes: Caries dental, Aumenta la demanda de las vitaminas del complejo B, la hipertrigliceridemia, la obesidad y diabetes mellitus (Blanco, 2002).

2.4.1.4 Usos de la sacarosa en la industria

La sacarosa provee 4 kcal g⁻¹. Es el edulcorante más utilizado en el mundo industrializado, aunque ha sido en parte reemplazada en la preparación industrial de alimentos por otros edulcorantes, tales como jarabes de fructosa o glucosa o por combinaciones de ingredientes funcionales y edulcorantes de alta intensidad. Generalmente se extrae mecánicamente de la caña de azúcar o de la remolacha para ser purificada y cristalizada.

Otras fuentes comerciales de obtención aunque en menor cantidad son el sorgo dulce y el jarabe de arce. La comercialización abundante de la sacarosa se debe a su poder “edulcorante” y a sus propiedades funcionales. Por tal motivo, es importante para la estructura de muchos alimentos tales como panecillos, galletas, nieve y sorbetes, además de que es empleada como auxiliar en la conservación de alimentos (Baduí, 1999).

2.4.2 Fructosa

La estructura de la fructosa se presenta en la Figura 2.2. Es un monosacárido que se encuentra en las frutas y en la miel de abeja. En los últimos años se ha obtenido mediante la hidrólisis de los almidones de cereales principalmente del maíz. Su nombre químico es β-D-fructopiranososa, su fórmula condensada es C₆H₁₂O₆, su masa molecular es 180.16 g/mol, con un punto de fusión de 130°C. En forma sólida es un polvo blanco cristalino, es soluble en agua y metanol.

2.4.2.1 Producción bioquímica o biotecnológica de la fructosa

Para obtener la fructosa, el primer paso es obtener el almidón del maíz para, posteriormente, calentarlo hasta que tenga un color lechoso e hidrolizarlo a dextrina mediante licuación enzimática por medio de una enzima (amilasa). Éste es hidrolizado a glucosa por medio de una sacarasa (glucoamilasa), de tal forma que se fractura toda la molécula con la ayuda de esta enzima. Como segundo paso, el jarabe de glucosa resultante es tamizado por filtración para remover las impurezas en el proceso, es purificado a través de un filtro de carbono para su decoloración y filtrado nuevamente por un proceso de refinado. El jarabe de glucosa obtenido es concentrado por proceso de evaporación. Como tercer paso, el jarabe de glucosa decolorado y concentrado es llevado dentro de un reactor de isomerización que contiene enzimas isomerasas. Alrededor de la mitad del jarabe de glucosa es isomerizado a fructosa. El jarabe isomerizado obtenido es refinado y concentrado hasta obtener un jarabe de fructosa al 42%. Finalmente, el jarabe de fructosa en dicha concentración es separado, para después mezclarse con un jarabe de fructosa al 80-90% de concentración y obtener un jarabe fructosado de alrededor de 55% (Jürgens *et al.*, 2005).

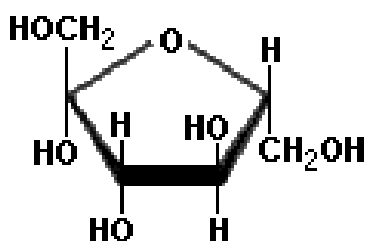


Figura 2.2. Estructura de la fructosa (Sánchez-Guillén, 2010)

2.4.2.2 Metabolismo de la fructosa

La fructosa es absorbida en el intestino delgado principalmente a nivel de yeyuno a través de la membrana de las células epiteliales al torrente sanguíneo mediante un proceso de difusión facilitada (Gaby, 2005). Los procesos de digestión y absorción de glucosa y fructosa son diferentes, ya que cuando los disacáridos como sacarosa o maltosa entran al

intestino son separados por disacaridasas, en donde la glucosa es absorbida por un co-transporte glucosa-sodio formado por la separación de sacarosa. La fructosa, en contraste, es absorbida más abajo en el duodeno y por un proceso no dependiente de sodio. Después de la absorción, la glucosa y la fructosa entran en la circulación portal y cualquiera de los dos es transportado hacia el hígado, donde la fructosa puede ser tomada y convertida a glucosa o pasar dentro de la circulación general. La adición de pequeñas cantidades de fructosa o ingesta oral de glucosa incrementa la síntesis hepática del glucógeno en humanos y reduce la respuesta glicémica en sujetos con diabetes mellitus tipo 2, la cual sugiere la importancia de la fructosa en la modulación del metabolismo en el hígado. Sin embargo, cuando se ingieren grandes cantidades de fructosa, proveen una fuente relativamente irregular de precursores del carbono para lipogénesis hepática (Bray *et al.*, 2004). Cuando se incrementa el consumo de fructosa en la dieta diaria, mediante la ingesta de bebidas gaseosas, conocidas en México como refrescos, néctares de frutas y otros productos alimenticios, todos ellos endulzados artificialmente con este edulcorante, hay un aumento de colesterol en el organismo, así como de lipoproteínas de baja densidad. La fructosa es entonces metabolizada principalmente en el hígado y con mayor velocidad que la glucosa. Esto se debe a que no requiere del paso catalizado por la enzima fosfofructocinasa, que es el punto donde se controla la velocidad de la utilización de la glucosa. Esto provoca que las vías en el hígado sean inundadas por la fructosa, causando el incremento de la fabricación de ácidos grasos y de su esterificación, que promueve la elevación de los niveles de triglicéridos en la sangre, y la secreción de colesterol de baja densidad. La fructosa es una importante fuente de energía en las dietas que contienen cantidades elevadas de sacarosa (disacárido de fructosa y glucosa) (Wylie-Rosset *et al.*, 2004).

2.4.2.3 Efectos a la salud producidos al ingerir fructosa

I. Exceso de fructosa en el hígado

Hasta hace poco, se creía que la fructosa era mejor que la glucosa en la alimentación por vía intravenosa. El hígado, sin embargo, se enfrenta a problemas metabólicos cuando la concentración sanguínea de este monosacárido es demasiado elevada. La sobrecarga aguda

del hígado con fructosa, como en el caso de una infusión intravenosa, produce el secuestro del fosfato inorgánico en la fructosa-1-fosfato y disminuye la síntesis del ácido trifosfato (ATP). En consecuencia, se elimina la inhibición, a cargo del ATP, de las enzimas de la degradación de nucleótidos de adenina y se acelera la infusión de ácido úrico, lo cual produce hiperuricemia y ésta es la enfermedad conocida como gota. Estos efectos resultan de particular importancia en las personas que presentan una predisposición a la hipertriacilglicerolemia o hiperuricemia (Murray *et al.*, 1994).

La intolerancia a la fructosa es una enfermedad genética en la que la ingesta de fructosa provoca la misma acumulación de fructosa-1-fosfato observada tras la alimentación por vía intravenosa. Es el resultado de una deficiencia en aldolasa del Tipo B. Esta afección parece ser autolimitante: los individuos con intolerancia a la fructosa desarrollan rápidamente un fuerte rechazo por las cosas dulces (Voet y Voet, 1992).

II. Aumento de triglicéridos por fructosa

En estudios hechos con animales y humanos, en ambos se ha demostrado que el consumo de fructosa puede incrementar el nivel de triglicéridos. La respuesta de triglicéridos a la ingesta de fructosa parece depender de si una persona es o no sensible a los hidratos de carbono o es resistente a la insulina, porque es más probable que las personas sensibles a los hidratos de carbono puedan tener un aumento en las concentraciones de triglicéridos en plasma (Gaby, 2005).

2.4.2.4 Usos de la fructosa en la industria

Las fuentes naturales de fructosa incluyen a las frutas, algunos vegetales, la miel, el azúcar de caña y la remolacha. La fructosa obtenida químicamente de almidones, ha reemplazado a la sacarosa en muchos alimentos y bebidas, ya que tiene un efecto sinérgico del potencial edulcorante de otros edulcorantes sintéticos. Está presente en diferentes cantidades en una amplia variedad de alimentos y bebidas. El jarabe de fructosa está presente, enmascarado como “azúcares”, en numerosos productos como por ejemplo bebidas gaseosas (conocidas

en México como “refrescos”), bebidas de fruta, bebidas deportivas, productos horneados dulces o salados, caramelos, mermeladas, yogures, condimentos, alimentos enlatados y empacados y otros alimentos.

2.4.2.5 El problema del jarabe de “alta fructosa” (concentrado)

Los jarabes de “alta fructosa” (por una mala traducción del inglés de *high fructose syrups*) son un sustituto del azúcar, que se derivan principalmente de los excedentes subsidiados de maíz de los Estados Unidos. Los almidones son hidrolizados para obtener glucosa e invertidos para obtener fructosa y concentrados para tener contenidos de fructosa entre 50 y 90% en masa. En ese país esto se hizo para sustituir el azúcar cubana que dejó de llegar por el bloqueo que este país hizo contra el gobierno cubano. En el caso de México, el consumo de estos jarabes, importados de los EEUU han reducido el mercado industrial del azúcar producido en México por los cañeros e industriales, trayendo como consecuencia de la utilización de este subproducto por parte de la industria refresquera y dulcera enormes pérdidas para este sector, desempleo masivo y más emigración a los EEUU.

Se estima que anualmente se consume un millón de toneladas de jarabes fructosados, los cuales se importan a un precio de cien dólares la tonelada, ya que el maíz está subsidiado en casi un 100% en los EEUU, mientras que el azúcar refinada se cotiza en 540 dólares por tonelada, porque el gobierno mexicano neoliberal ya no la subsidia. Esta desproporción desafía a la industria azucarera a abatir sus costos de producción en una guerra contra el “dumping” de EEUU (Anónimo, 2010a).

Muy probablemente los problemas de obesidad que la sociedad mexicana urbana está enfrentando desde que se consumen estos jarabes fructosados masivamente en todos los alimentos y bebidas procesados se deban a la ingestión crónica de ellos, como ya ocurrió en los EEUU.

2.5 Edulcorantes no nutritivos o artificiales

El origen de los edulcorantes artificiales (compuestos de poder edulcorante superior al de la sacarosa) se remonta al descubrimiento casual de la sacarina en 1879. Esta sustancia fue rápidamente recomendada para las personas diabéticas como sustituto del azúcar. Sin embargo, la sacarina no resultó ser tan eficaz como se esperaba en la industria de los alimentos, ya que se encontró que impartía un resabio metálico y, además, se le cuestionó desde el punto de vista de salud pública. No obstante, las autoridades sanitarias, tanto de los EEUU como de México permitieron nuevamente su empleo. El resabio metálico de la sacarina fue enmascarado asociándolo con el edulcorante ciclamato, descubierto en 1937. La inocuidad de este último también sería cuestionada posteriormente y solamente en la Coca Cola Zero que se expende en México y en los EEUU se ha retirado el ciclamato. En otros países se sigue comercializando con este edulcorante. Sin embargo, para el caso de la sacarina, la Secretaría de Salud de México no ha retirado del mercado los edulcorantes basados en ella.

Estas decisiones llevaron a nuevas discusiones sobre la inocuidad de estas sustancias y, paralelamente, estimularon la búsqueda de nuevos edulcorantes artificiales. Entre los más utilizados están el aspartame, el acesulfame de potasio y la sucralosa.

2.5.1 Sacarina

La sacarina se muestra en la Figura 2.3. Fue descubierta en 1879 por Remsen y Fahlgenb (Solano y Badilla, 2010). Se obtiene a partir de la o-toluen-sulfonamida o de los anhídridos ftálicos y antranílico, con el inconveniente de que provoca un resabio amargo metálico, sobre todo en altas concentraciones. A pesar de que, según sus fabricantes, el hombre la elimina en la orina, existe mucha controversia sobre su inocuidad. Se considera que algunas de las impurezas de su síntesis son tóxicas, aún cuando esto depende de la materia prima de que se parta. Por esta razón, ciertos países tienen regulaciones estrictas para su consumo y exigen se declare su presencia en los alimentos, indicando su riesgo potencial (Belitz y Grosh, 1997), situación que NO ocurre en México.

Las sales de sodio y calcio de la sacarina se utilizan como edulcorantes no nutritivos. Se acepta comúnmente que la sacarina es aproximadamente 300 veces más dulce que la sacarosa, hasta concentraciones equivalentes a una solución de sacarosa al 10%. La forma que tiene mayor poder edulcorante es la sal de sodio. Presenta el inconveniente de dejar cierto sabor residual amargo o “metálico”, lo que ha supuesto su eliminación de ciertos productos al descubrirse otros edulcorantes con mejores propiedades organolépticas.

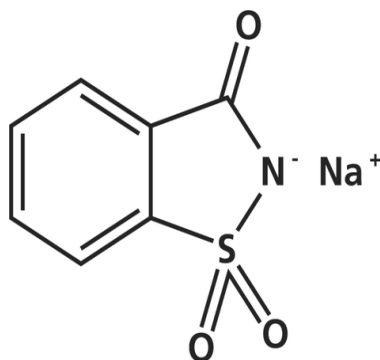


Figura 2.3. Estructura química de la sacarina de sodio (Solano y Badilla, 2010)

2.5.1.1 Propiedades fisicoquímicas de la sacarina

La sacarina en forma de ácido se produce como un polvo blanco, inodoro, cristalino. Es un ácido moderadamente fuerte y es poco soluble en agua. Hay tres formas de sacarina comercialmente disponibles: forma de ácido, de sodio y de calcio. Es estable a temperaturas de más de 125°C y a un pH entre 3.3 y 8.0 (Bautista *et al.*, 2008).

Las formas de sodio y de calcio son muy solubles en agua (S_{H_2O} , 600 g L⁻¹), estables a valores de pH de 2-9 y a tratamientos térmicos moderados. Sus propiedades se numeran en la Tabla 2.4 (Bautista *et al.*, 2005).

2.5.1.2 Metabolismo y efectos a la salud producidos por ingerir sacarina

En los seres humanos la sacarina no aporta calorías. Es absorbida lentamente en el intestino, aparentemente no se metaboliza y se excreta inalterada por los riñones (O'Brien-Nabors, 2001). La contraindicación más cuestionada es la posible formación de tumores en las vías urinarias, sobre todo en la vejiga, algunos autores señalan que en animales de laboratorio la sacarina tiene escasa incidencia carcinogénica (Fennema, 1993). Para algunos escritos científicos no existe suficiente evidencia científica que justifique esta afirmación. Aunque en legislaciones usuales se prohíbe el uso como aditivos alimentarios a toda sustancia que causa cáncer en animales experimentales, la prohibición sobre la sacarina, decretada en EEUU, por la FDA en 1977, ha sido mantenida por razones desconocidas señalando que hasta en tanto no se realice una investigación más definitiva puede seguir siendo ingerida por los humanos (O'Brien-Nabors, 2001).

Tabla 2.4. Propiedades de las distintas formas de sacarina (O'Brien-Nabors, 2001)

	Ácido	Calcio	Sodio
Fórmula molecular	$C_7H_4NO_3S$	$C_7H_4NO_3SNa \cdot 2H_2O$	$[C_7H_4NO_3S]_2Na \cdot 2H_2O$
Punto de fusión	228-229	>300	>300
Apariencia	Polvo blanco	Polvo blanco	Polvo blanco
Solubilidad en agua (g/100g agua)			
$S_{H_2O}^{20^\circ C}$	0.2	100	37
$S_{H_2O}^{50^\circ C}$	0.7	187	127
$S_{H_2O}^{90^\circ C}$	N.R	297	247

N.R. = No reportada

2.5.1.3 Usos en la industria de la sacarina

Las aplicaciones de la sacarina como edulcorante no calórico y en medicina son, cuando está contraindicada la ingestión de glucosa. Tiene una gran variedad de aplicaciones y se utiliza en las siguientes categorías: edulcorantes de mesa, postres dietéticos, cacao en polvo

dietético, crema chantilly, jugos en polvo, multivitamínicos, gelatinas, pasta de dientes, enjuagues bucales y medicamentos.

Comercialmente se le conoce como Sweet & Low™. Actualmente se sigue utilizando en combinación con otros edulcorantes, que proporcionan un mejor sabor, tiene un bajo costo y posee la propiedad de tener una larga vida de anaquel. La IDA (Ingesta Diaria Aceptable), es de 5 mg kg⁻¹. Pueden darse pérdidas de la sustancia durante el almacenamiento teniendo una vida media útil de 5 años. A partir de abril de 2004 el uso de la sacarina, la sacarina de calcio y la sacarina de sodio están autorizadas por la FDA de los EEUU sólo como edulcorante en alimentos dietéticos especiales, tales como bebidas, jugos de frutas y mezclas siempre que no sobrepasen los 12 mg de sacarina por 30 mL de bebida; como sustitutos del azúcar para cocinar y de mesa, sin sobrepasar los 20 mg de sacarina por cucharadita equivalente de azúcar y en alimentos procesados sin sobrepasar los 30 mg de sacarina por porción del alimento (Solano y Badilla, 2010).

2.5.2 Aspartame

Aspartame es el nombre genérico de un edulcorante sintético que da un intenso dulzor. El aspartame o el éster metílico de la L-aspartil-L-fenilalanina, ha sido recientemente aprobado en EEUU como edulcorante en mezclas de alimentos desecados y en bebidas no alcohólicas, denominado en la industria alimentaria con las siglas E951. Su fórmula se representa en la Figura 2.4 (Stegink y Filler, 1992).

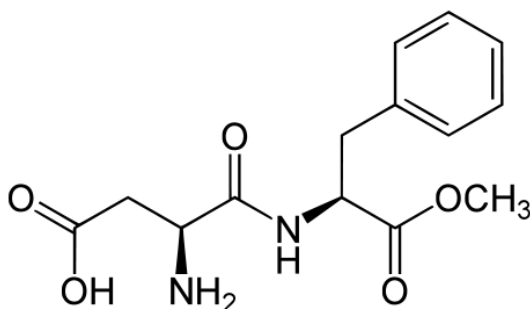


Figura 2.4. Estructura química del aspartame (Stegink y Filler, 1992)

El aspartame es una sustancia calórica ya que es un dipéptido que se digiere completamente. No obstante, su intensa capacidad edulcorante (160 veces más dulce que la sacarosa que posee un valor energético de 4 calorías por gramo), le permite ejercer su función a niveles muy bajos que apenas aportan calorías. Se considera que imparte un sabor dulce similar al de la sacarosa (Fennema, 1993).

El sabor del aspartame no es idéntico al del azúcar ya que su dulzor tiene un resabio más lento y una duración más acentuada que el azúcar. Para contrarrestar esto, se realizan mezclas de aspartame con “acesulfame de potasio” para tener un sabor más parecido al sabor del azúcar y para que resulte ser más potente que cualquier otro edulcorante (Stegink y Filler, 1992).

2.5.2.1 Propiedades fisicoquímicas del aspartame

Químicamente formado por la unión de dos aminoácidos (fenilalanina y ácido aspártico), uno de ellos modificado por la unión de una molécula de metanol, el aspartame tiene una masa molecular de 294 g mol^{-1} y su fórmula condensada es $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_6$. Es un polvo blanco cristalino, inodoro, con un punto de fusión de $246\text{-}247^\circ\text{C}$ (García-Garibay *et al.*, 2004).

Es estable a valores de pH entre 3 y 5 (lo tienen la mayoría de los alimentos), perdiendo su poder fuera de este intervalo, aunque su estabilidad óptima se reporta a un pH de 4.3. En un pH de 3 o menor se produce por hidrólisis ácido aspártico, fenilalanina y metanol, siendo inestable después de 36 días degradándose del 50-60% y se hidroliza completamente en 9 días en pH de 7. Esta inestabilidad química es la responsable de una pérdida parcial del sabor dulce en los alimentos en ciertas condiciones de tratamiento y almacenamiento. Las altas temperaturas lo destruyen por la hidrólisis del enlace éster metílico, por la ruptura de la unión peptídica o por un reacomodo intramolecular que da origen a la dicetopiperazina, agente que no es tóxico. Además, por su carácter proteínico, cuando se calienta en presencia de azúcares reductores, está sujeto a reacciones de Maillard (O'Brien-Nabors, 2001).

En su punto isoeléctrico (pI) de 5.2, es poco soluble en agua, pero aumenta a pH ácido o básico. Su solubilidad depende del pH y la temperatura, se considera como poco soluble en agua y moderadamente soluble en etanol e insoluble en grasas o aceites (Smith, 1993).

La naturaleza peptídica del aspartame lo hace susceptible a la hidrólisis, a las interacciones con otros compuestos químicos y a las degradaciones microbianas; de ahí que sea limitada su vida útil cuando se usa como un edulcorante general en sistemas acuosos. Además de la pérdida de la capacidad edulcorante a consecuencia de la hidrólisis, bien del éster metílico de la fenilalanina o del enlace peptídico entre los dos aminoácidos, el aspartame experimenta fácilmente una condensación intramolecular, para dar origen a dicetopiperazina (ácido acético 5-benzil-3,6-dioxo-2-piperazina). Esta reacción se ve favorecida a valores de pH neutros y alcalinos, ya que los grupos amina no protonizados de la molécula participan más fácilmente en la reacción bajo estas condiciones de pH. De manera similar, los valores pH alcalinos favorecen las reacciones amino-carbonilo, habiéndose comprobado que el aspartame reacciona fácilmente con la glucosa y la vainillina bajo estas condiciones. En la reacción con la glucosa, la principal consecuencia es la pérdida de la capacidad edulcorante del aspartame durante el almacenamiento y en la reacción con el otro compuesto se produce la pérdida del sabor a vainilla (Fennema, 1993).

2.5.2.2 Metabolismo del aspartame

El aspartame se transforma inmediatamente en el organismo en fenilalanina, ácido aspártico y metanol. Según sus comercializadores, los dos primeros son constituyentes normales de las proteínas, componentes naturales de todos los organismos y dietas posibles. Ellos señalan que la fenilalanina es además un aminoácido esencial, es decir, que el hombre no puede sintetizarlo en su organismo y tiene que obtenerlo forzosamente de la dieta y que la fenilalanina no tiene ningún otro papel metabólico normal que ser el precursor directo de la tirosina. Sin embargo, la presencia de concentraciones elevadas de fenilalanina en la sangre se encuentra asociada con el retraso mental severo en una enfermedad congénita rara, conocida con el nombre de fenilcetonuria producida por la carencia de un enzima esencial para degradar a este aminoácido.

También señalan sus comercializadores que la utilización de aspartame a los niveles concebibles en la dieta produce una elevación de la concentración de fenilalanina en la sangre menor que la producida por una comida normal. Cantidades muy elevadas, sólo ingeribles por accidente, producen elevaciones en la concentración de fenilalanina en la sangre, inferiores a las consideradas nocivas que, según ellos, desaparecen rápidamente. Sin embargo, en el caso de las personas que padecen fenilcetonuria, el uso de este edulcorante les aportaría una cantidad suplementaria de fenilalanina, lo que no es aconsejable. Por otra parte, el metanol resultante, es un producto tóxico, pero según los comercializadores del aspartame, la cantidad formada en el organismo por el uso de este edulcorante es muy inferior a la que podría representar riesgos para la salud y, en su uso normal, inferior incluso a la presente en forma natural en muchos alimentos, como los zumos de frutas (Pérez, 1997).

El aspartame, como otro péptido, tiene un valor calórico de 4 kilocalorías (17 kJ/g), pero la cantidad de aspartame que se necesita para producir un sabor dulce es tan pequeña que su contribución calórica es despreciable, lo que lo hace un edulcorante popular por intentar evitar las calorías del azúcar.

2.5.2.3 Efectos a la salud producidos al ingerir aspartame

El consumo del aspartame está restringido para las personas que son fenilcetonúricas o intolerantes a concentraciones elevadas de fenilalanina debido a la carencia de la 4-monooxigenasa, enzima relacionada con el metabolismo de este aminoácido en el hígado; la acumulación de la fenilalanina o de sus derivados en la sangre provoca una mielinización deficiente del cerebro y en consecuencia, un retraso mental. Algunos trabajos han mostrado su inocuidad, por lo que algunos países los permiten en productos muy específicos (O'Brien-Nabors, 2001). Los productos alimenticios edulcorados con aspartame deben etiquetarse de forma que quede bien visible su contenido en fenilalanina, al objeto de evitar su consumo por individuos con fenilcetonuria (Fennema, 1993).

En un estudio realizado en ratas de laboratorio, cuando éstas ingirieron agua endulzada con aspartame su masa corporal y su contenido de grasa en el tejido pericárdico fueron casi tan grandes como los de aquellos modelos animales que ingirieron fructosa, siendo los dos grupos más altos cuando se compararon con el lote control que bebió agua sin edulcorantes, de 1,127,949.7 micrómetros cuadrados que, comparado con la del lote control, de 293,153.7 micrómetros cuadrados es casi 4 veces mayor (Martínez-Tinajero *et al.*, 2010).

2.5.2.4 Usos del aspartame en la industria

Se utiliza comúnmente en bebidas carbonatadas, productos en polvo para bebidas, yogurt, caramelos, productos de confitería y también como “azúcar” de mesa. Su estabilidad es excelente en aplicaciones para productos secos (en tabletas, pastillas, polvos para preparar bebidas). Soporta los procesos de pasteurización (como los usados en productos lácteos y jugos), procesos asépticos y otros en los cuales las condiciones de temperatura alta se lleven a cabo por corto tiempo. En la actualidad, se estima que el aspartame es usado en aproximadamente 6,000 diferentes productos en todo el mundo.

La Ingesta Diaria Admisible (IDA) es de 40 mg kg^{-1} . Por otra parte, es el más importante de los nuevos edulcorantes artificiales. Fue descubierto en 1965, se autorizó su uso inicialmente en Estados Unidos como edulcorantes de mesa, aunque desde 1983 se autorizó en ese país como aditivo en una amplia serie de productos. Aunque como tal no existe en la naturaleza y la aportación calórica es igual que la del azúcar, en las concentraciones utilizadas habitualmente este aporte energético resulta despreciable (García-Garibay *et al.*, 2004).

El aspartame no tiene ningún regusto o resabio y es relativamente estable es medio ácido, pero no es resistente a las altas temperaturas, por lo que presenta problemas para usarse en repostería ya que pierde sus propiedades e incluso el dulzor.

Se comercializa bajo varias marcas de fábrica, como “Equal” y “Canderel”. Sustituyendo al azúcar es muy empleado por los diabéticos. El aspartame está disponible en forma líquida,

granulada, encapsulada y en polvo, a fin de ampliar su uso en alimentos y bebidas. La forma encapsulada ha hecho que el aspartame tenga mayor estabilidad térmica, con lo que ha empezado a utilizarse en algunos productos horneados.

2.5.3 Acesulfame de potasio (acesulfame-K)

Clauss y Jensen, en 1967, descubrieron accidentalmente un compuesto con sabor dulce, la 5,6-dimetil-1,2,3-oxatiazina-4 (3H)-ona-2,2-dióxido de carbono, con un sistema de anillos que anteriormente no se habían sintetizado. En 1978, de la Organización Mundial de la Salud registró la sal de potasio del acesulfame como nombre genérico para este compuesto. Éste es a menudo llamado acesulfame-K por el símbolo químico del potasio, que es K. También es conocido como acesulfamo-K, acesulfame y comercialmente es conocido como *Sussly*, *Sunett*, *Sweet One*.

Derivado de los ácidos acetoacético y sulfámico tiene una estructura química que en algunos aspectos semeja a la de la sacarina (Figura 2.5) y un poder edulcorante de 150 a 200 veces el de la sacarosa.

Es estable a temperaturas elevadas, muy hidrosoluble, mantiene sus propiedades sensoriales en un intervalo amplio de pH y, en general, no deja un resabio desagradable, excepto en altas concentraciones. Se emplea en bebidas refrescantes, lácteos, panificación, dulces y muchos otros, tiene un efecto sinérgico con el aspartame, la sucralosa y la fructosa (Belitz y Grosh, 1997).

Recientemente el acesulfame de potasio (6-metil-1,2,3-oxatiazina-4 (3H)-ona-2,2-dióxido) ha sido aprobado como edulcorante no nutritivo en el Reino Unido y se espera su aprobación inmediata en otros muchos países incluyendo los EEUU (Fennema, 1993).

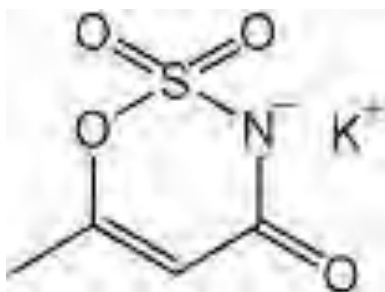


Figura 2.5. Estructura química del acesulfame de potasio (O'Brien-Nabors, 2001)

El acesulfame K es unas 200 veces más dulce que la sacarosa en solución al 3% presentando un dulzor entre el del ciclamato y la sacarina. Según sus fabricantes después de numerosas pruebas se ha comprobado que no tiene efectos tóxicos sobre los animales y además presenta una excepcional estabilidad en las aplicaciones alimentarias. El acesulfame de K puede prepararse con una pureza muy alta por procedimientos de síntesis relativamente baratos. Por su reciente aparición como edulcorante, la experiencia que se tiene en aplicaciones a los alimentos es limitada pero, según sus fabricantes, puede ser una alternativa a otros edulcorantes no nutritivos (Fennema, 1993).

Sin embargo, se ha encontrado recientemente que su ingestión propicia la mayor asimilación de la glucosa ingerida con otros alimentos, lo que promueve la ganancia en masa corporal. Los edulcorantes artificiales estudiados por estos investigadores que promueven esa mayor asimilación de glucosa en el tracto digestivo son: Acesulfame de potasio ~ sucralosa > sacarina, en paralelo con una habilidad de incrementar la concentración de calcio intracelular. Esto refuerza el por qué algunos consumidores en vez de adelgazar cuando consumen estos edulcorantes aumentan su masa corporal (Mace *et al.*, 2007).

2.5.3.1 Propiedades fisicoquímicas

El acesulfame-K tiene una masa molecular de 201.2 g mol^{-1} , su fórmula condensada es $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNO}_4\text{S}$, se descompone alrededor de 235°C , a temperaturas prolongadas se induce la polimerización. Es un polvo blanco cristalino. A temperatura ambiente se pueden disolver

hasta 270 g L⁻¹ a 20°C y aumenta hasta 1 kg L⁻¹ a 100°C. Es muy estable en polvo, logrando mantenerse durante años, incluso expuesto a la luz. Es estable a pH 3-7 a una temperatura de 4°C (O'Brien-Nabors, 2001).

2.5.3.2 Metabolismo del acesulfame-K

El acesulfame-K no es metabolizado por el cuerpo humano, según sus fabricantes. Para investigar las posibles transformaciones metabólicas, se utilizó el acesulfame-K marcado con ¹⁴C. Se realizaron estudios en ratas, perros y cerdos. Como los estudios en animales no mostraron ningún efecto en el metabolismo, se probó en humanos voluntarios con el acesulfame-K marcado, las diferentes especies animales, así como los voluntarios humanos, excretaron el compuesto original y no se encontró actividad atribuible a los metabolitos.

Debido a que el acesulfame-K se excreta sin metabolizar por completo, no tiene ningún valor calórico y, hasta 2001 no se había demostrado que causara efectos a la salud por su consumo (O'Brien-Nabors, 2001). Existe, sin embargo, el estudio mencionado párrafos arriba que indica que sí modifica el metabolismo de asimilación de los glúcidos y del calcio intracelular (Mace *et al.*, 2007). Esto indica que deberá estudiarse con mayor profundidad el rol que este edulcorante juega en el metabolismo humano.

La IDA de acesulfame-K ha sido establecida en 15 mg kg⁻¹ de peso corporal (JECFA). En marzo 2000, el Comité Científico de la Alimentación de la Comisión Europea confirmó la IDA del acesulfame-K de 9 mg kg⁻¹ de peso corporal. En los alimentos, bebidas y cosméticos es estable en condiciones normales de almacenamiento.

2.5.3.3 Usos en la industria

Es usado como edulcorante en un amplio número de productos alimenticios. Se utiliza en los alimentos bajos en calorías y en azúcares para diabéticos, productos de higiene bucal, farmacéuticos y alimentos para animales. Debido a que presenta buena estabilidad y solubilidad, es utilizado particularmente en bebidas y refrescos. Las bebidas que contienen

este edulcorante pueden pasteurizarse o se les puede aplicar el proceso de ultrapasteurizado, también puede utilizarse en productos horneados. En bebidas calientes, el poder edulcorante es normalmente más bajo que a temperatura ambiente. Es ligeramente más elevado en bebidas ácidas que en soluciones neutras. El sabor dulce del acesulfame-K se percibe de forma rápida, sin retardo y persiste un poco más que el de la sacarosa. Cuando se utiliza en altas concentraciones se perciben sabores no deseados (amargo y metálico).

2.5.4 Sucralosa

La sucralosa se descubrió por error en 1976 por el estudiante hindú Shashikant Phadnis y su supervisor Leslie Houngh del Queen Elizabeth College de Londres cuando trataban de obtener azúcares clorados para utilizarlos como intermediarios en una síntesis orgánica. En 1980, se vendieron los derechos de manufactura a la farmacéutica Johnson & Johnson, la cual creó una nueva compañía – Mc Neil Nutritional LLC – que se hizo responsable de la producción y venta de la sucralosa, la cual fue comercializada con el nombre de Splenda® (Grenby, 1989).

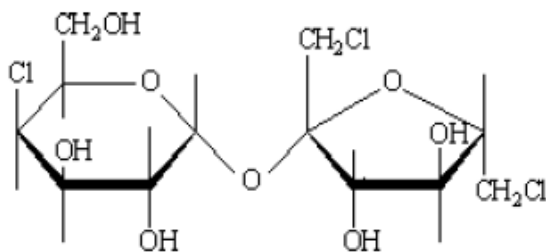


Figura 2.6. Estructura química de la sucralosa (Grenby, 1989)

Se le ha nombrado sucralosa al compuesto químico 1,6-dicloro-1,6-dideoxi-β-D-fructofuranosil-4cloro-4deoxi-α-D-galactopiranosido (Figura 2.6), aunque se le llama también tricologalactosacarosa ó 4,1',6'-triclorogalactosacarosa (TGS). Es el único edulcorante artificial que se obtiene a partir de la sacarosa. El proceso consta de 5 etapas donde se sustituyen selectivamente tres átomos de cloro en la molécula de sacarosa, dando como producto final la sucralosa con la pureza aproximada del 98% (Anónimo, 2010b).

Se conserva durante largos periodos de tiempo en estado sólido, es estable en soluciones con diferentes pH. Sin embargo, bajo determinadas condiciones de almacenamiento, extrema acidez y altas temperaturas, puede producirse hidrólisis parcial. Debido a esto se obtienen los monosácaridos: 4-cloro-4-deoxi-galactosa (4-CG) y 1,6-dicloro-1,6-dideoxifruktosa (1,6-DCF).

2.5.4.1 Propiedades fisicoquímicas de la sucralosa

La sucralosa tiene una masa molecular de 397 g mol^{-1} y su fórmula condensada es $\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{Cl}_3\text{O}_8$. Es un polvo blanco cristalino, inodoro, su punto de fusión es de 130°C , es muy hidrosoluble (250 g L^{-1}) a 20°C y es poco soluble en lípidos, estable a pH 3-7 y resiste las altas temperaturas de la panificación, su dulzor relativo varía con el pH, la temperatura, la concentración y la mezcla de los demás ingredientes (Grenby, 1996; O'Brien-Nabors 2001; Smith, 1993).

La sucralosa tiene sinergismo con otros edulcorantes de alta intensidad como el ciclamato y el acesulfame-K, pero su intensidad se reduce con el aspartame y la sacarina (O'Brien-Nabors, 2001).

2.5.4.2 Metabolismo y efectos a la salud por ingerir sucralosa

La sucralosa es 500-600 veces más dulce que el disacárido sacarosa; su sabor dulce es muy semejante al de la sacarosa, sin resabio amargo y la intensidad del dulzor perdura por más tiempo, el uso no está totalmente aceptado en todos los países y algunos establecen ciertas restricciones (Belitz y Grosh, 1997).

Con base en los estudios de metabolismo analizados por JECFA, uno de los programas de seguridad más completos que han establecido diversos científicos y reguladores de todo el mundo, se ha determinado que la sucralosa es inofensiva para el ser humano y que si bien sus productos de hidrólisis se pueden producir en pequeñas cantidades y en diversos derivados, estos son excretados sin cambios, aunque hay ciertas incongruencias entre los

autores (Jiménez, 2008). Mace y colaboradores (2007), por ejemplo, señalan que está entre los tres edulcorantes que promueven la absorción de la glucosa ingerida y del calcio intracelular.

En el estudio de Martínez-Tinajero y colaboradores (González-Filomeno, 2007), las ratas de laboratorio que ingirieron agua endulzada con sucralosa tuvieron una masa corporal mayor que sus contrapartes que ingirieron agua sin edulcorantes y el lote que ingirió agua endulzada con sacarosa. El contenido de grasa pericárdica también fue mayor (860,178 versus 293,154 y 347,182 micrómetros cuadrados, para los lotes con agua endulzada con sucralosa, agua sin endulzar y agua azucarada, respectivamente, o sea, casi 3 veces más que el control y casi 2.5 veces más que el agua azucarada).

La IDA de la sucralosa se ha fijado de 0-15 mg kg⁻¹ de peso corporal por la JECFA y por el Comité Científico de la Alimentación (Scientific Committee on Food SCF) en Unión Europa en septiembre 2000 (Grenby, 1996).

2.5.4.3 Usos de la sucralosa en la industria

La sucralosa se utiliza en mezclas con azúcar u otros edulcorantes y ha mostrado ser resistente a las temperaturas altas, lo que permite su horneado y cocción. Se utiliza en panadería, repostería, gelatinas, mermeladas, alimentos procesados, bebidas no alcohólicas, bebidas gaseosas, jugos envasados, frutas procesadas, lácteos, goma de mascar, cereales para desayuno, salsas, como sustituto de azúcar de mesa, etc. Para facilitar el uso como edulcorante de mesa se mezcla con maltodextrina (Bautista *et al.*, 2005).

2.6 Métodos para la determinación de los edulcorantes

2.6.1 Determinación de azúcares (sacarosa y fructosa)

Los métodos instrumentales modernos, tales como cromatografía de gas, cromatografía líquida de alta resolución, análisis enzimático, la electroquímica o los métodos de

espectrometría, pueden proporcionar información sobre el contenido total de azúcares y la concentración específica de cada carbohidrato.

La espectroscopia infrarroja (IR) es uno de los métodos espectroscópicos más comúnmente utilizados para la determinación de azúcar debido a las bandas de absorción que los hidratos de carbono presentan en esta región de longitud de onda de infrarrojo cercano. IRN (*NIR*, por sus siglas en inglés). Ésta se emplea por las ventajas que presenta frente a otros métodos, dentro de las cuales destacan el uso de tiempo de paso de luz, celdas de vidrio óptico y la posibilidad de empleo de fibras ópticas en el análisis de control. Por tanto, se usa el IRN para la determinación de azúcares por métodos de calibración tradicional, tales como la regresión de mínimos cuadrados aplicado desde una hasta cuatro longitudes de onda. La transmitancia de derivados es el método que se usa en segundo lugar, tanto para el contenido de azúcares totales como para el contenido de azúcares de manera individual (glucosa, fructosa, sacarosa, usados como ejemplo), con lo que se obtienen buenos resultados para azúcares totales, pero se observa poca sensibilidad y precisión para el análisis de los azúcares individuales (Rambla *et al.*, 1997).

Entre las técnicas más útiles para la determinación de azúcares se encuentran las espectrofotométricas y las fluorométricas empleando diferentes reactivos. También son muy usadas, la cromatografía de líquidos de alta resolución, CLAR, y la combinación de las técnicas de análisis por inyección en flujo con los métodos enzimáticos (Valdés *et al.*, 2001).

2.6.2 Determinación de edulcorantes artificiales

Para la determinación de edulcorantes existe una gran cantidad de investigaciones. La mayoría de los métodos han sido desarrollados para edulcorantes individuales, algunos de estos están disponibles para los productos alimenticios e incluyen la espectrometría, la polarografía de pulso diferencial, la sublimación, la potenciometría, la cromatografía micelar electrocinética capilar y la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR).

Varios trabajos han demostrado la utilidad de la electroforesis capilar para el análisis de varios edulcorantes artificiales. Sin embargo, los métodos como el espectrofotométrico, el gravimétrico o los métodos electroquímicos requieren a menudo demasiado tiempo. El uso de la CLAR en combinación con la detección con luz ultravioleta (UV) se ha convertido en el método de elección para la determinación de cada uno de los edulcorantes artificiales como sacarina, aspartame y acesulfame-K (Chen y Wang, 2001).

La falta de un grupo cromóforo en la sucralosa hace difícil una detección sensible y específica de absorción de los rayos UV directos. Como resultado, los actuales métodos de análisis para su determinación en los productos alimenticios supone la detección por el índice de refracción, IR (*RI*, por sus siglas en inglés) o la absorbancia UV a una longitud de onda de 200 nm. Otros métodos que han sido aplicados con éxito son la cromatografía en capa fina, la cromatografía de intercambio aniónico con detección amperométrica pulsada o por electroforesis capilar con absorción UV indirecta (Wasik *et al.*, 2007).

La cromatografía líquida (CLAR) ha sido la opción más popular para la determinación de los seis edulcorantes en estudio. Se han desarrollado muchos métodos para el análisis de edulcorantes de manera individual. En esta investigación, el método de análisis por CLAR que se plantea es con el fin de determinar los edulcorantes de manera individual y, simultáneamente, utilizando fase reversa con gradiente de elución y detección de absorción UV. A continuación se mencionan las características más importantes de la cromatografía.

2.7 Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)

La cromatografía es una técnica que permite separar, aislar, identificar y cuantificar los componentes de una mezcla de compuestos químicos. La muestra se distribuye entre dos fases: una estacionaria y una móvil. Cada uno de los componentes de la mezcla se retiene selectivamente, dependiendo de su afinidad con cada fase. Debido a esto, se establece un equilibrio entre ambas fases, el cual se puede representar por medio de una constante de equilibrio (Skoog y West, 2001):

$$K_{eq} = \frac{[analito]_{FASE\ ESTACIONARIA}}{[analito]_{FASE\ MÓVIL}}$$

Existen diferentes criterios de clasificación de la cromatografía:

a) Por la naturaleza de sus fases:

- Cromatografía líquido-líquido
- Cromatografía gas-líquido
- Cromatografía líquido-sólido
- Cromatografía gas-sólido

b) Atendiendo al proceso químico-físico en el proceso de separación: siendo éste el criterio más coherente de clasificación:

- Cromatografía de adsorción (líquido - sólido o cromatografía de fases normales)
- Cromatografía de reparto (o líquido - líquido), se basa en las características de solubilidad relativa de los solutos entre la fase móvil y una fase estacionaria de un líquido no polar. La fase líquida se impregna a un soporte inerte de sílice o, en el caso de cromatografía de fase invertida, se une químicamente
- Cromatografía de intercambio iónico
- Cromatografía de exclusión.

c) Con base en la naturaleza del soporte en el que se aloja la fase estacionaria:

A. Cromatografía plana

1. Cromatografía en papel
2. Cromatografía en capa fina (TLC)

B. Cromatografía en columna

1. Cromatografía de gases (GC)
2. Cromatografía líquida (LC)
 - a. Cromatografía líquido-líquido
 - b. Cromatografía sólido-líquido

En la cromatografía de líquidos de alta resolución o CLAR por sus siglas en español (*HPLC*, por sus siglas en inglés), el principio cromatográfico puede ser considerado como un conjunto de fuerzas que compiten de manera selectiva por un compuesto (analito o soluto) para, por una parte fijarlo al relleno de la columna o fase estacionaria, o llevarlo disuelto en los líquidos que fluyen a través de la columna o fase móvil (Rubinson y Rubinson, 2000). Los diferentes tipos de fuerza entre fase estacionaria y solutos que definen los distintos tipos de cromatografía de líquidos se presentan en la Tabla 2.5.

Tabla 2.5. Tipos de cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) (Rubinson y Rubinson, 2000)

Proceso cromatográfico	Fuerzas implicadas	Nombre alternativo	Denominación en español
Adsorción-reparto	De adsorción	Líquido-sólido	CLS
Partición	De partición	Líquido-Líquido	CLL
Iónicas	De intercambio iónico	-----	CIE
	De par iónico De supresión iónica		CPI
Penetrabilidad en poros	De exclusión molecular	Cromatografía de geles (filtración o permeación)	CEM

En la de **partición** la fase estacionaria es líquida y es necesario ligarla sobre partículas inertes (generalmente sílice) para que permanezca fija en la columna. Hoy en día los grupos funcionales se fijan mediante enlace químico a las partículas del relleno o empaque, lo que permite a la fase estacionaria resistir las altas presiones aplicadas en CLAR. Hay dos posibilidades en la cromatografía de partición: cromatografía en fase normal y en fase reversa. En esta investigación se trabajó con cromatografía de partición con fase reversa (Pérez *et al.*, 2010).

En la cromatografía de fase reversa la fase estacionaria es no polar y la fase móvil es polar respecto de la muestra, por ejemplo, con grupos C_8 ó C_{18} . La cromatografía de partición en fase inversa es la más utilizada de todas las técnicas CLAR, pues las fases móviles polares permiten separar una amplia variedad de compuestos de interés bioquímico, farmacológico o químico. En fase inversa la retención está basada en una atracción primaria entre la fase estacionaria y la región no polar del analito. El orden de elución es de hidrofílico a hidrofóbico, de polar a no polar. Para aumentar la retención de un compuesto, es necesario aumentar la polaridad de la fase móvil. La fase estacionaria más común es C_{18} . Las fases móviles más comunes son; acetonitrilo, metanol, tetrahidrofurano, etc., con agua como componente de la fase móvil (Cedillo-Ramírez 2002).

2.7.1 Instrumentación

Los componentes esenciales que forman parte de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución se muestran en la Figura 2.7 y, a continuación, se describen cada uno.

A. Fase móvil

Aunque no es parte del instrumental propiamente dicho, es importante recalcar ciertos aspectos importantes de la fase móvil como son: el de disolver a la muestra; debe ser de alta pureza; tener baja viscosidad; ser compatible con el tipo de detector; tener polaridad adecuada; ser inerte y no tóxico y ser barato o accesible. Los disolventes más utilizados en cromatografía de líquidos son: hexano-cloruro de metileno, cloroformo, tetrahidrofurano, acetonitrilo, isopropanol, metanol y agua. La fase móvil se puede almacenar en recipientes de vidrio, acero inoxidable o plástico inerte. La toma del disolvente generalmente se hace filtrando previamente, con el objetivo de retener las pequeñas partículas que pueden obstruir y dañar el sistema de bombeo y la columna (Skoog y West, 2001). Muchas veces, en especial con fases móviles polares, hay una tendencia del oxígeno y otros gases a disolverse en el líquido, que dentro del instrumento forman burbujas que pueden afectar el sistema de bombeo, disminuir la eficacia de la columna y afectar el funcionamiento del detector, por lo que es conveniente desgasificar los disolventes.

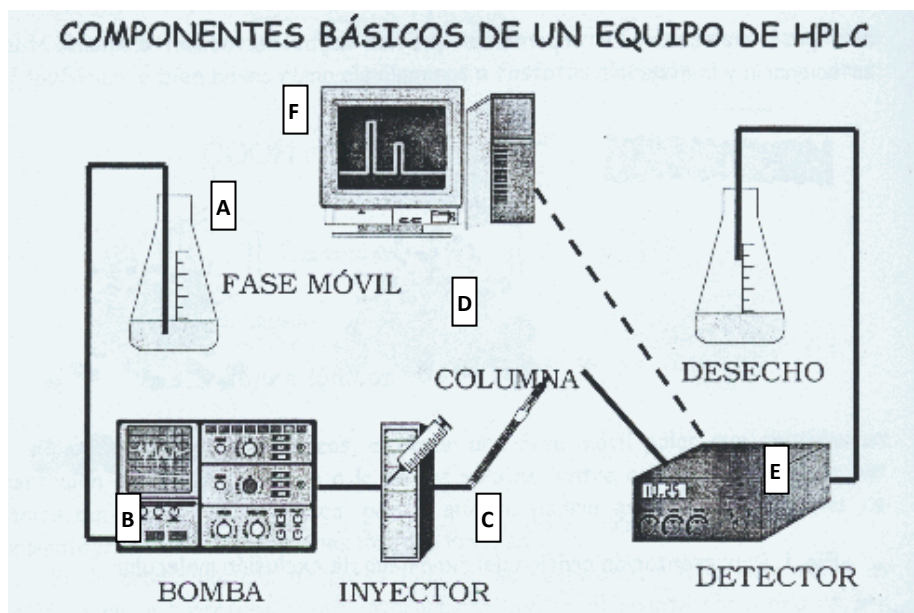


Figura 2.7. Componentes básicos de un equipo de CLAR (Pérez *et al.*, 2010)

Dependiendo de si la fase móvil mantiene la composición durante la corrida o varía, se puede trabajar bajo dos formas (Skoog y West, 2001):

- Isocrática. Se mantiene el mismo poder de elución; esto es, que se mantiene la misma composición de la fase móvil (la proporción del disolvente o los disolventes que la constituyen no varían durante el tiempo que dure el análisis en el cromatógrafo).
- Gradiente de elución. Se varía el poder de elución, lo cual provoca una variación en la composición de la fase móvil durante el tiempo que dura el análisis cromatográfico.

B. Sistema de bombeo

Las columnas que se utilizan en la cromatografía de líquidos están rellenas de materiales especiales de partículas muy pequeñas, lo cual hace que la resistencia al flujo de la fase móvil sea muy elevada. Por esta razón, se requiere un sistema de bombeo que haga fluir la fase móvil a un flujo razonable, pues de lo contrario los análisis serían excesivamente lentos. Los aspectos más importantes del sistema de bombeo son:

- Presión máxima de operación (usualmente 400 atm)

- Intervalo de volúmenes obtenibles (entre 0.5 y 10 mL min⁻¹)
- Reproducibilidad y constancia del flujo (aproximadamente 1%)
- Características de flujo (continuo a pulsado)

De acuerdo con las características de funcionamiento y de diseño, se pueden considerar básicamente dos tipos de bombas: bombas neumáticas y bombas mecánicas.

En lo que atañe a las mecánicas existen dos tipos distintos:

- Bombas “reciprocantes” (pistón o diafragma)
- Bombas de desplazamiento continuo

Debido a que se trabajó con un cromatógrafo de líquidos que tiene integrada una bomba de doble pistón (reciprocante), sólo se explicará el funcionamiento de dicha bomba.

La forma en como opera dicha bomba es la siguiente: mediante el movimiento de dos pistones sincronizados, los cuales tienen un sistema de válvulas (llamadas válvulas “check” que son esferas usualmente de cuarzo o zafiro), que alternadamente se abren y cierran, se llenan y vacían alternamente una pequeña cámara, con el fin de que mientras uno de los pistones carga la cámara de fase móvil, el otro pistón expulsa hacia el sistema cromatográfico; con esto es posible mantener volúmenes y flujos constantes y eliminar las posibilidades de afectar el sistema cromatográfico (Alcalá-Silva, 2007).

C. Inyector

El sistema de inyección de muestra que más se emplea se basa en bucles o “*loops*” de muestra, que son tubos enrollados en forma de bucles o válvulas dosificadoras que permiten una aplicación cuantitativa y reproducible a presión elevada (Pérez *et al.*, 2010). Es el dispositivo por el cual la muestra es introducida al sistema cromatográfico éste puede ser manual, empleando una jeringa de volumen adecuado o automático como lo es en este trabajo, empleando un dispositivo también llamado automuestreador; es el más usado actualmente, ya que minimiza los errores. Los volúmenes que se manejan van de 5 a 200 µL (Cedillo-Ramírez, 2002). Para este estudio el volumen inyectado fue de 20 µL.

D. Columna

En todo sistema cromatográfico, ya sea en fase líquida o gaseosa, la columna es la parte más importante del sistema, puesto que en ella se lleva a cabo la separación de los componentes de la muestra en estudio. A continuación se hace una descripción de las características generales de ésta.

Básicamente, la columna consiste en un segmento de tubo de algún material inerte (usualmente acero inoxidable), de diámetro uniforme y capaz de resistir altas presiones. La longitud de la columna es, por lo general, de entre 10 y 30 cm, aunque en ocasiones puede ser más larga o más corta. El diámetro en la mayoría de los casos es de 1-4 mm, pero en columnas de tipo preparativo es de hasta más de 1 cm. Los empaques tienen un tamaño de partícula de 5 a 10 μm (Skoog y West, 2001).

E. Detector

Es el instrumento que mide en forma continua algunas propiedades fisicoquímicas de los componentes de la muestra, generando una señal conforme éstos salen de la columna.

Al considerar un detector en términos de su aplicación a un cierto problema o evaluar las cualidades de un cierto diseño, deben tenerse en cuenta ciertas propiedades generales, tales como (Skoog y West, 2001):

- **Respuesta:** puede ser universal o selectiva, según la capacidad que tenga el detector de trabajar con todo tipo de compuestos o con sólo un tipo de compuesto específico.
- **Sensibilidad:** Es la razón entre la señal generada y la cantidad de muestra que produce dicha señal.
- **Ruido:** Es la variación en la señal del instrumento que no es atribuida a la muestra y que puede ser producida por alguna falla electrónica, variaciones en el flujo o temperatura, fluctuaciones del voltaje o burbujas de aire atrapadas en el detector, entre otras.

- Linealidad: Para utilizar la señal generada por el detector como una medida cuantitativa, dicha señal debe guardar una relación lineal con la concentración de la muestra.
- Estabilidad: Un buen detector debe ser insensible a los cambios de temperatura y a la variación del flujo. Los más usados son:
 - Detector UV
 - Detector de índice de refracción
 - Detector de fluorescencia
 - Detector de fluorescencia inducida por láser
 - Detectores electroquímicos.

El detector utilizado en el análisis de edulcorantes en esta investigación fue un detector UV-Visible de longitud de onda variable. Su funcionamiento se basa en la absorción de la luz por parte de la muestra al pasar a través de ella un haz de luz ultravioleta. Los analitos contenidos en la muestra que absorben dicha luz son llamados cromóforos y en general son compuestos con dobles ligaduras conjugadas y sistemas aromáticos, también pueden absorber iones de compuestos inorgánicos y algunos cationes de los metales de transición.

F. Sistema de adquisición y procesamiento de datos (registrador)

Como su nombre lo indica, el objetivo de este sistema es adquirir las señales generadas por la muestra en el detector y procesar las mismas para hacer una representación gráfica (cromatograma); esto se puede lograr mediante un registrador, un integrador electrónico o una computadora (Alcalá-Silva, 2007).

2.8 Muestreo estadístico

Una condición fundamental para realizar un estudio estadístico de cualquier tipo es considerar que los resultados que se obtengan sean confiables. Las técnicas del muestreo se utilizan frecuentemente cuando no es posible contar o medir todos los elementos de la población debido al alto costo que esto implica y a la imposibilidad de acceder a la misma.

El uso del muestreo se extiende al estudio de diversos fenómenos sociales, educativos, de salud, económicos y políticos. El muestreo estadístico es aquel que utiliza técnicas originadas en el cálculo matemático y de probabilidades. Es condición esencial que, en el caso de aplicarse muestreos estadísticos, la selección de la muestra sea hecha enteramente al azar, es decir, que todos y cada uno de los componentes del universo tenga la misma probabilidad de integrar la muestra a extraerse (Vivanco, 2005).

2.8.1 Concepto de muestreo

La expresión “muestreo”, define al proceso de inferir conclusiones acerca de un conjunto de elementos (generalmente llamado “universo” o “población”) mediante el estudio del comportamiento de un cierto número de esos elementos (normalmente denominado “muestra”) empleando técnicas estadísticas. La muestra debe ser representativa y, por lo tanto, útil. Debe de reflejar las similitudes y diferencias encontradas en la población, es decir, ejemplificar las características de ésta. Los errores más comunes que se pueden cometer al tomar una muestra son:

1. Hacer conclusiones muy generales a partir de la observación de sólo una parte de la población. Se le denomina error de muestreo
2. Hacer conclusiones hacia una población mucho más grande de la que originalmente se tomó la muestra. Se llama error de inferencia (Anónimo, 2010c).

2.8.2 Tipos de muestreo

Los autores proponen diferentes criterios de clasificación de los diferentes tipos de muestreo, aunque en general pueden dividirse en dos grandes grupos: métodos de muestreo probabilístico y métodos de muestreo no probabilístico (Malhotra, 2004).

2.8.2.1 Métodos de muestreo probabilístico (Malhotra, 2004)

Los métodos de muestreo probabilístico son aquellos que se basan en el principio de equiprobabilidad. Es decir, aquellos en los que todos los individuos tienen la misma probabilidad de ser elegidos para formar parte de una muestra y, consiguientemente, todas las posibles muestras de tamaño n tienen la misma probabilidad de ser seleccionadas. Sólo estos métodos de muestreo probabilístico aseguran la representatividad de la muestra extraída y son, por tanto, los más recomendables. Los muestreos probabilísticos pueden ser **con** o **sin** reemplazo:

- Los **muestreos con reemplazo** son aquellos en los que una vez que ha sido seleccionado un individuo (y estudiado) se le toma en cuenta nuevamente al elegir el siguiente individuo a ser estudiado
- Los **muestreos sin reemplazo** son los que una vez que se ha tomado en cuenta un individuo para formar parte de la muestra, no se le vuelve a tomar en cuenta nuevamente.

Las técnicas de muestreo estadístico que se mencionarán son básicamente cuatro: el aleatorio simple, sistemático, estratificado y por conglomerados.

- ◆ **Muestreo aleatorio simple:** El procedimiento empleado es el siguiente: 1) se asigna un número a cada individuo de la población y 2) a través de algún medio mecánico (bolas dentro de una bolsa, tablas de números aleatorios, números aleatorios generados con una calculadora u ordenador, etc.), se eligen tantos sujetos como sea necesario para completar el tamaño de muestra requerido. Este procedimiento, atractivo por su simpleza, tiene poca o nula utilidad práctica cuando la población que se maneja es muy grande.
- ◆ **Muestreo aleatorio sistemático:** Este procedimiento exige, como el anterior, numerar todos los elementos de la población, pero en lugar de extraer n números aleatorios sólo se extrae uno. Se parte de ese número aleatorio i , que es un número elegido al azar, y los elementos que integran la muestra son los que ocupa los

lugares $i, i+k, i+2k, i+3k, \dots, i+(n-1)k$, es decir se toman los individuos de k en k , siendo k el resultado de dividir el tamaño de la población entre el tamaño de la muestra: $k= N/n$. El número i que se emplea como punto de partida será un número al azar entre 1 y k . El riesgo este tipo de muestreo está en los casos en que se dan periodicidades en la población ya que al elegir a los miembros de la muestra con una periodicidad constante (k) se puede introducir una homogeneidad que no se da en la población.

- ◆ **Muestreo aleatorio estratificado:** Trata de obviar las dificultades que presentan los anteriores ya que simplifican los procesos y suelen reducir el error muestral para un tamaño dado de la muestra. Consiste en considerar categorías típicas diferentes entre sí (estratos) que poseen gran homogeneidad respecto a alguna característica (se puede estratificar, por ejemplo, según la profesión, el municipio de residencia, el sexo, el estado civil, etc.). Lo que se pretende con este tipo de muestreo es asegurarse de que todos los estratos de interés estarán representados adecuadamente en la muestra. Cada estrato funciona independientemente, pudiendo aplicarse dentro de ellos el muestreo aleatorio simple o el estratificado para elegir los elementos concretos que formarán parte de la muestra. En ocasiones las dificultades que plantean son demasiado grandes, pues exige un conocimiento detallado de la población (Tamaño geográfico, sexos, edades,...).
- ◆ **Muestreo aleatorio por conglomerados:** Los métodos presentados hasta ahora están pensados para seleccionar directamente los elementos de la población, es decir, que las unidades muestrales son los elementos de la población. En el muestreo por conglomerados la unidad muestral es un grupo de elementos de la población que forman una unidad, a la que llamamos conglomerado. Las unidades hospitalarias, los departamentos universitarios, una caja de determinado producto, etc., son conglomerados naturales. El muestreo por conglomerados consiste en seleccionar aleatoriamente un cierto número de conglomerados (el necesario para alcanzar el tamaño muestral establecido) y en investigar después todos los elementos pertenecientes a los conglomerados elegidos.

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

3.1 Material

Los materiales empleados en esta investigación fueron:

- Espátula
- Matraces aforados Erlenmeyer de 100, 50 y 25 mL
- Probeta 100 y 20 mL
- Micropipetas: transferpette (100 - 1000 μ L)
- Acrodiscos con tamaño de disco de de poro de 0.20 μ m y 47 mm de diámetro, Nylon Varian
- Equipo de filtración rápida Sartorius
- Viales de 20, 5 y 1.5 mL
- Frascos contenedores fase móvil (1000 y 500 mL) Schott Duran

3.2 Muestra

Los edulcorantes artificiales de marca comercial fueron adquiridos en tiendas de autoservicio con las características que se muestran en la Tabla 3.1.

Los edulcorantes naturales fueron adquiridos en Reactivos Analíticos AlyT en botes de 15 kg para la fructosa y 10 kg para la sacarosa.

Las muestras se mantuvieron en sus empaques cerrados a temperatura ambiente. No se realizó ningún tratamiento previo a su análisis.

Tabla 3.1. Características de las muestras

Marca Comercial	Contenido según la etiqueta	Presentación/No. de lote
Equal	Dextrosa, maltodextrosa, <u>aspartame</u> (concentraciones desconocidas)	Caja con 250 sobres de 1g / 608N28
Sweet'n Low	Dextrosa, 3.3%; <u>sacarina</u> , cremor tártaro (tartrato de sodio comercial), silicato de calcio como antiaglomerante (concentraciones desconocidas)	Caja con 227 g de sacarina / 21847
Splenda	Dextrosa, maltodextrina, sucralosa (concentraciones desconocidas)	Caja con 400 sobres de 1 g / 1348N3
Sussly Plus	Dextrosa, <u>aspartame</u> , <u>acesulfame de K</u> (concentración desconocida), dióxido de silicio como antiaglomerante	Caja con 100 sobres de 1 g / J10608
No se encontró*	Acesulfame de K	Frasco de 100g

*Reactivo analítico Fluka analytical, >99.0% HPLC

3.3 Reactivos

Estándar de aspartame (Sigma-Aldrich), estándar de acesulfame de potasio (reactivo *HPLC*, >99.0% Fluka), estándar de sucralosa (reactivo *HPLC*, >98.0%, Sigma-Aldrich), estándar de sacarina de sodio (reactivo *HPLC*, >98.0% Sigma-Aldrich), estándar de sacarosa (Golden-Bell), estándar de fructosa (Sigma-Aldrich), acetonitrilo (reactivo *HPLC*, >99.0%, JT Baker), agua desionizada (agua Lab Industrias Maran S.A. de C.V.), fosfato monobásico de potasio (KH₂PO₄) (99%, Merck), ácido acético (reactivo analítico, JT Baker), ácido fosfórico (reactivo analítico, JT Baker), ácido nítrico (reactivo analítico, JT Baker), metanol (reactivo *HPLC*, >99.0%, JT Baker).

3.4 Equipo

- Balanza de un plato Fissons
- Vórtex (Scientific Industries)
- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución con bomba terciaria Varian, modelo 9012, automuestreador Varian modelo 9100, columna analítica de acero inoxidable

Pickering Laboratories empacada con sílice nucleosil 5 μ , C₁₈; detector UV 9065 Polichrom; software Varian Star Workstation versión 4.5

- Baño ultrasónico Branson, modelo 1210, frecuencia 47 kHz, potencia 80W, modelo 1210R-MT.

3.5 Condiciones cromatográficas

Las condiciones que a continuación se muestran en la Tabla 3.2, fueron utilizadas para los 6 edulcorantes a analizar. La fase móvil está conformada por las soluciones A y B.

Tabla 3.2. Condiciones cromatográficas

Solución (A):	3% acetonitrilo en una solución 0.02 M KH ₂ PO ₄ ajustando el pH a 5 con 10 mL de solución amortiguadora para 1000 mL. Solución amortiguadora respecto del ácido acético
Solución (B):	20% acetonitrilo en una solución 0.02M KH ₂ PO ₄ ajustando el pH a 3 con 8mL de solución amortiguadora para 1000 mL. Solución amortiguadora respecto del ácido fosfórico
Flujo fase móvil	1.0 mL min ⁻¹
Longitud de onda	254 nm
Volumen de inyección	20 μ L

Con base en lo encontrado en la literatura (Lawrence y Charbonneau, 1988), se decidió usar las soluciones A y B como componentes de la fase móvil. Se preparó una disolución de los seis edulcorantes en estudio con una concentración de 100 mg mL⁻¹; para cada composición de la fase móvil.

Las composiciones probadas de dicha mezcla se encuentran en proporciones que van de 100% (A):0% (B) que cambian a 0% (A):100% (B), en un tiempo de 15 minutos de corrida, con objeto de eluir los seis edulcorantes seleccionados. Se escogió este gradiente para que la resolución de los picos fuera la adecuada.

Las inyecciones realizadas en la determinación de la proporción de la fase móvil se analizaron a diferentes longitudes de onda para determinar aquella donde hubiera una mayor absorbancia. Las longitudes de onda probadas fueron: 195, 200, 210, 220, 234, 239, y 254 nm.

3.6 Curvas de calibración

Utilizando los parámetros y gradientes establecidos para realizar las curvas de calibración de los seis edulcorantes se prepararon 10 disoluciones de cada uno de los compuestos de interés de la siguiente manera:

Para los edulcorantes acesulfame de potasio, aspartame y sacarina se prepararon soluciones madre de concentración 100 mg L^{-1} , pesando 0.01 g de edulcorante y aforando a 100 mL, respectivamente. A partir de esta solución madre se tomaron alícuotas con la micropipeta de: 1500, 1350, 1200, 1050, 900, 750, 600, 450, 300 y 150 μL y se aforaron a 1.5 mL.

Para la sucralosa se preparó una solución de concentración $10,000 \text{ mg L}^{-1}$, pesando 1 g de edulcorante y se aforó a 100 mL. A partir de esta solución madre se tomaron alícuotas con la micropipeta de: 1500, 1350, 1200, 1050, 900, 750, 600, 450, 300 y 150 μL y se aforaron a 1.5 mL.

Por último, para la fructosa y la sacarosa se prepararon soluciones de concentración de $100,000 \text{ mg L}^{-1}$, pesando 10 g de edulcorante y se aforaron a 100 mL, respectivamente. A partir de esta solución madre se tomaron alícuotas con la micropipeta de: 1500, 1350, 1200, 1050, 900, 750, 600, 450, 300 y 150 μL y se aforaron a 1.5 mL.

Las 10 disoluciones estándar de cada uno de los edulcorantes: acesulfame de potasio, aspartame y sacarina (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 mg L^{-1}), sucralosa (1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, y 10,000 mg L^{-1}), fructosa y sacarosa (10000, 20000, 30000, 40000, 50000, 60000, 70000, 80000, 90000 y 100000 mg L^{-1}). Se inyectaron

por triplicado y se obtuvieron las curvas de calibración, mismas que se analizaron estadísticamente para corroborar su linealidad calculando el coeficiente de correlación (R^2).

Precisión

La precisión del sistema en el caso específico de este estudio se evaluó mediante la medida del área de los picos correspondientes a 5 inyecciones de una solución estándar de cada edulcorante a una concentración correspondiente a la mitad de la curva de calibración. Con los datos obtenidos se calculó la media (\bar{x}), la desviación estándar (S), así como el coeficiente de variación (CV).

Límites de detección

Se evaluaron los límites de detección para los edulcorantes acesulfame de potasio, aspartame y sacarina preparando disoluciones de concentración (5, 3, 1, 0.5 y 0.1 mg L⁻¹); para sucralosa disoluciones de concentración (500, 300, 100, 50 y 10mg L⁻¹) y para sacarosa y fructosa disoluciones de concentración (5000, 3000, 1000, 500 y 100 mg L⁻¹)

El criterio de evaluación para el límite de detección fue con base a tres veces el ruido que presenta el cromatograma. Esto hace innecesaria la cuantificación del pico correspondiente a cada edulcorante.

3.7 Análisis de edulcorantes comerciales

Para los edulcorantes comerciales Equal, Splenda y Sussly Plus se pesaron los contenidos de los sobres para verificar su masa real. En el caso de Sweet'n Low, que se encuentra en una presentación a granel, se pesaron muestras de 1 g, homogeneizando previamente el contenido de la caja. Cada muestra se aforó a 100 mL con agua desionizada. Estas soluciones se inyectaron por triplicado en el cromatógrafo de líquidos. Para obtener la concentración de cada edulcorante presente en las muestras se obtuvo el promedio del área bajo la curva de las tres inyecciones respectivas a cada muestra. Este dato se interpoló en

las ecuaciones obtenidas de cada curva de calibración. La concentración obtenida se comparó con la reportada en la etiqueta y se calculó la desviación estándar (S).

3.8 Diseño muestral

3.8.1 Objetivo del muestreo

Obtener información estadística sobre las distintas presentaciones de edulcorantes con la finalidad de determinar si existe o no variación en la concentración en mg g^{-1} de cada uno de los edulcorantes en estudio.

3.8.2 Método de muestreo

Se realizó un muestreo estadístico de cada uno de los edulcorantes naturales y artificiales de acuerdo con la presentación comercial con la que se contaba en los Laboratorios 301, 302 y 303. Se tomaron cajas y botes cerrados, sellados y en buenas condiciones. Considerando que la población (N) son los “edulcorantes”, el método de muestreo utilizado es el muestreo aleatorio estratificado sin reemplazo. Los estratos están representados por los diferentes tipos de edulcorante señalados en la Tabla 3.3. Como cada estrato funciona independientemente, se aplicó dentro de ellos el muestreo aleatorio simple.

3.8.3 Variable en estudio

La característica medible de cada estrato fue la concentración del contenido de edulcorante en mg g^{-1} . La medición se hizo por CLAR en las muestras tratadas como se señaló en el punto 3.7.

3.8.4 Cálculo del tamaño de la muestra

Para poder calcular el tamaño de muestra adecuado de los estratos 1, 2 y 3, se realizó una prueba piloto para estimar la varianza. Se tomó $n=10$ fija para los estratos 1, 2 y 3. A su

vez, se escogieron aleatoriamente las muestras de cada caja por medio de una hoja de cálculo en Excel (Anexo 2) (Anónimo, 2010d; González, 2004), de donde se generó la secuencia de valores aleatorios entre 1 y “n”.

Tabla 3.3. Estratos de la población "edulcorantes"

Estrato	Edulcorante
1	Caja de EQUAL con 250 unidades de 1g
2	Caja de SPLENDA con 400 unidades de 1g
3	Caja de SUSSLY PLUS con 100 unidades de 1 g
4	Caja de SWEET'N LOW de 227 g a granel
5	Bote de reactivo analítico AlyT de FRUCTOSA de 10 kg a granel
6	Bote de reactivo analítico AlyT de SACAROSA de 15 kg a granel

Con los resultados obtenidos de la prueba piloto, se calculó la varianza y se utilizó la siguiente fórmula para calcular n (Vivanco, 2005):

$$n = \frac{S^2}{\frac{e^2}{Z_{\alpha/2}^2} + \frac{S^2}{N-1}}$$

donde:

e = Error máximo admisible

$Z_{\alpha/2}$ = Valor tabulado del coeficiente de confianza

N = Tamaño de la población

S^2 = Varianza de la población

considerando un intervalo de confianza del 95% y un error relativo no mayor al 1%. Si la n calculada es mayor a $n=10$ sólo se analizan las muestras restantes.

3.8.4.1 Muestreo a granel

Para los estratos 4, 5 y 6 cuya presentación es a granel, la muestra se seleccionó aleatoriamente realizando un sondeo en la superficie del lote en varios lugares. Este sistema está ilustrado en la Figura 3.1 y consistió en sondear cinco lugares: un sondeo en el centro (A), un sondeo en cada una de las esquinas opuestas (B_1 y B_2) y, el último sondeo, en cada una de las dos esquinas restantes (C_1 y C_2) (Anónimo, 2009). Por lo tanto $n=5$ para los estratos 3, 5 y 6.

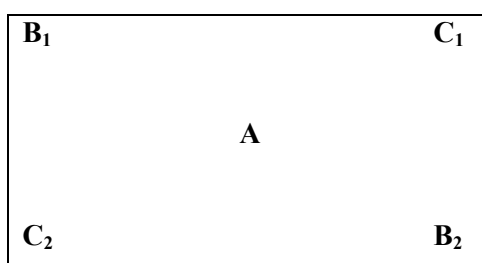


Figura 3.1. Muestreo de productos a granel (Anónimo, 2009)

3.8.5 Análisis descriptivo de los datos

Se realizó un análisis descriptivo de los datos obtenidos. Este análisis proporcionó una idea de la posible distribución de probabilidad que tenían los datos con el parámetro de centralización: media; así como sus parámetros de dispersión; varianza, desviación estándar y coeficiente de variación.

3.9 Análisis de las bebidas suministradas en su dieta a las ratas

La preparación se realizó de acuerdo con las bebidas suministradas en la dieta para modelos animales (ratas) del proyecto de “Efectos biológicos de edulcorantes naturales y artificiales en modelos animales” como se muestra en la Tabla 3.4. Todas las bebidas se inyectaron por triplicado en el cromatógrafo de líquidos

3.10 Análisis estadísticos de los datos

Se empleó un modelo estadístico basado en la t de Student, para poder concluir acerca de la población de edulcorantes con base en las muestras seleccionadas aleatoriamente de la población. En este caso se requiere saber si difieren estadísticamente la concentración en mg g^{-1} reportada y la concentración en mg g^{-1} obtenida del análisis de muestreo estadístico, que se realizó para cada estrato de la población de edulcorantes por CLAR. Este análisis de datos se realizó de forma individual para cada estrato. También se empleó t de Student para comparar la concentración obtenida por CLAR entre las bebidas y el muestreo de los sobres.

Tabla 3.4. Preparación de bebidas

Nombre comercial	Edulcorante que contiene	Bebida	Contenido de la bebida
Reactivo analítico AlyT	Fructosa	1	21 g de fructosa en 300 mL de agua (70000 mg L^{-1})
Reactivo analítico AlyT	Sacarosa	2	30g de sacarosa en 300 mL de agua (100000 mg L^{-1})
SWEET'N LOW	Sacarina	3	1 sobre* en 250 mL de agua (4000 mg L^{-1})
SUSSLY	Mezcla Acesulfame-K y Aspartame	4	1 sobre* en 250 mL de agua (4000 mg L^{-1})
EQUAL	Aspartame	5	1 sobre* en 250 mL de agua (4000 mg L^{-1})
Splenda	Sucralosa	6	1 sobre* en 250mL de agua (4000 mg L^{-1})
Reactivo analítico Fluka	Acesulfame-K	7	a) Solución concentrada: 15 g se aforan a 100 mL; b) Se toman 0.25 mL de la solución concentrada y se agregan 250 mL (150 mg L^{-1})

*El contenido del sobre indicado en la etiqueta es de 1g

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Condiciones cromatográficas (fase móvil, λ_{\max})

Como se mencionó en el capítulo anterior se utilizaron las soluciones A y B (Tabla 3.2) como la fase móvil. En la Tabla 4.1 se muestran los gradientes de elución más adecuados para la detección de los edulcorantes en estudio, así como los tiempos de retención que permiten una detección simultánea de los seis edulcorantes en una corrida de 15 minutos.

En la Tabla 4.1 se presentan las longitudes de onda de máxima absorción seleccionadas. Los cromatogramas obtenidos a partir de estas condiciones se presentan en el Anexo 1.

Tabla 4.1. Gradiente de elución

Clasificación	Edulcorante	% Solución A	% Solución B	t_r (min)	Absorbancia λ_{\max} (nm)
Artificial	Aspartame	20	80	10.43	220
	Sacarina	95	5	12.40	239
	Sucralosa	65	35	5.60	195
	Acesulfame-K	100	0	6.5	254
Natural	Fructosa	70	30	3.77	234
	Sacarosa	45	55	2.36	200

tr=tiempo de retención; λ_{\max} =longitud de onda máxima

Las metodologías que se reportan en la literatura para el análisis de los edulcorantes sucralosa, fructosa y sacarosa, en su mayoría manejan la detección de estos edulcorantes por IR. En esta metodología se planteó la detección por UV ya que algunos autores (Wasik *et al.*, 2007) mencionan que pueden ser detectados a longitudes de 200nm o menores. En

este caso, la fructosa presentó una mayor absorbancia a los 234nm. Las concentraciones a las que fueron detectados los picos de estos edulcorantes, representan concentraciones muy elevadas. Sin embargo, para este estudio no afectaron estos valores ya que las concentraciones a las cuales se elaboraron las bebidas suministradas en la dieta a los modelos animales (ratas), entraron dentro de las concentraciones de las curvas de calibración realizadas.

En el Anexo 1, la Figura A1.1 muestra los picos de los seis edulcorantes (aspartame, sacarina, sucralosa, acesulfame-K, fructosa y sacarosa) detectados simultáneamente al elaborar una mezcla con las soluciones estándar. La metodología descrita en este trabajo es capaz de separar y cuantificar los 6 edulcorantes, aunque en este estudio no se analizaron muestras con más de un edulcorante a excepción de la muestra de Sussly Plus, que contiene una mezcla de aspartame y acesulfame-K. Una ventaja de esta metodología es que pueden analizarse con una sola inyección y, además, considerando que una persona puede ingerir varios edulcorantes con diferentes alimentos podría medirse su contenido en fluidos corporales (sangre, orina, etc.).

4.2 Curvas de calibración

Se realizaron seis curvas de calibración, en donde se evaluaron por triplicado las 10 concentraciones correspondientes a los estándares de los edulcorantes y se integraron respecto al área bajo la curva. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 4.2. En el Anexo 2 se muestran las curvas de calibración para los 6 edulcorantes. Los resultados obtenidos presentan una tendencia lineal entre el área bajo la curva y la concentración del analito. Esto se corrobora con el cálculo de la regresión lineal (R^2) obtenida para cada curva de calibración, que cumple con lo establecido de $R^2 \geq 0.98$.

Precisión

La precisión es la medida de qué tan cercanos están los valores de los datos uno del otro para un número de medidas bajo las mismas condiciones analíticas. En este estudio se

evaluó la repetibilidad y fue determinada por el cálculo de la desviación estándar y el coeficiente de variación de 5 inyecciones consecutivas de la concentración correspondiente a la mitad de la curva de calibración de cada uno de los edulcorantes en estudio, los resultados se muestran en la Tabla 4.3.

Tabla 4.2. Resultados de las curvas de calibración de los 6 edulcorantes en estudio

Edulcorante	m	b	R²
Acesulfame-K	23158.00	-2311.60	0.9994
Aspartame	9080.40	-506.71	0.9997
Sacarina	14769.00	-15359.00	0.9981
Sucralosa	84.74	393.68	0.9991
Fructosa	3.11	3896.20	0.9966
Sacarosa	1.33	-3303.90	0.9912

y= ma+b; y= área bajo la curva; m= pendiente; a=concentración; b= ordenada al origen; R²= coeficiente de correlación

Tabla 4.3. Resultados de precisión para cada edulcorante

Edulcorante	X	S	CV
Acesulfame-K	1162354.00	11384.91	0.98
Aspartame	441599.33	1272.54	0.29
Sacarina	738253.60	5070.01	0.69
Sucralosa	429693.20	3810.10	0.89
Fructosa	160876.80	1304.85	0.81
Sacarosa	62239.20	695.43	1.12

X= promedio área bajo la curva; S= desviación estándar; CV= coeficiente de variación

El desempeño del equipo de cromatografía bajo las condiciones establecidas es bueno, ya que se obtuvo un coeficiente de variación para cada edulcorante menor al 2%. Esto indica que la cromatografía es un buen método para la determinación de los edulcorantes en estudio, aunque no se están considerando las variaciones debidas a la manufactura y el procedimiento de preparación de las muestras en el laboratorio.

Límites de detección

Después de haber inyectado por triplicado las disoluciones para cada edulcorante de concentraciones pre-establecidas, como se indicó en el capítulo anterior, se analizaron los cromatogramas y se determinaron los límites de detección de la concentración a la cual se pudo observar de manera adecuada el pico correspondiente a cada uno de los edulcorantes, sin que se confundiera con el ruido del sistema (Tabla 4.4).

Tabla 4.4. Límite de detección de edulcorantes

Edulcorante	Concentración más baja (mg*L⁻¹)
Acesulfame-K	0.5
Aspartame	1.0
Sacarina	0.1
Sucralosa	300.0
Fructosa	5000.0
Sacarosa	8000.0

4.3 Análisis de edulcorantes comerciales

Con las condiciones pre-establecidas para cada edulcorante, se inyectaron las muestras de los edulcorantes comerciales, para las cuales no se requirió un tratamiento previo, ya que los picos obtenidos no presentan interferencias por otros compuestos, puesto que están disueltas en agua grado cromatográfico, (*HPLC por sus siglas en inglés*) para las

preparadas en los laboratorios y en agua potable para las suministradas a los animales modelo. En la Tabla 4.5 se muestran las concentraciones reportadas en la etiqueta (o en la Página de la empresa fabricante cuando la etiqueta no señalaba ninguna concentración) y las concentraciones obtenidas por CLAR. Como se puede observar, los valores de desviación estándar varían de 0.48 a 1.51, siendo el aspartame de Sussly Plus, donde se presenta la mayor desviación estándar con respecto a lo reportado en la bibliografía, ya que en las cajas de los edulcorantes comerciales no viene reportada esta concentración.

Tabla 4.5. Resultados de la cuantificación de sobres comerciales

Nombre comercial	Edulcorante	Concentración mg g ⁻¹ Reportada	Muestra mg	Área promedio	Concentración mg g ⁻¹ CLAR	S
Equal	Aspartame	36	1.02	672056.00	37.03	0.73
Sweet'n Low	Sacarina	33	1.01	4978534.00	33.63	0.44
Splenda	Sucralosa	11	0.99	84817.00	9.96	0.73
Sussly Plus	Acesulfame-K + aspartame	11	1.04	2384930.33	10.31	0.48
		13		985699.67	10.86	1.51

4.4 Diseño muestral

4.4.1 Prueba piloto

Se tomó n=10 fija para cada estrato y como se indicó en punto 3.8.4 del capítulo anterior, las muestras fueron elegidas de forma aleatoria por medio de una hoja de cálculo en Excel.

Los resultados obtenidos de la prueba piloto para los estratos 1, 2 y 3 se muestran en las Tablas 4.6, 4.7 y 4.8, a partir de los cuales se estimó la varianza de la concentración en mg g⁻¹ para poder calcular el tamaño de muestra adecuado.

Tabla 4.6. Resultados de la prueba piloto para el estrato 1 "Equal"

Edulcorante	concentración promedio mg g⁻¹	S	CV	S²
Aspartame	37.43	0.26	0.69	0.06

S= desviación estándar; CV= coeficiente de variación; S²=varianza

Tabla 4.7. Resultados de la prueba piloto del estrato 2 "Splenda"

Edulcorante	concentración promedio mg g⁻¹	S	CV	S²
Sucralosa	9.99	0.27	2.73	0.07

S= desviación estándar; CV= coeficiente de variación; S²=varianza

Tabla 4.8. Resultados de la prueba piloto del estrato 3 "Sussly Plus"

Edulcorante	concentración promedio mg g⁻¹	S	CV	S²
Aspartame	10.86	0.13	1.21	0.02
Acesulfame -K	10.09	0.08	0.78	0.006

S= desviación estándar; CV= coeficiente de variación; S²=varianza

4.4.2 Cálculo del tamaño de la muestra

A partir de la prueba piloto se calculó "n" para los estratos 1, 2 y 3, como se indicó en el punto 3.8.4. Se obtuvieron los resultados señalados en la Tabla 4.9. Los valores obtenidos se redondearon para tomar muestras enteras. Y, como se mencionó anteriormente, se incluyeron las muestras utilizadas en la prueba piloto. Las muestras restantes también fueron elegidas de forma aleatoria.

Tabla 4.9. Tamaño de la muestra "n"

Estrato	N
1	12.07
2	14.30
3	3.25-2.56

De acuerdo con la n calculada, se realizó el análisis de las muestras restantes. Para el estrato 1 fueron 2 muestras (más las 10 realizadas en la prueba piloto), para el estrato 2 fueron 4 muestras (más las 10 realizadas en la prueba piloto) y, en el caso del estrato 3, la n calculada fue menor al número de muestras fijado para la prueba piloto (fueron 3). Se muestran los resultados obtenidos de las 10 muestras tomadas.

En el caso de los estratos 4, 5 y 6 se tomó $n=5$ fijo, ya que las muestras vienen en presentación a granel y se supone son homogéneas.

4.4.3 Análisis descriptivo de los datos

Los resultados obtenidos del muestreo para cada estrato se muestran de la Tabla 4.10 a la Tabla 4.15. Los parámetros estadísticos que caracterizaron este estudio fueron la media, la desviación estándar o, preferiblemente, el coeficiente de variación (desviación estándar relativa). Este parámetro permitió evaluar la incertidumbre en la estimación de la media, es decir, el error aleatorio que se correspondió con la dispersión de los datos alrededor de la media.

El coeficiente de variación de la concentración obtenida en mg g^{-1} fueron, para los estratos 1, 2, 3, 4, 5 y 6, los valores de 0.65, 1.62, 1.21 y 0.78, 0.62, 0.74 y 1.02%, respectivamente. Estos valores, al ser menores al 5%, indican que la distribución de los mismos no está muy dispersa (hay poca dispersión de los datos entre sí).

Tabla 4.10. Resultado del muestreo al estrato 1 “Equal”

Edulcorante	Aspartame											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Sobre												
Área 1	676604	674523	682722	673918	677864	686155	672049	682495	681363	680234	682049	681567
Área 2	678278	673298	684336	670625	677497	686850	674017	681673	682219	682674	684017	682016
Área 3	679402	673417	684783	674977	679931	685987	673535	683925	680529	681452	683535	681997
X	678094.67	673746.00	683947.00	673173.33	678430.67	686330.67	673200.33	682697.67	681370.33	681453.33	683200.33	681860.00
S	1407.98	675.53	1084.17	2269.55	1312.22	457.53	1025.80	1139.60	845.02	1220.00	1025.80	253.92
CV	0.21	0.10	0.16	0.34	0.19	0.07	0.15	0.17	0.12	0.18	0.15	0.04
Masa de cada sobre (g)	1.027	1.020	1.020	1.014	1.022	1.028	1.031	1.022	1.028	1.022	1.020	1.013
Conc., mg L ⁻¹	74.73	74.25	75.38	74.19	74.77	75.64	74.19	75.24	75.09	75.10	75.28	75.14
Conc., mg g ⁻¹	37.37	37.13	37.69	37.10	37.38	37.82	37.10	37.62	37.55	37.55	37.64	37.57
Cantidad por sobre (mg)	38.38	37.87	38.44	37.61	38.21	38.88	38.25	38.45	38.60	38.38	38.40	38.06

Concentración promedio, mg g ⁻¹	37.46
S	0.24
CV	0.65
S ²	0.06

X= promedio área bajo la curva; S= desviación estándar; CV= coeficiente de variación; S²=varianza

Tabla 4.11. Resultado del muestreo al estrato 2 “Splenda”

Edulcorante	Sucralosa													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Sobre														
Area 1	83346	86022	85590	84904	83459	85761	81505	84434	86572	86408	85374	83700	84920	85146
Area 2	83900	86146	85130	84545	83960	85577	81478	84220	86580	86434	85447	84201	84736	85119
Area 3	83178	86081	85901	84954	83564	85906	81752	84700	86963	86573	85350	83805	85065	85393
X	83474.67	86083.00	85540.33	84801.00	83661.00	85748.00	81578.33	84451.33	86705.00	86471.67	85390.33	83902.00	84907.00	85219.33
S	377.81	62.02	387.89	223.11	264.21	164.88	151.00	240.47	223.47	88.71	50.52	264.21	164.88	151.00
CV	0.45	0.07	0.45	0.26	0.32	0.19	0.19	0.28	0.26	0.10	0.06	0.31	0.19	0.18
Masa de cada sobre (g)	1.017	0.996	0.982	0.991	1.001	0.993	1.004	1.005	0.998	0.999	0.983	1.030	0.994	1.020
Conc., mg L ⁻¹	980.39	1011.17	1004.76	996.04	982.59	1007.21	958.01	991.91	1018.51	1015.75	1002.99	985.43	997.29	1000.98
Conc., mg g ⁻¹	9.80	10.11	10.05	9.96	9.83	10.07	9.58	9.92	10.19	10.16	10.03	9.85	9.97	10.01
Cantidad por sobre (mg)	9.97	10.07	9.87	9.87	9.84	10.00	9.62	9.97	10.16	10.15	9.86	10.15	9.91	10.21

Concentración promedio mg g ⁻¹	9.97
S	0.16
CV	1.62
S ²	0.04

X= promedio área bajo la curva; S= desviación estándar; CV= coeficiente de variación; S²=varianza

Tabla 4.12. Resultados del muestreo al estrato 3 "Sussly Plus"

Edulcorante	Aspartame									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Sobre										
Área 1	990977	983564	989788	981653	993407	975106	979902	953760	989013	985431
Área 2	996234	984831	984338	987985	995789	975138	986294	949924	988015	983420
Área 3	994671	982471	982973	984940	994981	974160	986913	953916	980145	984189
X	993960.67	983622.00	985699.67	984859.33	994725.67	974801.33	984369.67	952533.33	985724.33	984346.67
S	2699.53	1181.07	3605.78	3166.77	1211.35	555.64	3881.47	2261.09	4857.54	1014.73
CV	0.27	0.12	0.37	0.32	0.12	0.06	0.39	0.24	0.49	0.10
Masa de cada sobre (g)	1.18	1.02	1.09	1.01	1.02	1.16	1.04	1.03	1.05	1.17
Conc., mg L ⁻¹	110	108	109	109	110	107	108	105	109	108
Conc., mg g ⁻¹	10.95	10.84	10.86	10.85	10.96	10.74	10.85	10.50	10.86	10.85
Cantidad por sobre (mg)	12.95	11.04	11.81	10.96	11.20	12.45	11.26	10.76	11.39	12.69

concentración promedio mg g ⁻¹	10.83
S	0.13
CV	1.21
S ²	0.02

X= promedio área bajo la curva; S= desviación estándar; CV= coeficiente de variación; S²=varianza

Tabla 4.12. Resultados del muestreo al estrato 3 "Sussly Plus" (continuación)

Edulcorante	Acesulfame de potasio									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Sobre										
Área 1	2335014	2349909	2307494	2339721	2353672	2345633	2311772	2346652	2311817	2334937
Área 2	2337232	2349132	2306101	2331677	2359328	2345431	2305234	2345762	2319889	2339839
Área 3	2331094	2357440	2309953	2331968	2356192	2344319	2298776	2348759	2313831	2330015
X	2334446.67	2352160.33	2307849.33	2334455.33	2356397.33	2345127.67	2305260.67	2347057.67	2315179.00	2334930.33
S	3108.08	4588.80	1950.43	4562.52	2833.59	707.57	6498.04	1539.13	4201.44	4912.00
CV	0.13	0.20	0.08	0.20	0.12	0.03	0.28	0.07	0.18	0.21
Masa de cada sobre (g)	1.18	1.02	1.09	1.01	1.02	1.16	1.04	1.03	1.05	1.17
Conc., mg L ⁻¹	100.9	101.7	99.8	100.9	101.9	101.4	99.6	101.4	100.1	100.9
Conc., mg g ⁻¹	10.09	10.17	9.98	10.09	10.19	10.14	9.96	10.14	10.01	10.09
Cantidad por sobre (mg)	11.93	10.36	10.84	10.19	10.41	11.75	10.34	10.40	10.50	11.81

concentración promedio mg g ⁻¹	10.09
S	0.08
CV	0.78
S ²	0.006

X= promedio área bajo la curva; S= desviación estándar; CV= coeficiente de variación; S²=varianza

Tabla 4.13. Resultados del muestreo al estrato 4 "Sweet'n Low"

Edulcorante	Sacarina				
	1	2	3	4	5
Sobre					
Área 1	4883572	4949714	4879602	4894924	4880539
Área 2	4884733	4950804	4860717	4897759	4880744
Área 3	4881289	4951007	4878639	4886198	4898305
X	4883198	4950508.33	4872986	4892960.33	4886529.33
S	1752.20	695.36	10636.17	6025.46	10198.54
CV	0.04	0.01	0.22	0.12	0.21
Masa de la muestra (g)	1.006	1.004	1.003	1.105	1.015
Conc., mg L ⁻¹	331.68	336.24	330.99	332.34	331.90
Conc., mg g ⁻¹	33.17	33.62	33.10	33.23	33.19
Cantidad por sobre (mg)	33.37	33.76	33.20	36.72	33.69

concentración promedio mg g ⁻¹	33.26
S	0.21
CV	0.62
S ²	0.04

X= promedio área bajo la curva; S= desviación estándar; CV= coeficiente de variación; S²=varianza

Tabla 4.144. Resultados del muestreo al estrato 5 "AlyT"

Edulcorante	Fructosa				
	1	2	3	4	5
Sobre	158630	160535	159987	160236	159781
Área 1	158184	160863	159630	160478	159839
Área 2	159136	160437	159898	160011	159792
Área 3	158650.00	160611.67	159838.33	160241.67	159804.00
X	476.32	223.11	185.83	233.55	30.81
S	0.30	0.14	0.12	0.15	0.02
CV	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Masa de la muestra (g)	49715.3	50345.5	50097.1	50226.6	50086.0
Conc., mg L ⁻¹	994.31	1006.91	1001.94	1004.53	1001.72
Conc., mg g ⁻¹	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Cantidad por sobre (mg)	158630	160535	159987	160236	159781

concentración promedio mg g ⁻¹	1001.88
S	4.74
CV	0.47
S ²	22.43

X= promedio área bajo la curva; S= desviación estándar; CV= coeficiente de variación; S²=varianza

Tabla 4.155. Resultados del muestreo al estrato 6 "AlyT"

Edulcorante	Sacarosa				
	1	2	3	4	5
Sobre					
Área 1	64085	63941	65276	63982	64174
Área 2	63908	62664	65399	63082	64297
Área 3	64293	63511	64946	64182	63844
X	64095.33	63372.00	65207.00	63748.67	64105.00
S	192.71	649.75	234.25	585.95	234.25
CV	0.30	1.03	0.36	0.92	0.37
Masa de la muestra (g)	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Conc., mg L ⁻¹	50501.45	49959.46	51334.41	50241.70	50508.69
Conc., mg g ⁻¹	1010.03	999.19	1026.69	1004.83	1010.17
Cantidad por muestra (mg)	0.51	0.50	0.51	0.50	0.51

Concentración promedio mg g ⁻¹	1010.18
S	10.27
CV	1.02
S ²	105.48

X= promedio área bajo la curva; S= desviación estándar; CV= coeficiente de variación; S²=varianza

Además de los parámetros estadísticos media, desviación estándar o varianza que describen la tendencia central y la variabilidad de las muestras analizadas, respectivamente, se necesitó realizar un análisis de varianza. Para ello, los datos fueron sometidos a una prueba *t-student* como se mencionó en el capítulo anterior.

Se supone que el análisis de la concentración para cada edulcorante tiene una distribución normal. Sin embargo, se desconocen tanto la media como la desviación estándar o la varianza de la concentración para cada edulcorante, ya que no se tienen antecedentes de algún estudio similar. Por ello, se hizo una prueba *t-student* para una sola muestra con varianza desconocida.

Con el muestreo realizado se obtuvo la media muestral y la desviación estándar muestral de los datos de concentración en mg g⁻¹ para los 6 estratos de los edulcorantes en estudio.

Además de estos parámetros, se requiere el planteamiento de la hipótesis nula y la hipótesis alternativa, para poder calcular el estadístico de prueba t_0 . En la Tabla 4.16 se muestran los datos.

Tabla 4.166. Resultados de la prueba t

Estrato	Edulcorante	X	S	Hipótesis	α	g.l.	t_0	$t_{(0.025, g.l.)}$
1	Aspartame	37.4597	0.2452	$H_0 : \mu = 36$ $H_1 : \mu \neq 36$	0.05	11	20.62	2.2010
2	Sucralosa	9.9664	0.1616	$H_0 : \mu = 11$ $H_1 : \mu \neq 11$	0.05	13	-23.93	2.1604
3	Aspartame	10.8252	0.1309	$H_0 : \mu = 13$ $H_1 : \mu \neq 13$	0.05	9	-52.52	2.2622
	Acesulfame-K	10.0855	0.0787	$H_0 : \mu = 11$ $H_1 : \mu \neq 11$	0.05	9	-36.77	2.2622
4	Sacarina	33.2629	0.2075	$H_0 : \mu = 33$ $H_1 : \mu \neq 33$	0.05	4	2.83	2.7765
5	Fructosa	1001.88	4.7400	$H_0 : \mu = 1000$ $H_1 : \mu \neq 1000$	0.05	4	0.89	2.7765
6	Sacarosa	1010.18	10.2700	$H_0 : \mu = 1000$ $H_1 : \mu \neq 1000$	0.05	4	2.22	2.7765

X= media de la concentración mg g^{-1} ; S= desviación estándar de la concentración mg g^{-1} ; H_0 = hipótesis nula; H_1 = hipótesis alternativa; μ =media reportada de la concentración mg g^{-1} ; t_0 = valor t calculado; t = valor t de tablas; α = nivel de significancia; g.l.= grados de libertad = N-1, donde N= población

De acuerdo con los resultados obtenidos de la prueba t se observa que, en los estratos 1, 2, 3 y 4, el valor calculado t_0 queda fuera de los límites de $(t_{0.025, g.l.}, -t_{0.025, g.l.})$. Por lo tanto, la hipótesis nula se rechaza y se concluye que las concentraciones obtenidas por CLAR difieren de las concentraciones reportadas para estos edulcorantes por los fabricantes, con un $\alpha = 0.05$.

Para los estratos 5 y 6, el valor calculado t_0 queda dentro de los límites de $(t_{0.025, g.l.}, -t_{0.025, g.l.})$. Por lo tanto, la hipótesis nula se acepta y se concluye que las concentraciones obtenidas por CLAR no difieren de las concentraciones reportadas para estos edulcorantes con un $\alpha = 0.05$.

El valor P calculado ($P < 0.05$) para los estratos 1, 2, 3 y 4 indica que se sigue rechazando H_0 , indicando que sí existe diferencia significativa entre la concentración reportada y la obtenida por CLAR. Para los estratos 5 y 6 ($P > 0.05$) y, por lo tanto, la H_0 se acepta, concluyendo que las concentraciones obtenidas por CLAR no difieren de las concentraciones reportadas por los fabricantes para estos edulcorantes.

4.5 Análisis de las bebidas que se suministran a las ratas en su dieta

En la Tabla 4.17 se muestran los resultados obtenidos al inyectar las muestras de las bebidas que son suministradas en la dieta a los modelos animales (ratas) en su dieta.

Tabla 4.177. Resultado análisis de bebidas

Bebida	Edulcorante	Área bajo la curva promedio	Concentración mg L⁻¹	Concentración mg g⁻¹
1	Fructosa	234799.33	74178.60	1059.69
2	Sacarosa	138095.00	105948.52	1059.49
3	Sacarina	2027208.33	137.83	34.46
4	Acesulfame-K	925540.67	41.19	10.30
	Aspartame	1381463.00	40.12	10.03
5	Aspartame	373597.67	140.73	35.18
6	Sucralosa	36073.33	421.03	10.53
7	Acesulfame-K	3498075.00	151.20	1008.03

Las concentraciones obtenidas para cada edulcorante y las concentraciones promedio del muestreo estadístico de los edulcorantes con los que son elaboradas las bebidas, presentan una desviación estándar de 0.15 a 40.38. Estos resultados se observan en la Tabla 4.18, con excepción de la bebida 7, ya que el reactivo con el que se preparó no fue incluido en el muestreo estadístico.

De los resultados de la prueba t de student, el valor P calculado ($P < 0.05$) para cada concentración de las 7 bebidas con respecto a la concentración reportada por los fabricantes para cada edulcorante de marca comercial, por lo que igual que en el caso anterior sí existe diferencia significativa.

Tabla 4.18. Comparación entre las concentraciones encontradas

Bebida	Edulcorante	Concentración mg g⁻¹ Bebidas	Concentración mg g⁻¹ muestreo	S
1	Fructosa	1059.69	1001.88	40.88
2	Sacarosa	1059.49	1010.18	34.87
3	Sacarina	34.46	33.26	0.85
4	Acesulfame-K	10.30	10.09	0.15
	Aspartame	10.03	10.83	0.57
5	Aspartame	35.18	37.46	1.61
6	Sucralosa	10.53	9.97	0.40

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

De acuerdo con la hipótesis establecida sobre la factibilidad de usar la cromatografía de líquidos para detectar y cuantificar los edulcorantes en estudio sin que haya diferencia significativas ($P < 0.05$) se puede concluir de esta investigación que se cumplió. Considerando los objetivos general y particulares se concluye lo siguiente:

- Se establecieron las condiciones cromatográficas de trabajo (fase móvil, flujo y longitud de onda)
- El diseño experimental planteado en esta metodología permitió detectar y cuantificar a los edulcorantes naturales y artificiales de manera precisa, tanto en forma individual como simultánea, lo cual será útil para estudios posteriores, en los que se requiera del análisis de muestras que contengan más de un edulcorante.
- Se desarrollaron 6 curvas de calibración con alta precisión que permiten la detección individual de los edulcorantes en estudio por cromatografía de líquidos de alta resolución, en concentraciones de 0 a 100 mg L⁻¹ para aspartame, acesulfame-K y sacarina, de 1000 a 10,000 mg L⁻¹ para sucralosa y de 10,000 a 100,000 mg L⁻¹ para fructosa y sacarosa.
- Por medio de las condiciones establecidas se pudieron analizar los edulcorantes de marca comercial, realizando el muestreo estadístico de estos ya fuera en sobres individuales o a granel.
- A partir del muestreo estadístico se llegó a la conclusión de que la concentración de los edulcorantes entre cada muestra del mismo tipo presentan coeficientes de

variación en el caso de aspartame (Equal) de 0.65%, para sucralosa (Splenda) de 1.62%, para la mezcla aspartame y acesulfame de potasio (Sussly Plus) de 1.21% y 0.78%, respectivamente, para sacarina (Sweet'n Low) de 0.62%, para fructosa (reactivo AlyT) de 0.74% y para sacarosa (reactivo AlyT) de 1.02%, siendo el C.V., menor al 5% e indicando que la distribución de los mismos no se encuentra muy dispersa entre sí.

- De acuerdo con la *t-student* a un nivel de significancia de 0.05, la concentración en mg g^{-1} obtenida con la técnica de CLAR sí es estadísticamente diferente con respecto a la concentración reportada para los edulcorantes comerciales Equal (aspartame), Splenda (sucralosa), Sussly Plus (aspartame+acesulfame de potasio) y Sweet'n Low (sacarina), para estas determinaciones ($P < 0.05$), pero no difiere para los edulcorantes sacarosa y fructosa del reactivo AlyT ($P > 0.05$). Sin embargo, cabe destacar que algunas de las concentraciones reportadas no están indicadas en las cajas (etiquetado poco confiable para el consumidor), sino que fueron tomadas de las Páginas electrónicas de las empresas fabricantes. Habría que investigar a futuro si la normativa no exige que en la etiqueta de la caja venga indicada esta concentración ya que existen límites máximos permitidos para su consumo diario.
- Por medio de este diseño experimental por CLAR se pudo determinar la concentración de edulcorante en cada una de las bebidas que son suministradas a las ratas en su dieta. Con un valor de $P < 0.05$ el valor de la concentración obtenida por CLAR para las 7 bebidas, difiere significativamente de la concentración reportada por los fabricantes de los edulcorantes comerciales. Consecuentemente, para el cálculo de la ingesta diaria de las ratas de laboratorio se tomarán las concentraciones medidas en esta investigación.

5.2 Recomendaciones

De acuerdo con los resultados obtenidos en esta investigación sería pertinente emplear esta metodología con matrices de alimentos que contengan más de un edulcorante con objeto de corroborar su bondad analítica.

Además de alimentos debe considerarse esta técnica para el análisis de fluidos corporales para el análisis de edulcorantes en ellos.

Existen nuevos edulcorantes que están saliendo al mercado, por lo que se podría probar si con esta técnica se pueden analizar y cuantificar.

Sería importante disminuir el límite de detección de los edulcorantes naturales, para no ocasionar daños a la columna o al equipo debido a una saturación, por lo que se podría acoplar con otro tipo de detector, con el cual los azúcares sean detectados a concentraciones menores.

ANEXO 1

CROMATOGRAMAS DE EDULCORANTES NATURALES Y ARTIFICIALES

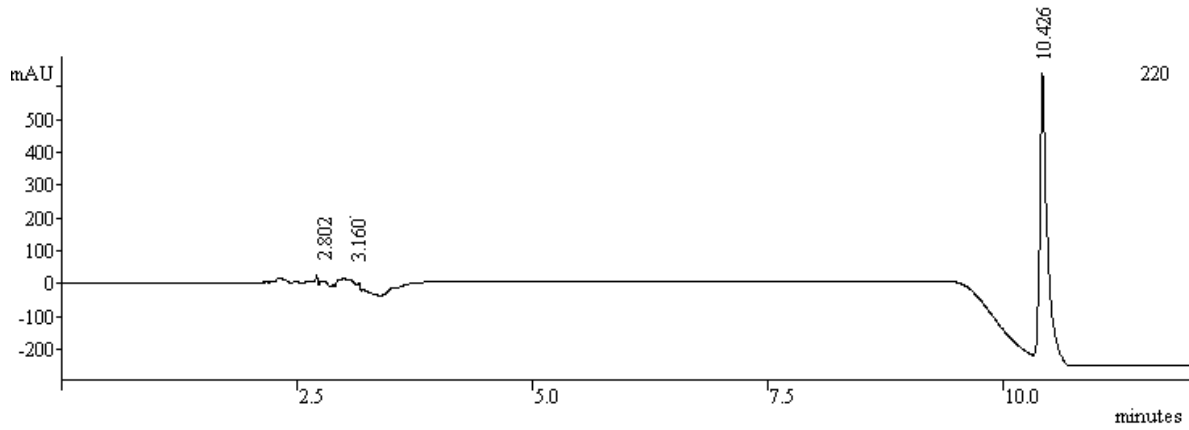


Figura A1.1 Cromatograma de aspartame

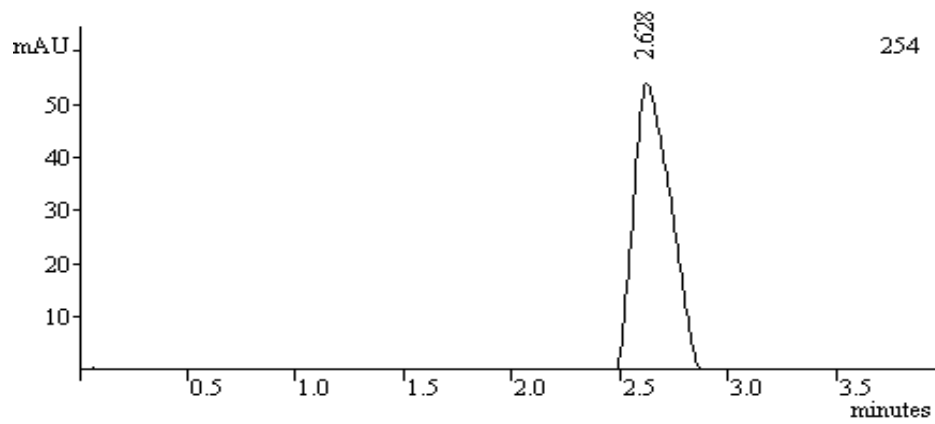


Figura A1.2 Cromatograma de acesulfame-K

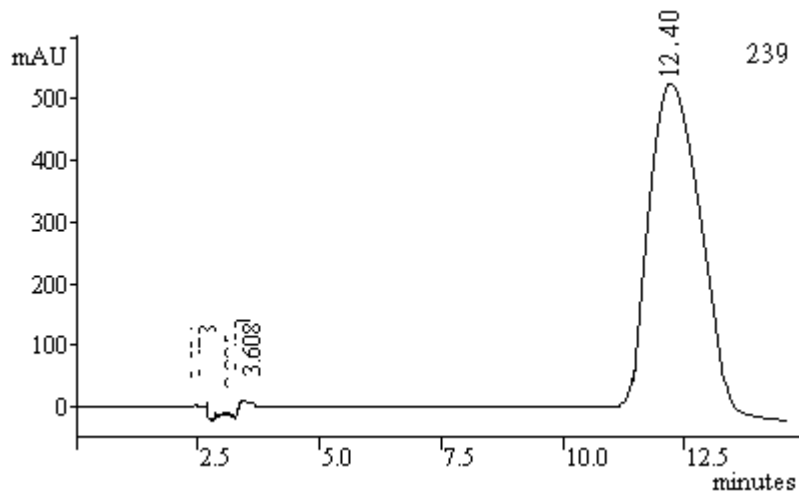


Figura A1.3 Cromatograma de sacarina

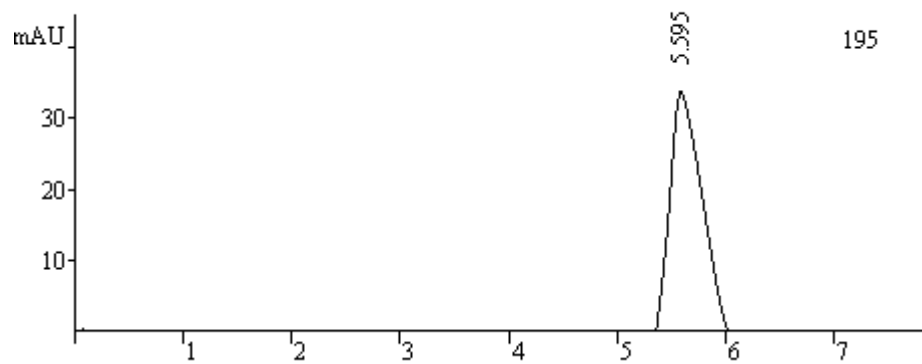


Figura A1.4 Cromatograma de sucralosa

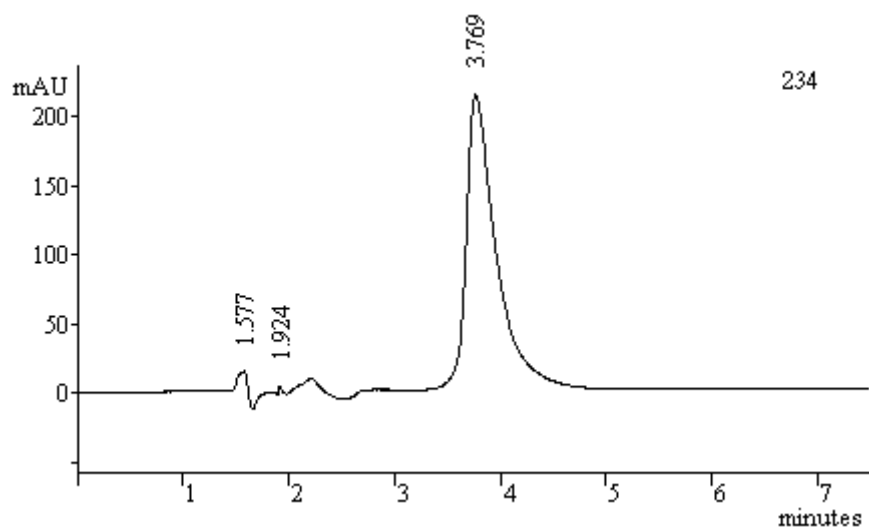


Figura A1.5 Cromatograma de fructosa

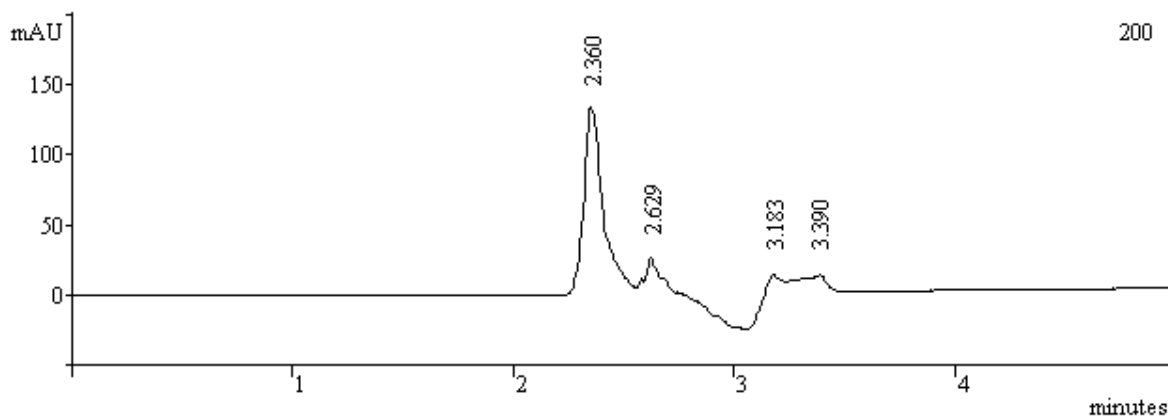


Figura A1.6 Cromatograma de sacarosa

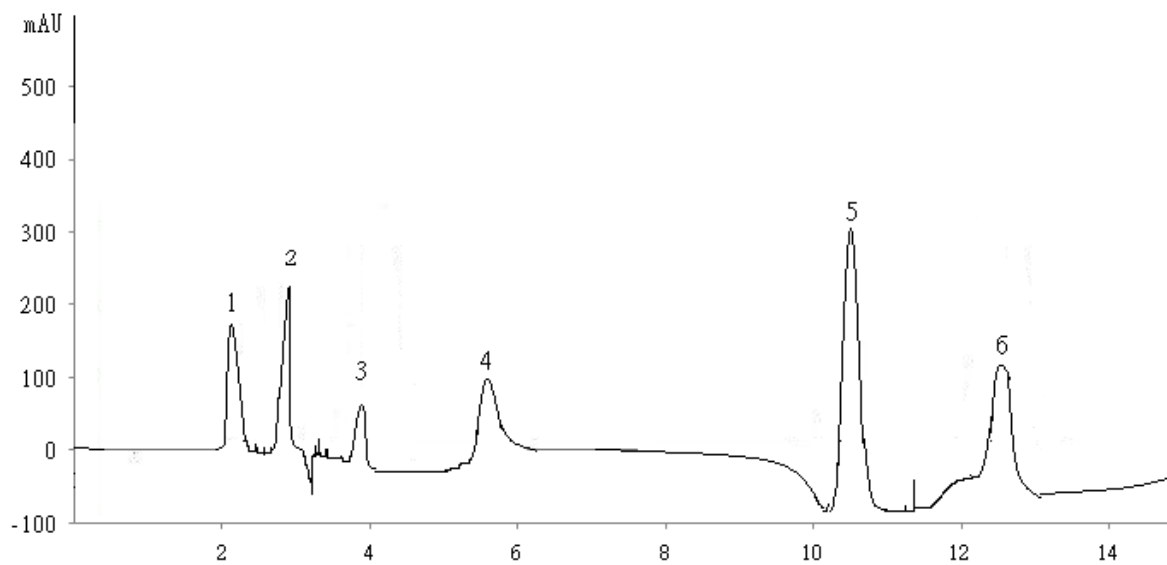


Figura A1.7 Cromatograma de los 6 edulcorantes (1. sacarosa; 2. acesulfame-K; 3. fructosa; 4. sucralosa; 5. aspartame; 6. sacarina) detectados simultáneamente:

ANEXO 2

CURVAS DE CALIBRACIÓN

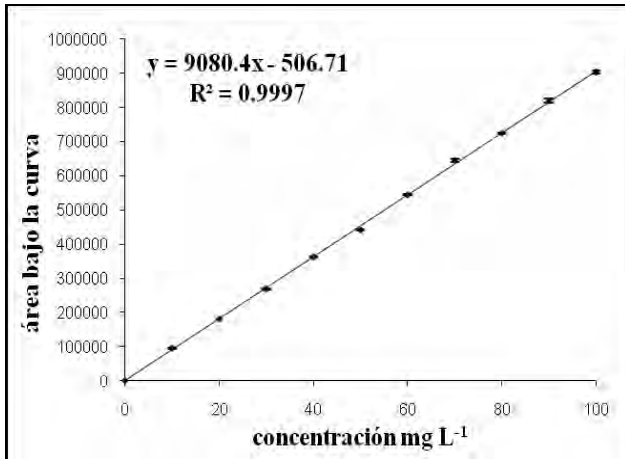


Figura A2.1. Curva de calibración de aspartame

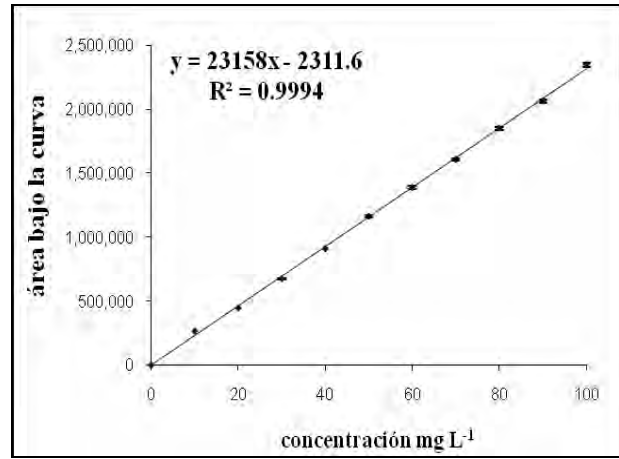


Figura A2.2. Curva de calibración de acesultame-K

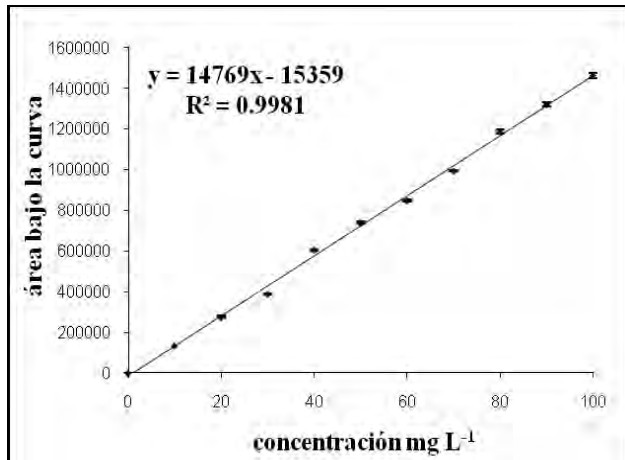


Figura A2.3. Curva de calibración de sacarina

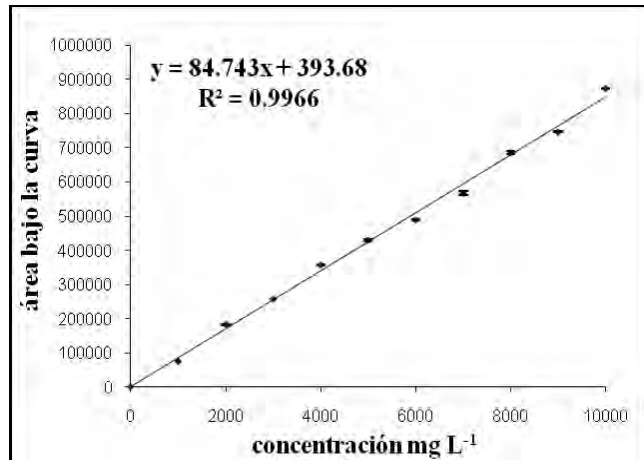


Figura A2.4. Curva de calibración de sucralosa

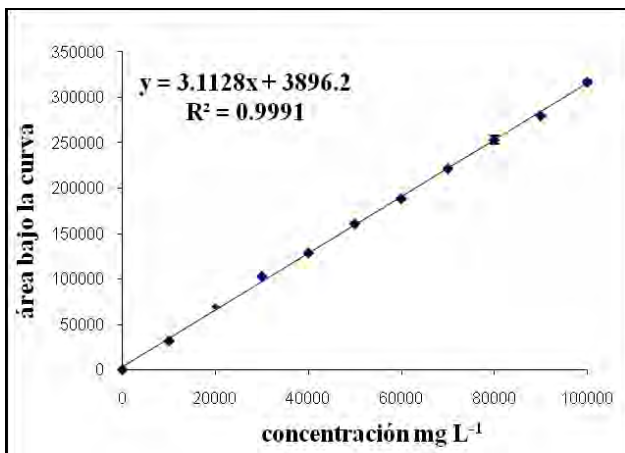


Figura A2.5. Curva de calibración de fructosa

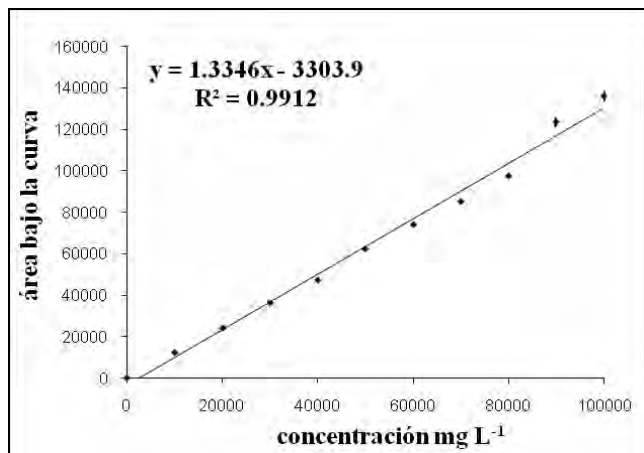


Figura A2.6. Curva de calibración de sacarosa

ANEXO 3

HOJA DE EXCEL PARA MUESTREO ALEATORIO SIMPLE

Para este ejemplo, la base de datos que se utilizó en formato Excel fue el listado de los 100 sobres de la caja de SUSSLY PLUS.

Se anotan los números con los que se identificaron los sobres del 1 al 100. Estos datos aparecen en el rango C1:C100

En este ejemplo $n=10$ para la prueba piloto. Para seleccionar los 10 sobres se usa la función de *Análisis de datos disponible en Excel*, esta función se localiza en el menú *Herramientas* y *Análisis de datos*, y dentro de ella el procedimiento *Muestra*.

Se debe observar atentamente el rango de celdas seleccionado y mostrado en la Figura A3.1.

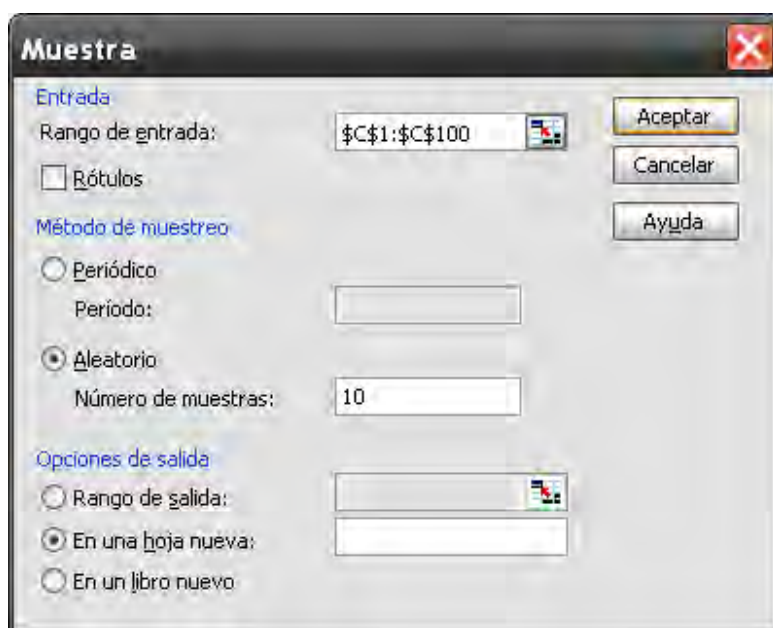


Figura A3.1. Cuadro de diálogo "Muestra" con el rango de datos a elegir y el número de individuos a seleccionar

En una nueva hoja de Excel se podrán ver los números de identificación de los sobres que habrá que elegir para cuantificar la concentración de edulcorante.

Luego de algunos arreglos visuales se tendría en pantalla el listado de sobres a considerar en la muestra definitiva como se muestra en la Figura A3.2. Se debe recordar que este listado cambia cada vez que se resuelve el ejercicio. Esto se debe a que en cada ocasión se seleccionan individuos de la población de manera aleatoria.

	A	B	C	D	E
1					
2		No. de sobre			
3		4			
4		80			
5		2			
6		42			
7		12			
8		59			
9		48			
10		16			
11		3			
12		59			

Figura A3.2. Listado de los sobres de SUSSLY PLUS a seleccionar en la muestra definitiva

Bibliografía

- Alcalá-Silva, E. 2007. Desarrollo y validación de un método para la determinación de cafeína en alimentos mediante el uso de cromatografía de líquidos de alta resolución CLAR, Tesis profesional, UNAM, Facultad de Química, México D.F.
- Anónimo. 2009. Búsqueda en internet. Manual de Procedimiento UPSA (Muestreo para alimentos a granel), Dirección electrónica consultada en diciembre 2010: <http://200.46.196.147/aupsa/ManualProced/09%20MPDNAC-004-09%20MP%20de%20Muestreo%20de%20Productos%20a%20Granel.pdf>
- Anónimo 2010a. Búsqueda en Internet: Cultivo e industrialización de la caña de azúcar en México. Centro de Estudios para la Transición Democrática, A.C. Dirección electrónica consultada en enero de 2010: http://www.cetrade.org/v2/revista_transicion/1999/revista_25_los_ingenios/cultivo
- Anónimo 2010b. Búsqueda en Internet: Sucralose. Dirección electrónica consultada en enero de 2010: <http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-additives/specs/Monograph1/Additive-444.pdf>
- Anónimo 2010c. Búsqueda en Internet. Dirección electrónica (consultada en septiembre de 2009) <http://www.estadistica.mat.uson.mx/Material/elmuestreo.pdf>
- Anónimo 2010d. Búsqueda en Internet: Muestras estadísticas. Dirección electrónica (Consultada en enero de 2010): <http://platea.pntic.mec.es/jcarias/ccss2/02excel/11muestrasexcel.htm>
- Armeta, S., Garrigues, S., Guardia, M. 2004. FTIR *Determination of Aspartame and Acesulfame-K in Tabletop Sweeteners*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 4(52):7798-7803.
- Baduí, S. 1999. Química de los Alimentos. Addison Wesley de México, 3ª edición. Pp. 483-484. México D.F. México.
- Bautista, J. M., Barbosa, C. J. E., Gamiño, S. Z., Alanís, M. G. 2005. Alimentos bajos en energía ¿Qué es lo que debemos saber de ellos? Acta Universitaria. 15(3):25-33. Dirección electrónica (consultada en febrero de 2010) <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/416/41615304.pdf>

- Belitz, W., Grosh, B. 1997. Química de alimentos. Acribia S.A. 2ª ed. Pp. 462-466. Zaragoza, España.
- Blanco, J. 2002. Búsqueda en Internet: Guía para la práctica consumir azúcar con moderación. Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos. Anexo 1. Revista Cubana. 16(2):142-145. Dirección electrónica (consultada en febrero de 2010) http://bvs.sld.cu/revistas/ali/vol16_2_02/ali08202.pdf
- Bray, G., Nielsen, S. J., Popkin, B. M. 2004. Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemics of obesity. *Es. J. Clin. Nutr.* 79:537-573.
- Bubnik, Z., Henke, S., Kadlec, P., Hinková, A., Pour, V. 2006. Database of the properties of sucrose, sucrose solutions, and food. *Journal of Food Engineering*, 77(3):399-405.
- Cedillo-Ramírez, V. 2002. Validación de técnicas analíticas en la cromatografía de líquidos. Tesis profesional. UNAM, Facultad de Química, México D.F
- Chen, Q.C., Wang, J. 2001. Simultaneous determination of artificial sweeteners, preservatives, caffeine, theobromine, and theophylline in food and pharmaceutical preparations by ion chromatography. *J. Chromatography A*. 973:57-64.
- Fennema, O. R. 1993. Química de los alimentos. Editorial Acribia, 2ª edición, pp. 82-101, 663-665, 737, 742. Zaragoza, España.
- Gaby, A. R. 2005. Adverse effects of dietary fructose. *Alternative Medicine Rev.* 10(4):294-306.
- García-Garibay, M., Quintero, R. R., López-Munguía-Canales, A. 2004. Biotecnología alimentaria. Ed. Limusa, 5ª reimpresión. México D.F. México.
- González-Filomeno, E. 2007. Efecto biológico de la adición de fructosa, sacarosa, sucralosa o aspartame al agua de beber mediante su suministro a ratas de laboratorio. Tesis profesional. UNAM, Facultad de Química. México D.F.
- González, R. B. 2004. Búsqueda en Internet: Ejercicio sobre Muestreo Simple Aleatorio usando Excel XP Guatemala, Centro América (Consultado en febrero de 2010). Dirección electrónica <http://byrong.iespana.es/public/msa/index.htm>
- Grenby, T. H. 1989. Progress in Sweeteners. Elsevier Science Publishers Ltd, pp. 394. London and New York. Reino Unido y EEUU.

- Jiménez, H.M.E. 2008. Estudio bibliográfico de los edulcorantes de alta potencia y su metabolismo. Tesis profesional. UNAM. Facultad de Química. México D.F.
- Jürgens, H. H. W., Castañeda, T.R., Schürmann, A., Koebnick, C., Dombrowski, F., Otto, B., Nawrocki, A. R., Scherer, P. E., Spranger, J., Ristow, M., Joss, G. H., Havel, P.J., Tschöp, M.H. 2005. Consuming fructose-sweetened beverages increases body adiposity in mice. *Obes. Res.* 13(7):1146-1156.
- Lawrence, J. F, Charbonneau, C. F. 1988. Determination of seven artificial sweeteners in diet food preparations by reverse-phase liquid chromatography with absorbance detection. *Journal - Association of Official Analytical Chemists*;71(5):934-937.
- López-Munguía, A. 2009. Búsqueda en Internet: Azúcar, hechos y mitos. Instituto de Biotecnología de la UNAM. Revista ¿Cómo ves? Pp. 10-15. Dirección electrónica (Consultada en diciembre de 2009) http://www.comoves.unam.mx/archivo/salud/113_azucar.html
- Mace, O.J., Affleck, J., Patel, N., Kellett, G.L. 2007. Sweet taste receptors in rat small intestine stimulate glucose absorption through apical GLUT2. *J Physiol.* 582(1):379-392.
- Malhotra, N. K. 2004. Investigación de mercados, un enfoque aplicado. Pearson Educación Prentice Hall, 4ª ed. Pp. 312-354. México D.F.
- Martínez-Tinajero, C., González-Filomeno, E., García-Gómez, R.S., Salas, G., Constantino-Casas, F., Macías, L., Gracia, I., Tovar-Palacio, C., Durán-de-Bazúa, C. 2010. Effects on body mass of laboratory rats after ingestion of drinking water with sucrose, fructose, aspartame, and sucralose additives. *The Open Obesity J.* En prensa.
- Mayer, A. A. 1993. *Low-calorie foods handbook*. Marcel Dekker Inc. Pp 139-142, 144, 146, Nueva York, NY, EEUU.
- McMurry, J. 1994. *Química orgánica*. Grupo Editorial Iberoamericana, 3ª edición, p. 381. México D.F. México.
- Murray, R. K., Granner, D. K., Mayers, P. A. 1994. *Bioquímica de Harper*. Editorial El manual Moderno, 15ª edición Pp 256-305 México D.F.

- O'Brien-Nabors, L. 2001. *Alternative Sweeteners*. Marcel Dekker, inc. 3a Ed. Pp.102-296 . Nueva York, EEUU.
- Pérez, C. M. 1997. Aspectos metabólicos, económicos y legales de importancia del aspartame como edulcorante no calórico. Editorial Salvat. Pp. 134-200 . México D.F.
- Pérez, G.C., Pinedo M.B., San Román, A.B., Fernández, P.M.C., Jiménez D.E., Juanes, S.S. 2010. Búsqueda en internet. *Cromatografía Principios y Aplicaciones*. Dirección electrónica consultada en febrero de 2010. http://www.profeonline.com/laboratorioquimico/mod_12/docs/cromatografia_teo_y_aplicaciones.pdf
- Rambla, F.J., Garrigues, S., De la Guardia, M. 1997. PLS-NIR determination of total sugar, glucose, fructose and sucrose in aqueous solutions of fruit juices. *Analytica Chimica Acta*. 344:41-53.
- Rubinson, J.F., Rubinson, K.A. 2000. *Química analítica contemporánea*. Pearson Educación. México D.F. México.
- Rubio, F., Luis, A. 2004. Edulcorantes intensos en la Comunidad Europea. *Alimentaria*, 27(216):17-21, 27
- Sánchez-Guillén, J.L. 2010. Búsqueda en Internet: Glúcidos. Dirección electrónica consultada en enero de 2010 http://sapiens.ya.com/bio_ic_barca/ah_GLUCIDOS/informacion.htm
- Skoog, D., West, D. 2001. *Principios de análisis instrumental*. Mc Graw Hill, pp. 703-702, 912, 913. México D.F. México.
- Smith, J. 1993. *Food Additive User's Handbook*. Blackie and Son Ltd., 1a Ed. Pp. 46-65. Glasgow. Reino Unido.
- Solano, J.C., Badilla, B. 2010. Búsqueda Internet: Efectos secundarios de la Sacarina. Centro de información de Medicamentos (CIMED). Facultad de Farmacia, Universidad de Costa Rica, pp. 57-58 Dirección electrónica consultada en febrero de 2010 <http://www.binasss.sa.cr/revistas/rccm/v12n1-2/art13.pdf>
- Stegink, L. D., Filer, L. J. Jr. 1992. *Aspartame physiology and biochemistry*. Ed Marcel Dekker. Inc. Nueva York, NY. EEUU.

- Tomoyoshi, S. A., Serwe, M. 2000. Determination of carbohydrates in food samples by capillary electrophoresis with indirect UV detection. *Food Chemistry Analytical, Nutritional and Clinical Methods Section* 69:339-344.
- Valdés, A., Granda, M., Pérez, A.I., Pina, G., Díaz García, M.E. 2001. Sistemas automatizados de análisis para la determinación de fructosa y sacarosa en productos de la industria azucarera. *Ciencia y Tecnología Alimentaria, Sociedad Mexicana de Nutrición y Tecnología Alimentaria.* 3(004):248-254.
- Vivanco, M. 2005. Muestreo estadístico, diseño y aplicaciones. Ed. Universitaria, pp. 59-112, Santiago de Chile, Chile.
- Voet, D., Voet, J. G. 1992. *Bioquímica.* Ed Omega, S.A. Barcelona. España
- Wasik, A., McCourt, J., Buchgraber, M. 2007. Simultaneous determination of nine intense sweeteners in foodstuffs by high performance liquid chromatography and evaporative light scattering detection. Validated Method. European Commission. Institute for Reference Materials and Measurements, pp. 1-38, Bruselas, Bélgica.
- Wylie-Rosett, J., Segal-Isaacson, C. J., Segal-Isaacs, A. 2004. Carbohydrates increases in obesity: Does the type of carbohydrates make a difference? *Obes. Res.* 12:124S-129S.