

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

E.A.P. DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

**Determinación de etanol en bebidas refrescantes por
método enzimático**

TESIS

para optar el título de Químico Farmacéutico

AUTORA:

Mónica Pascuala Ferrel Quispe

ASESORA:

Teófila Haydeé Zúñiga Cáceres

Lima, Perú

2011

DEDICATORIA

A DIOS:

Por permitirme llegar a este momento tan especial en mi vida. Por los triunfos y los momentos difíciles que me han enseñado a valorarte cada día más.

A mi padre Alejandro:

Por brindarme los recursos necesarios y estar a mi lado apoyándome y aconsejándome siempre. Por los ejemplos de perseverancia y constancia que lo caracterizan y que me ha infundido siempre, por el valor mostrado para salir adelante y por su amor.

A mi madre Esperanza:

Por hacer de mi una mejor persona a través de sus consejos, enseñanzas y por sobre todo, su amor. Por cultivar e inculcar ese sabio don de la responsabilidad.

Gracias por ayudarme a cumplir mis objetivos.

MONICA FERREL

AGRADECIMIENTOS

A la Q.F. T. Haydée Zúñiga Cáceres, asesora de la presente tesis, por su orientación, estimulación, paciencia y constante apoyo para la culminación del presente trabajo.

Al Vicerrectorado de Investigación Científica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos por el financiamiento para la realización de la presente tesis.

A los distinguidos Miembros del Jurado Examinador y Calificador:

Presidenta: Dra. Maria Elizabeth Gonzales Loayza

Miembros: Mg. Gloria Clotilde Gordillo Rocha

Mg. José Alfonso Apesteguía Infantes

Q.F. Esp. Gustavo Antonio Guerra Brizuela

Por sus valiosos aportes al presente trabajo.

ÍNDICE

RESUMEN

SUMMARY

I. INTRODUCCIÓN

II. OBJETIVOS

III. JUSTIFICACION

IV. GENERALIDADES

4.1 Evolución del consumo de bebidas refrescantes

4.2 Consideraciones generales

A. Según el Codex Alimentarius

B. Según la Reglamentación Española

C. Según DIGESA

4.3 Producción de bebidas refrescantes

a. Suministro y tratamiento de agua potable

b. Preparación del jarabe simple de azúcar

c. Elaboración del jarabe terminado: mezcla de ingredientes

d. Preparación de la bebida terminada

e. Recepción y preparación de envases (lavado e inspección)

f. Llenado y cerrado

g. Codificado, etiquetado y encajado o empaquetado

h. Almacenamiento, transporte y distribución

4.4 Generalidades sobre el etanol

a. Acción del etanol en el organismo

b. Metabolismo del Etanol

b.1 Absorción

b.2 Distribución

b.3 Metabolismo

4.5 Enfermedades relacionadas con el consumo de bebidas refrescantes:

- a. Riesgo de retraso del crecimiento por consumo excesivo de zumos de frutas**
- b. Riesgo de diarrea por alteración de la absorción de los hidratos de carbono por consumo excesivo de zumo de fruta**
- c. Empleo inadecuado de las bebidas refrescantes y zumos de fruta en la diarrea aguda**
- d. Empleo indiscutible de los zumos para el tratamiento del estreñimiento**
- e. Alergia a zumos de fruta**
- f. Interacciones farmacológicas de los zumos de fruta**
- g. Consumo de bebidas blandas y riesgo de sobrepeso y obesidad**
- h. Dislipidemia y bebidas blandas**
- i. Alteración del metabolismo de la glucosa y bebidas blandas**

4.6 Estudios Previos

V. PARTE EXPERIMENTAL

5.1 Metodología de análisis del etanol por espectrofotometría enzimática

5.2 Materiales y métodos

5.3 Procedimiento experimental

5.4 Cálculos

5.5 Diseño de la investigación

5.6 Curva de calibración

VI. RESULTADOS

VII. DISCUSIÓN

VIII. CONCLUSIONES

IX. RECOMENDACIONES

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

XI. ANEXOS

RESUMEN

Tomando en cuenta que en otros países como México, Chile, España, una característica propia de las bebidas refrescantes (bebidas no alcohólicas) es la concentración de etanol por debajo de 0.5% v/v y que su presencia se relaciona con contaminación microbiana, se decidió realizar la presente investigación con el fin de determinar cuantitativamente la presencia de etanol en las bebidas refrescantes que se comercializan en Lima Metropolitana por un método enzimático usando espectrofotometría UV-Visible.

Se delimitó el universo de trabajo a las bebidas de mayor consumo de los supermercados en Lima Metropolitana en un total de 40 muestras divididas en: 10 refrescos líquidos, 10 aguas gasificadas jarabeadas (gaseosas), 5 néctares de fruta, 5 bebidas (rehidratantes y especiales) y 10 bebidas instantáneas en polvo.

Los resultados indican que todas las muestras analizadas contienen etanol en concentraciones que variaron desde 0.0000048 hasta 2.91 %, observándose que algunas muestras se encuentran muy por encima del nivel máximo aceptado en el Reglamento Técnico-Sanitario para la Elaboración, Circulación y Venta de de Bebidas Refrescantes de España (< 0.5 % v/v). Así mismo, la Norma Técnica Peruana 214.001, establece el nivel máximo permitido de alcohol solo para bebidas gasificadas jarabeadas (0.5 % v/v), que algunas muestras analizadas no cumplen.

Para las muestras con valores no aceptables se requiere implementar un sistema de buenas prácticas de manufactura, almacenamiento y control de calidad para controlar la generación de etanol y su relación con la contaminación microbiológica en bebidas refrescantes (no alcohólicas).

Palabras clave: bebidas refrescantes, bebidas no alcohólicas, etanol, método enzimático, espectrofotometría UV-Visible.

ABSTRACT

Taking into account that in countries like Mexico, Chile, Spain and European regulation as a characteristic of soft drinks (soft drinks) is the concentration of ethanol below 0.5% v/v and that their presence is related to pollution microbial was decided to conduct this investigation in order to determine quantitatively the presence of ethanol in all soft drinks sold in Metropolitan Lima by an enzymatic method using UV-Visible spectrophotometry.

It defined the universe of work most consumed beverages in supermarkets in Metropolitan Lima in a total of 40 samples divided into 10 samples of liquid refreshments, 10 samples of syrup carbonated water (soda), 5 samples of nectars, 5 samples of other beverages (rehydration and special) and 10 samples of instant powdered drinks.

The analysis of the results showed the presence of ethanol in proportions ranging from 0.0000048% to a maximum of 2.91%, with some samples are well above the accepted maximum level established for example in the Technical Regulation for Preparing Health, Circulation and Sale of Soft Drinks in Spain (<0.5% v / v), and 214,001 Peruvian Technical Standard, which establishes the maximum permitted level of alcohol only carbonated beverage syrups (0.5% v / v).

The results indicate that all samples containing ethanol. Most of the samples does not exceed allowable limits for soft drinks (non alcoholic), but in the case of those samples with unacceptable is necessary to implement a

system of good manufacturing practices, storage and quality control to control the generation of ethanol and its relation to microbiological contamination in soft drinks (non alcoholic).

Keywords: soft drinks, ethanol, enzymatic method, UV-Visible spectrophotometry.

I. INTRODUCCIÓN

Perú se distingue por comercializar diferentes tipos de bebidas, las cuales son inscritas en nuestra Entidad Reguladora de Alimentos y Bebidas (DIGESA) tomando como referencia sus propiedades particulares. Un grupo de estas bebidas son las bebidas no alcohólicas denominadas bebidas refrescantes, las cuales agrupan a refrescos, jugos, néctares, bebidas de fruta y bebidas gasificadas jarabeadas.

Actualmente, la industria de bebidas refrescantes es una de las de mayor demanda y consumo a nivel mundial, ya que cada día aumentan los consumidores de estas bebidas, especialmente niños y adolescentes. Este creciente consumo unido a la alta generación de ingresos de este tipo de industria ha provocado que en muchos lugares del mundo se manejen de forma casera para lograr bebidas a bajo precio. Esto, como toda industria que trabaje fuera de las normas establecidas, crea una serie de complicaciones que van desde las financieras y legales hasta las de salud, al no producirse dentro de compañías confiables que cuenten con estándares de calidad.

Esto se agrava cuando estas bebidas son elaboradas sin tomar en cuenta las buenas prácticas de manufactura y son distribuidas sin haberseles realizado un control de calidad riguroso, en el cual se pueda determinar la presencia o no de contaminación o adulteración; por tal razón, es necesario realizar investigaciones que pongan en evidencia la calidad de estos productos.

Hoy en día, en Perú no existe una norma regulatoria que defina y agrupe a este tipo de productos (bebidas refrescantes) por sus características similares, como sucede en España, donde mediante el *Real Decreto 650/2011* del 9 de Mayo del 2011 aprueba la reglamentación técnico-sanitaria en materia de bebidas refrescantes, la cual define a las bebidas refrescantes como bebidas analcohólicas, carbonatadas o no, preparadas con agua de consumo humano, aguas preparadas, agua mineral natural o de manantial, que contengan uno o más de los siguientes ingredientes: anhídrido carbónico, azúcares, zumos, purés, disgregados de frutas y/o vegetales, extractos vegetales, vitaminas y minerales, aromas, aditivos autorizados u otros ingredientes alimenticios.

Tomando como referencia esta Reglamentación Española, se observa que uno de los requisitos no considerados en Perú para el análisis de las bebidas refrescantes es la concentración de etanol. El presente estudio se realiza con el objetivo de determinar el etanol en las muestras de bebidas refrescantes de mayor consumo en Lima Metropolitana. Los resultados obtenidos permitirán tener información sobre la presencia y concentración del etanol en las bebidas refrescantes de nuestro medio, que podría ser tomado en cuenta como un parámetro de calidad a ser incluido en los análisis de control de calidad de las bebidas refrescantes.

Para llevar a cabo esta investigación, se delimitó el universo de trabajo a las bebidas refrescantes de mayor consumo en Lima Metropolitana, seleccionando 40 muestras de las bebidas que poseen registro sanitario agrupándolas de la siguiente manera: refrescos líquidos, néctares, bebidas

gasificadas jarabeadas (gaseosas), bebidas rehidratantes y especiales y bebidas instantáneas en polvo, a las cuales se les determinó por triplicado el contenido de etanol utilizando un método enzimático por espectrofotometría UV-Visible.

II. OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

- Determinar la presencia y concentración de etanol en las bebidas refrescantes de mayor consumo de los supermercados de Lima Metropolitana.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Cuantificar la presencia de etanol en las bebidas refrescantes de mayor consumo en Lima Metropolitana, por el método espectrofotométrico enzimático.
- Determinar si el contenido de etanol en todas las bebidas refrescantes se encuentran por debajo del 0.5%, límite máximo permitido por el Reglamento técnico-sanitario para la elaboración, circulación y venta de bebidas refrescantes de España.
- Determinar el cumplimiento de la Norma Técnica Peruana 204.001, específica para bebidas gasificadas jarabeadas (gaseosas).
- Determinar el tipo de bebida refrescante con los mayores y menores porcentajes de etanol.

III. JUSTIFICACIÓN

La industria de bebidas refrescantes está en constante crecimiento, no sólo a nivel nacional sino internacional. En Chile y España se dan los porcentajes más altos de consumo de esta clase de bebidas.

Las bebidas refrescantes suelen llevar zumos de frutas, extractos vegetales, sustancias aromáticas, etc. que proporcionan el gusto y el aroma a la bebida, por eso se considera que las bebidas refrescantes son productos seguros para los consumidores y de alta calidad sanitaria.

Según el Decreto Supremo N° 007-98-SA, Reglamento sobre Vigilancia y Control Sanitario de Alimentos y Bebidas, las bebidas industrializadas necesitan cumplir con ciertos requisitos previos a su inscripción y comercialización. Entre ellos, los resultados de los análisis físico-químicos y microbiológicos del producto terminado, procesado por el laboratorio de control de calidad de la fábrica o por un laboratorio acreditado en el Perú. Los análisis fisicoquímicos y microbiológicos incluyen: sólidos solubles (grados brix), pH, acidez titulable, recuento de microorganismos coliformes, de aerobios mesófilos, de mohos y levaduras.

Sin embargo, en otros países como Chile, Argentina, México y España, otro parámetro para medir la calidad sanitaria de las bebidas refrescantes es la concentración de etanol, ya que estas bebidas están destinadas al consumo de niños, jóvenes y adultos; y su presencia a niveles superiores a 0.5% v/v está relacionado con el crecimiento microbiano según Trifiro *et al.* por lo que

recomiendan realizar el análisis de alcoholes y otros compuestos volátiles para asegurar la calidad del producto final.

Realizar este tipo de investigación, pondrá en evidencia la presencia o no de etanol en este tipo de productos y en aviso a las industrias nacionales, a las autoridades de sanidad y a los consumidores, en cuanto a realizar un control de calidad más profundo a este tipo de productos y aumentar sus exigencias.

IV. GENERALIDADES

4.1 EVOLUCIÓN DEL CONSUMO DE BEBIDAS REFRESCANTES

En las últimas décadas, en Estados Unidos y Europa, principalmente España y también en Perú se ha producido un aumento importante del consumo de bebidas refrescantes, que incluyen: gaseosas, néctares de fruta, jugos, refrescos líquidos, etc. El ejemplo de Estados Unidos es paradigmático, ya que pasa de un consumo de 104 ml/día en 1945 a 541 ml/día en 1997, lo que significa un incremento del 520 % en 50 años¹. Este aumento se pone de manifiesto en niños entre 1 y 4 años, donde en la actualidad más del 50 % consume más del 215 ml/día y más de una ración diaria². En el período comprendido entre 1965 y 1996, el consumo de estas bebidas por adolescentes se incrementa en el 187 % en varones y en el 123 % en mujeres. En tan solo 5 años transcurridos entre 1989-1991 y 1994-1995 se ha pasado en niños entre 2 y 17 años de un consumo de 200 ml/día a 280 ml, lo que significa un 40 % más³.

Por lo que se refiere a España y según los datos suministrados por la Asociación de empresarios de Bebidas Refrescantes (ANFABRA), en las últimas décadas se ha producido un aumento importante del consumo de bebidas refrescantes. Así desde 1991 a 2001 el incremento de su consumo representa el 41.5 % destacando el 62.1 % para las bebidas de extractos y el 26.7 % para los zumos. Este incremento aumenta con la edad y el consumo de los adolescentes (740 ml/día) duplica al de los niños (388 ml/día)⁴.

En el Perú, la producción de bebidas gaseosas ha registrado una tendencia creciente durante los últimos años. Desde 1994, el sector ha crecido a una tasa anual promedio de 10 %. El consumo aparente de gaseosas se ha incrementado en el período de 1997-2002 en aproximadamente 60 %. Este incremento se debe tanto a un aumento de la gama de productos ofrecidos, en especial, a la reducción de precios⁵.

Estos datos muestran la importancia de este tipo de bebidas en los hábitos de consumo de niños y adolescentes. Por ello debe conocerse su composición, la reglamentación actual y la influencia de su consumo en la salud de esta población.

4.2 CONSIDERACIONES GENERALES

Las bebidas son comidas que se distinguen de las otras por dos principales características: primero, son líquidas o son consumidas en estado líquido y segundo, son generalmente usadas para satisfacer la sed⁶.

Los mayores grupos de bebidas, las cuales comparten estas características son las bebidas carbonatadas no alcohólicas, comúnmente conocidas como soda o bebidas gaseosas y los refrescos de fruta o jugos de fruta. Todas las bebidas antes mencionadas tienen una característica adicional en común que es la relativa carencia de valor nutritivo.

Las bebidas refrescantes no alcohólicas, incluyen⁷:

A. SEGÚN EL CODEX ALIMENTARIUS

El Codex Alimentarius (NORMA GENERAL DEL CODEX PARA LOS ADITIVOS ALIMENTARIOS CODEX STAN 192-1995) considera a las bebidas refrescantes dentro del grupo de bebidas no alcohólicas, como sigue⁸:

A.1 Bebidas no alcohólicas: Comprende las aguas naturales (A.1.1.1) y otras aguas embotelladas (A.1.1.2), cada una de las cuales puede ser sin o con gas.

A.1.1 Aguas

A.1.1.1 Aguas minerales naturales y aguas de manantial: Aguas obtenidas directamente del manantial y envasadas cerca de éste; se caracterizan por la presencia, en proporciones relativas, de determinadas sales minerales, oligoelementos u otros componentes. El agua mineral natural puede tener un contenido natural de gas (anhídrido carbónico del manantial), estar carbonatada (con la adición de anhídrido carbónico), descarbonatada (contener menos anhídrido carbónico que el agua de manantial, de modo que no libera espontáneamente anhídrido carbónico en condiciones normales de temperatura y presión) o enriquecida (con anhídrido carbónico del manantial) o bien no contener gas (sin anhídrido carbónico libre).

A.1.1.2 Aguas de mesa y gaseosas: Comprende aguas, distintas de las aguas naturales de manantial, que pueden tener gas por la adición de anhídrido carbónico y estar tratadas mediante filtración, purificación u otros medios adecuados. Estas aguas pueden contener sales minerales. Las aguas con gas y sin gas con adición de aromatizantes figuran en la categoría A.1.4. Ejemplos: agua de mesa, agua embotellada con o sin adición de minerales, agua purificada, agua de Seltz, soda y agua de Vichy.

A.1.2 Zumos (jugos) de frutas y hortalizas: Esta categoría comprende únicamente los zumos (jugos) de frutas y hortalizas. Las bebidas que se preparan con zumos de frutas u hortalizas figuran en la categoría A.1.4.2. Hay diferentes categorías para las mezclas de zumos (jugos) de frutas u hortalizas en función de sus componentes (a saber, zumos (jugos) de frutas (A.1.2.1) y zumos (jugos) de hortalizas (A.1.3.1)).

A.1.2.1 Zumos (jugos) de frutas: El zumo (jugo) de fruta es el producto líquido sin fermentar pero fermentable obtenido de la parte comestible de frutas frescas sanas de madurez apropiada o de fruta que se ha mantenido sana por medios idóneos. El zumo (jugo) se prepara mediante un procedimiento adecuado que mantiene las características físicas, químicas, organolépticas y nutricionales de los zumos (jugos) de la fruta de la que procede el producto. El zumo (jugo) puede ser turbio o claro, y pueden haberse añadido (hasta reponer el nivel habitual que alcanzan en el mismo tipo de frutas) sustancias aromáticas y componentes volátiles, todos los cuales deberán haberse obtenido por medios físicos idóneos, y haberse extraído en todos los casos del mismo tipo de fruta. Podrán añadirse pulpa y

células obtenidas por medios físicos idóneos del mismo tipo de fruta. Los zumos (jugos) de una sola fruta se obtienen de un solo tipo de fruta. Los zumos (jugos) mixtos se obtienen mezclando dos o más zumos o zumos y purés de distintos tipos de fruta. El zumo (jugo) de fruta puede obtenerse, p. ej., exprimiendo directamente el jugo mediante procedimientos de extracción mecánica, reconstituyendo zumo (jugo) concentrado de fruta (categoría de alimentos A.1.2.3) con agua, o bien sólo en algunas situaciones, mediante extracción con agua de la fruta entera (p. ej., zumo de ciruelas obtenido de ciruelas secas). Son algunos ejemplos el zumo (jugos) de naranja, el zumo (jugo) de manzana, el zumo (jugo) de grosellas negras, el zumo (jugo) de limón el zumo (jugo) de naranja y mango y el agua de coco.

A.1.2.2 Zumos (jugos) de hortalizas: El zumo (jugo) de hortalizas es el producto líquido sin fermentar pero fermentable destinado al consumo directo que se obtiene por extracción mecánica, prensado, molido y/o tamizado de una o más hortalizas frescas sanas u hortalizas conservadas exclusivamente por medios físicos. El zumo (jugo) puede ser claro, turbio o pulposo. Puede haberse concentrado y reconstituido con agua. Los productos pueden obtenerse de una sola hortaliza (p. ej., zanahorias) o de mezclas de las mismas (p. ej., zanahoria y apio).

A.1.2.3 Concentrados para zumos (jugos) de frutas: El zumo (jugo) de fruta es el producto que cumple con la definición proporcional en la categoría de alimentos. Se prepara mediante eliminación física del zumo (jugo) de fruta en una cantidad que incremente el nivel Brix hasta un valor superior por lo menos en un 50 por ciento al establecido para el zumo (jugo) reconstituido

de la misma fruta. En la producción del zumo (jugo) destinado a la elaboración de concentrado se aplicarán procedimientos idóneos, que podrán combinarse con la difusión simultánea de las células o la pulpa de la fruta mediante agua, siempre y cuando los sólidos solubles de fruta extraídos mediante agua se añadan al zumo (jugo) primario en la línea de producción antes del procedimiento de concentración. A los zumos (jugos) concentrados de fruta se les pueden añadir (hasta reponer el nivel que alcanzan normalmente en el mismo tipo de frutas) sustancias aromáticas y componentes volátiles, todos los cuales deben haberse obtenido por medios físicos idóneos y proceder del mismo tipo de fruta. Asimismo podrán añadirse pulpa y células obtenidas por medios físicos idóneos del mismo tipo de fruta. Se venden en forma líquida en jarabe y congelados para la preparación de zumos (jugos) listos para el consumo mediante la adición de agua. Ejemplos: concentrado congelado de zumo de naranja y concentrado de zumo de limón.

A.1.2.4 Concentrados para zumos (jugos) de hortalizas: Se prepara mediante la eliminación física del agua del zumo (jugo) de hortaliza. Se vende en forma líquida, en jarabe y congelados para la preparación de un zumo (jugo) listo para el consumo mediante la adición de agua. Incluye el zumo concentrado de zanahoria.

A.1.3 Néctares de frutas y hortalizas: Los néctares de frutas y hortalizas son bebidas producidas a partir de purés, zumos (jugos) o concentrados de cualquiera de ellos, mezclados con agua y azúcar, miel, jarabes y/o edulcorantes. Las mezclas de néctares de frutas u hortalizas se clasifican en

función de sus componentes (a saber, néctares de frutas (A.1.3.1) y néctares de hortalizas (A.3.1.2)).

A.1.3.1 Néctares de frutas: El néctar de fruta es el producto sin fermentar pero fermentable que se obtiene añadiendo agua, con o sin adición de azúcar, miel, jarabes y/o edulcorantes al zumo (jugo) de fruta, el zumo (jugo) de fruta concentrado, los purés de fruta o purés de fruta concentrados o una mezcla de estos productos. Se le pueden añadir sustancias aromáticas, componentes volátiles, pulpa y células, todos los cuales deben proceder del mismo tipo de fruta y haberse obtenido por medios físicos idóneos. Los productos pueden elaborarse a base de una fruta o una mezcla de frutas. Ejemplos: néctar de pera y néctar de melocotón.

A.1.3.2 Néctares de hortalizas: Producto obtenido añadiendo agua, con o sin adición de azúcar, miel, jarabes y/o edulcorantes, a zumo (jugo) de hortalizas o zumo (jugo) concentrado de hortalizas, o a una mezcla de estos productos. Los productos pueden elaborarse a base de una hortaliza o una mezcla de hortalizas.

A.1.3.3 Concentrados para néctares de frutas: Preparados mediante la eliminación física del agua del néctar de fruta o de los materiales de los que se obtiene. Se venden en forma líquida, en jarabe y congelados para la preparación de néctar listo para el consumo mediante adición de agua. Ejemplos: concentrado de néctar de pera y concentrado de néctar de melocotón.

A.1.3.4 **Concentrados para néctares de hortalizas:** Preparados por eliminación física del agua del néctar de hortalizas. Se venden en forma líquida, en jarabe y congelados para la preparación de néctares listos para el consumo mediante adición de agua.

A.1.4 **Bebidas a base de agua aromatizadas,** incluidas las bebidas para deportistas, bebidas electrolíticas y bebidas con partículas añadidas: Comprende todas las variedades y concentrados con gas y sin gas. Comprende productos a base de zumos (jugos) de frutas y hortalizas. También incluye las bebidas a base de café, té y hierbas aromáticas.

A.1.4.1 **Bebidas a base de agua aromatizadas con gas:** Comprende todas las bebidas aromatizadas a base de agua con adición de anhídrido carbónico y con edulcorantes nutritivos, no nutritivos o intensos y otros aditivos alimentarios permitidos. Incluye la gaseosa (bebida a base de agua con adición de anhídrido carbónico, edulcorantes y aromatizantes) y bebidas con gas como “colas”, bebidas refrescantes a base de raíces y ciertos tipos de especias, lima-limón y otros tipos de cítricos, tanto los de tipo dietético o ligero como normal. Estas bebidas pueden ser transparentes, turbias o pueden contener partículas (p. ej., trozos de fruta). Incluye las llamadas bebidas para deportistas con gas que contienen niveles elevados de nutrientes y otros ingredientes. (p. ej. cafeína, taurina, carnitina).

A.1.4.2 **Bebidas a base de agua aromatizadas sin gas, incluidos los ponches de fruta y las limonadas y bebidas similares:** Comprende bebidas sin adición de anhídrido carbónico a base de zumos (jugos) de

frutas y hortalizas (p. ej., almendras, anís, coco y ginseng), limonadas y bebidas similares con sabor a fruta (p. ej., naranjadas), refrescos a base de cítricos, capilé groselha, bebidas de ácido láctico, bebidas a base de café y té listas para consumir con o sin leche o sólidos lácteos y bebidas a base de hierbas aromáticas (p. ej. té frío, té frío con sabor a frutas, capuchino en lata para beber frío) y bebidas para “deportistas” que contienen electrolitos. Estas bebidas pueden ser transparentes o contener partículas (p. ej., trozos de fruta) y pueden estar o no edulcoradas con azúcar o un edulcorante no nutritivo de gran intensidad. Comprende las bebidas denominadas "energéticas" sin gas que contienen niveles elevados de nutrientes y otros ingredientes (p. ej. cafeína, taurina, carnitina).

A.1.4.3 Concentrados (líquidos o sólidos) para bebidas a base de agua aromatizadas: Comprende concentrados en polvo, jarabe, líquidos y congelados para preparar refrescos a base de agua, con gas o sin gas, mediante la adición de agua o agua con gas. Ejemplos: jarabes para refrescos con soda (p. ej., el jarabe de cola), jarabes de fruta para refrescos, concentrado helado o en polvo para limonada y mezclas para té frío.

A.1.5 Café, sucedáneos del café, té, infusiones de hierbas y otras bebidas calientes a base de cereales y granos, excluido el cacao: Comprende los productos listos para consumir (p. ej., enlatados) y sus mezclas y concentrados.

B. SEGÚN LA REGLAMENTACION ESPAÑOLA

La reglamentación técnico sanitaria para la elaboración, circulación y venta de bebidas refrescantes de España⁹ considera como bebidas refrescantes aquella preparada con agua potable y los ingredientes y demás productos autorizados, adicionado o no de anhídrido carbónico. Y establece distintas clases de bebidas refrescantes en base a su composición, que denominan:

B.1 Agua de seltz: bebida constituida por agua y un mínimo de seis gramos por litro de anhídrido carbónico.

B.2 Agua de soda: bebida constituida por agua y un mínimo de seis gramos por litro de anhídrido carbónico que se caracteriza por contener bicarbonato sódico.

B.3 Agua aromatizada: agua, con o sin anhídrido carbónico, que contiene aromas.

B.4 Gaseosa: la bebida incolora preparada con agua, anhídrido carbónico, aromas, azúcares y/o edulcorantes y aditivos autorizados.

B.5 Otras bebidas refrescantes: la denominación genérica de bebida refrescante se podrá concretar con una denominación que se corresponda con su composición o características. Entre otras, con carácter enunciativo y no limitativo se encuentran:

- **Las bebidas refrescantes de zumos de frutas,** que se caracterizan por contener zumos, purés, disgregados de frutas o sus mezclas.

- **Las bebidas refrescantes de extractos**, que se caracterizan por contener extractos de frutas, de otros vegetales o de ambos.
- **Las bebidas refrescantes mixtas**, que están constituidas por bebidas refrescantes y otros alimentos.
- **Las bebidas refrescantes para diluir y los productos sólidos para la preparación de bebidas refrescantes**, que serán aquellas que una vez reconstituidas cumplan lo establecido en esta disposición.
- **Las bebidas refrescantes aromatizadas**, que se caracterizan por contener agentes aromáticos con adición de otros ingredientes alimenticios.

C. SEGÚN LA REGLAMENTACION PERUANA (Normas Técnicas Peruanas)

Según las Normas Técnicas Peruanas¹⁰, las bebidas no alcohólicas se clasifican en:

C.1 REFRESCOS:

Según la Norma Técnica Peruana NTP 203.111¹¹, el refresco es el producto elaborado con agua potable tratada, ingredientes y aditivos permitidos, sometidos a un tratamiento de conservación adecuado, envasado y que es de consumo directo.

Requisitos:

- Los refrescos deben tener un color uniforme, olor y sabor característicos a la fruta, verduras o legumbre declarada, excepto aquellos con sabor indefinido.

Tabla 1. Requisitos físico-químicos de la NTP 203.111 para refrescos

	Mínimo
Sólidos solubles, % (en grados brix a 20 °C)	7,0
pH	2,0
Acidez titulable, g/100 cm ³ (expresado como ácido cítrico anhidro)	0,10

Tabla 2. Requisitos microbiológicos de la NTP 203.111 para refrescos

	N	M	M	c
Aerobios mesófilos UFC/ml	5	10	100	2
Mohos UFC/ml	5	1	10	2
Levaduras UFC/ml	5	1	10	2
Coliformes NMP/ml	5	<3	-	0

En donde:

n = número de muestras por analizar

m = índice máximo permisible para indicar el nivel de buena calidad

M = índice máximo permisible para identificar el nivel aceptable de calidad.

c = número máximo de muestras permisibles con resultados entre m y M.

< = menor a

C.2 BEBIDAS JARABEADA GASIFICADA:

De acuerdo a la NTP 214.001¹² de 1985, la bebida jarabeada gasificada es el producto obtenido por disolución de edulcorantes nutritivos y dióxido de carbono en agua potable tratada, pudiendo estar adicionada de saborizantes naturales y/o artificiales, jugos de frutas, acidulantes, conservadores, emulsionantes y estabilizantes, antioxidantes, colorantes, amortiguadores, agentes de enturbiamiento, antiespumantes y espumantes u otros aditivos alimentarios permitidos por la Autoridad Sanitaria.

Clasificación:

Las bebidas gasificadas jarabeadas de acuerdo a la sustancia que le da sabor, olor o color se clasifican en dos tipos:

- Tipo I: Con jarabe a base de saborizantes naturales y/o artificiales adicionados de jugos de frutas en proporciones determinadas.
- Tipo II: Con jarabes a base de saborizantes naturales y/o artificiales, adicionados de jugos de frutas en proporciones determinadas.

Requisitos:

La bebida gasificada jarabeada deberá cumplir con los siguientes requisitos:

- Deberá contener dióxido de carbono en una cantidad no menor de 1,5 volúmenes ni mayor de cinco volúmenes.
- No deberá contener alcohol en una proporción mayor de 0,5 % en volumen de alcohol etílico.

- Deberá presentar ausencia de cuerpos y sedimentos extraños a excepción de la pulpa de fruta que haya intervenido en su elaboración.
- No deberá contener drogas de uso medicinal restringido.

Tabla 3. Requisitos microbiológicos de la NTP 214.001 para bebidas gasificadas jarabeadas

Microorganismos mesófilos, viables	Máximo 50 ufc/cm ³
Levaduras	Máximo 30 ufc/cm ³
Hongos	Máximo 10 ufc/cm ³
Microorganismos patógenos, bacterias del grupo coliforme, huevos o quistes de parásitos	Ausencia total

Tabla 4. Requisitos físico-químicos de la NTP 214.001 para bebidas gasificadas jarabeadas

Acidez expresada en ácido cítrico	Máximo 0.50 g/100cm ³
pH	2.5 a 4.0
Cafeína	Máximo 200 ppm
Sulfato de quinina	Máximo 98 ppm

C.3 JUGOS DE FRUTA:

Según la NTP 203.110¹³, los jugos de fruta son líquidos sin fermentar, pero fermentables, que se obtienen de la parte comestible de frutas en buen estado, debidamente maduras. Algunos jugos pueden elaborarse junto con sus pepitas, semillas y pieles que no puedan eliminarse mediante las buenas prácticas de fabricación (BPF).

Requisitos:

- El jugo puede ser turbio, claro o clarificado y debe tener las características sensoriales propias de la fruta de la cual procede.
- El jugo debe estar exento de olores o sabores extraños u objetables.

Tabla 5. Requisito microbiológico de la NTP 203.110 para jugos de fruta

	n	m	M	c
Coliformes NMP/cm	5	<3	--	0
Recuento estándar en placa REP UFC/cm ³	5	10	100	2
Recuento de mohos UFC/cm ³	5	1	10	2
Recuento de levaduras UFC/cm ³	5	1	10	2

En donde:

n = número de muestras por analizar

m = índice máximo permisible para indicar el nivel de buena calidad

M = índice máximo permisible para identificar el nivel aceptable de calidad.

c = número máximo de muestras permisibles con resultados entre m y M.

< = menor a

C.4 NÉCTAR DE FRUTA:

Según la NTP 203.110¹³, el néctar de fruta es el producto sin fermentar pero fermentable que se obtiene añadiendo agua, con o sin adición de azúcares, de miel y/o jarabes, y/o edulcorantes, a los jugos de frutas. Podrán añadirse sustancias aromáticas (naturales, idénticos a los naturales, artificiales o una mezcla de ellos), permitidos por la autoridad sanitaria nacional competente o en su defecto por el Codex Alimentarius.

Requisitos:

- El néctar puede ser turbio, claro o clarificado y debe tener las características sensoriales propias de la fruta de la cual procede.
- El jugo debe estar exento de olores o sabores extraños u objetables.
- El néctar de fruta debe tener un pH menor de 4.5.
- El contenido de sólidos solubles provenientes de la fruta presentes en el néctar deberá ser mayor o igual al 20 % m/m de los sólidos solubles contenidos en el jugo original para todas las variedades de fruta.

Tabla 6. Requisito microbiológico de la NTP 203.110 para néctares de fruta

	N	m	M	c
Coliformes NMP/cm	5	<3	--	0
Recuento estándar en placa REP UFC/cm ³	5	10	100	2
Recuento de mohos UFC/cm ³	5	1	10	2
Recuento de levaduras UFC/cm ³	5	1	10	2

En donde:

n = número de muestras por analizar

m = índice máximo permisible para indicar el nivel de buena calidad

M = índice máximo permisible para identificar el nivel aceptable de calidad.

c = número máximo de muestras permisibles con resultados entre m y M.

< = menor a

C.5 BEBIDAS DE FRUTA:

Según la NTP 203.110¹³, las bebidas de fruta son los productos sin fermentar, pero fermentables, obtenido mediante la dilución con agua del jugo (concentrados o sin concentrar o la mezcla de estos, provenientes de una o más frutas) y la adición de ingredientes y otros aditivos permitidos.

Las bebidas de fruta son similares a los néctares de fruta, con la diferencia de que, en lugar de contener un mínimo de 20 % de sólidos solubles de jugo o puré que lo origina, contienen un mínimo de 10 % de sólidos solubles.

Requisitos:

- El contenido de sólidos solubles provenientes de la fruta presentes en el néctar deberá ser mayor o igual al 10 % m/m de los sólidos solubles contenidos en el jugo original para todas las variedades de fruta.
- El pH será menor de 4,5.

Tabla 7. Requisitos microbiológicos de la NTP 203.110 para bebidas de fruta

	N	m	M	c
Coliformes NMP/cm	5	<3	--	0
Recuento estándar en placa REP UFC/cm ³	5	10	100	2
Recuento de mohos UFC/cm ³	5	1	10	2
Recuento de levaduras UFC/cm ³	5	1	10	2

En donde:

n = número de muestras por analizar

m = índice máximo permisible para indicar el nivel de buena calidad

M = índice máximo permisible para identificar el nivel aceptable de calidad.

c = número máximo de muestras permisibles con resultados entre m y M.

< = menor a

4.3 PRODUCCIÓN DE BEBIDAS REFRESCANTES

La elaboración de una bebida refrescante según la Asociación Nacional de Bebidas Refrescantes de España¹⁴ se lleva a cabo a través de las siguientes etapas:

a. Suministro y tratamiento de agua potable

El agua que se utiliza para la elaboración de las bebidas refrescantes procede, generalmente, de la red de abastecimiento municipal o de un pozo privado. Esta agua, que es ya potable antes de su entrada a la planta de elaboración, se somete a diversos tratamientos sanitarios. En ocasiones, también se utiliza agua mineral natural o de manantial. Las industrias analizan el agua de entrada a la planta y frecuentemente, la tratan con el fin de adecuar sus características a la fabricación de bebidas.

b. Preparación del jarabe simple de azúcar

La elaboración del jarabe simple se inicia con la dilución del azúcar - en forma cristalina o líquida- en agua. Posteriormente, ese jarabe simple es filtrado, decolorado -dependiendo de la calidad del azúcar- y tratado térmicamente (proceso de pasteurización).

En el caso de las bebidas de bajo contenido calórico, se reemplaza el azúcar del jarabe por edulcorantes intensos.

c. Elaboración del jarabe terminado: mezcla de ingredientes

El jarabe terminado es una mezcla de diversos ingredientes, pudiendo contener jarabe simple, otros azúcares (glucosa, fructosa, y sus jarabes correspondientes), preparados aromáticos e ingredientes como zumos, vitaminas, minerales y aditivos alimenticios.

Una vez elaborado, el almacenamiento del jarabe en los tanques de mezcla no debe superar las 24 horas, con el fin de evitar su alteración microbiológica y sensorial.

d. Preparación de la bebida terminada

Se realiza en un mezclador en el que se combina el jarabe terminado, el agua tratada -en sus proporciones adecuadas- y el gas carbónico (en bebidas con gas).

En algunas plantas, el agua tratada es previamente carbonatada antes de mezclarse con el jarabe terminado. Con respecto al anhídrido carbónico (CO₂), éste se almacena en forma líquida en tanques y antes de su utilización, se filtra para garantizar una calidad óptima.

Las bebidas sin gas se someten a un tratamiento térmico (pasteurización) antes de su envasado -que es normalmente aséptico- para garantizar su calidad microbiológica, o bien se envasan y

posteriormente se les realiza este tratamiento en túneles de pasteurización.

e. Recepción y preparación de envases (lavado e inspección)

Los envases de bebidas reutilizables (botellas de vidrio) llegan a la planta embotelladora a través de los sistemas de retorno establecidos por la industria o las autoridades locales.

Una vez en la planta, las botellas de vidrio reutilizables son seleccionadas y sometidas a un proceso de lavado y desinfección. Esto se realiza mediante un sistema de remojo y pulverización con detergentes y desinfectantes, combinando la temperatura ambiente o altas temperaturas con una acción mecánica (cepillado) que elimina las etiquetas.

Después de su lavado, las botellas son inspeccionadas individualmente para comprobar la eliminación de líquidos residuales y cuerpos extraños y asegurarse de que no existen defectos de ningún tipo. Esta operación se realiza bien mediante inspectores electrónicos o a través de una inspección visual del personal entrenado para ello.

Los envases nuevos que serán reutilizados o aquellos que no son reutilizables, se enjuagan con agua potable antes de llenarlos. Posteriormente, estos envases también son sometidos a inspección.

f. Llenado y cerrado

El llenado es el proceso mediante el cual las bebidas se dispensan automáticamente desde la máquina llenadora a los envases individuales antes de cerrarlos.

En la máquina de cerrado, los envases se cierran mediante los tapones, cápsulas o tapas dependiendo de sus características.

Una vez cerrados, los envases se inspeccionan para asegurar que el nivel de llenado es el correcto y, en el caso de las bebidas con gas, se atemperan para evitar condensaciones, ya que éstas se envasan a temperatura inferior a la ambiental. Cuando se trata de bebidas sin gas, éstas también se atemperan tras su tratamiento térmico, evitando así el deterioro sensorial del producto por las altas temperaturas.

g. Codificado, etiquetado y encajado o empaquetado

Durante la etapa de etiquetado -salvo en el caso de las latas-, los productos se codifican sobre el envase, tapón o sobre la etiqueta. Esto asegura su trazabilidad antes de pasar a las máquinas, donde se agruparán (encajado o empaquetado) en cajas, palets u otras presentaciones para su posterior almacenamiento y distribución.

A su vez, los embalajes secundario y terciario (exteriores a la botella o lata) también se codifican para garantizar la trazabilidad del producto.

h. Almacenamiento, transporte y distribución

Tras el envasado y etiquetado, las bebidas refrescantes pasan al almacén de la fábrica, donde permanecerán hasta su distribución. Allí la temperatura se mantiene fresca para una mejor conservación del producto; además, el almacén debe estar correctamente ventilado.

Normalmente los envases se guardan en cajas o palets debidamente identificados, apilados en superficie y altura adecuados al movimiento, recepción, manipulación y expedición. Estas existencias se rotan periódicamente para evitar un almacenamiento prolongado. Además se realizan inspecciones, tanto de los productos como de las condiciones del local, para evitar que los envases y las bebidas se deterioren.

Con respecto al transporte desde la fábrica a los lugares de distribución o locales comerciales, éste se efectúa normalmente por carretera, en camiones de la propia empresa envasadora o contratados por ésta. Durante esta etapa, los envases suelen mantenerse en las mismas cajas o palets en las que han sido almacenados, para evitar su rotura.

4.4 GENERALIDADES SOBRE EL ETANOL

El alcohol es un líquido incoloro y volátil que está presente en diversas bebidas fermentadas, en concentraciones que van desde el 5 % hasta el 20 %, como es el caso de la cerveza y los vinos respectivamente. Algunos de estos fermentos se destilan por medio de un alambique para aumentar su

concentración etílica hasta un 40 %; así es como se producen el tequila, el whisky, el vodka, el ron, la ginebra, el anís, etc. Dependiendo del género de bebida que lo contenga, el alcohol aparece acompañado de distintos elementos químicos que lo dotan de color, sabor, olor y otras características¹⁵.

Las concentraciones de alcohol difieren de una bebida a otra; la ingesta del alcohol suele medirse como el porcentaje que una persona llegue a acumular en su torrente sanguíneo. De esta manera se considera que las dosis bajas fluctúan entre 0.02 y 0.06 %, mientras que las dosis letales sobrepasan el 0.50 %. En términos cotidianos, la cantidad de alcohol suele medirse a través del número ingerido de copas, vasos, latas, botellas, etc. En personas que no han adquirido tolerancia hacia el alcohol, se puede hablar en términos de "tragos", esto es, de la cantidad contenida en el tipo de recipiente en el que suele tomarse la bebida.

a. Acción del etanol en el organismo

El alcohol se ingiere por vía oral. El tiempo que pasa antes de alcanzar las concentraciones máximas en la sangre varía de 25 hasta 90 minutos. Cuando el etanol alcanza el cerebro actúa como un depresor primario y contínuo del Sistema Nervioso Central. La estimulación aparente es en realidad un resultado de la depresión de los mecanismos de control inhibitorio del cerebro. Como ocurre con la mayoría de las drogas, sus efectos dependen de la dosis.

Los centros superiores se deprimen primero afectando el habla, el pensamiento, la cognición y el juicio. A medida que la concentración alcohólica aumenta, se deprimen también los centros inferiores afectando la respiración y los reflejos espinales, hasta llegar a la intoxicación alcohólica que puede provocar un estado de coma. El cuerpo humano sólo puede metabolizar de 10 a 15 ml de alcohol por hora, ya que concentraciones mayores se consideran letales¹⁶.

A nivel psicológico, las dosis bajas producen la sensación de elevar el estado de ánimo y relajar a la persona. A nivel físico, un poco de alcohol aumenta la frecuencia cardíaca, dilata los vasos sanguíneos, irrita el sistema gastrointestinal, estimula la secreción de jugos gástricos y la producción de orina. Las dosis medias alteran el habla, el equilibrio, la visión y el oído. Se tiene una sensación de euforia y se pierde la coordinación motora fina, por lo que ya no es aconsejable conducir un automóvil ni manejar cualquier tipo de maquinaria. En dosis altas, los síntomas anteriores se agudizan y se alteran las facultades mentales y del juicio. Si el individuo continúa bebiendo puede ocurrir una pérdida del control motor en la que se requiere ayuda para poder moverse y hay una evidente confusión mental.

A partir de una concentración sanguínea equivalente a beber más de 10 tragos sin descanso alguno, puede ocurrir una intoxicación severa; cualquier otro aumento en las concentraciones puede provocar desde inconsciencia hasta coma profundo y muerte por depresión respiratoria¹⁷.

b. Metabolismo del etanol

Los estudios sobre la farmacocinética del etanol comenzaron durante la década del 30, luego que estuvieron disponibles métodos confiables para su análisis cuantitativo en fluidos corporales. Posteriormente, con el uso de técnicas enzimáticas específicas para analizarlo se descubrió que la fase posterior a la absorción sigue el modelo de Michaelis-Menten; la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) presenta una constante de Michaelis-Menten (K_m) baja y se satura luego de una ingesta moderada de alcohol. En consecuencia, el índice de desaparición del etanol en sangre se vuelve independiente de su concentración en sangre (cinética de orden cero); en estas condiciones, el área bajo la curva de la concentración de etanol en función del tiempo tiene en proporción un aumento mayor al de la dosis administrada. Además, la concentración en que el etanol alcanza las enzimas hepáticas resulta el determinante de la disponibilidad sistémica¹¹.

Diversos factores experimentales y psicológicos explican la amplia variación individual y entre sujetos en la concentración máxima de etanol en sangre después de ingerir una dosis estándar. La clase de bebida alcohólica consumida influye en la velocidad de absorción intestinal y todas ellas presentan en su composición azúcares, los cuales tienden a retrasar la velocidad de vaciamiento gástrico.

La composición corporal es importante en la disposición equilibrada de etanol entre la sangre y diversos compartimientos; debido a que se

distribuye en el total de agua del cuerpo, las diferencias de sexo, edad y peso tendrán influencia en su perfil de concentración en función del tiempo.

Las principales enzimas responsables del metabolismo del etanol se encuentran bajo control genético, y en estudios anteriores se han informado diferencias raciales en la velocidad máxima ($V_{m\acute{a}x}$) y en el K_m para las diversas isoenzimas de la ADH. Cuando la ingestión de etanol es elevada (más de 100 mg/día) es importante la contribución de la isoenzima del citocromo P450 microsomal (CYP2E1); esta enzima es inducible luego de una continua exposición al sustrato, lo que provoca depuración acelerada del etanol en la sangre de alcohólicos¹⁸.

Conceptos farmacocinéticos básicos

Unión a proteínas plasmáticas

El etanol no presenta unión a proteínas plasmáticas ni a tejidos, y no parece interferir en la interacción de otros componentes con dichas proteínas.

b.1 Absorción

Velocidad de Absorción

Luego de la administración oral, el etanol es absorbido en un 20 % en el estómago y el 80 % restante en el intestino delgado por difusión pasiva; luego de su ingesta, la absorción comienza en forma inmediata a su llegada al estómago, y se ha propuesto que este

órgano es el sitio principal de absorción cuando el alcohol es ingerido junto con alimentos. Las diferencias en la velocidad de vaciado gástrico influyen en el perfil de concentración en función del tiempo y en los parámetros cinéticos cuando el sujeto bebe dosis estándar de etanol. Otros factores que influyen en el vaciado gástrico son la cantidad y composición de los alimentos, cambios diurnos en la concentración de glucosa, si el individuo fuma y si se medica con drogas como la ranitidina o la eritromicina¹⁸.

Biodisponibilidad

La biodisponibilidad tiene gran relación con la velocidad de absorción, especialmente a dosis bajas de etanol; en este caso, existe un evidente metabolismo de primer paso. Esto se nota especialmente en individuos que han consumido alimentos dentro de la hora de beber alcohol.

Estudios anteriores demostraron que el metabolismo de primer paso es muy sensible a la velocidad de distribución hepática del etanol; se comprobó que disminuye al aumentar la dosis ingerida.

Hace aproximadamente 10 años existía un interés considerable en la existencia de un importante metabolismo de primer paso del etanol a nivel gástrico; diversos estudios determinaron la presencia de la ADH de clase IV en la mucosa gástrica. Hasta el presente, no existe consenso entre los investigadores sobre el papel del tracto gastrointestinal o del hígado en el metabolismo del primer paso del

etanol. Pero considerando la gran cantidad de enzimas metabolizadoras del etanol disponibles en el hígado en comparación con la mucosa gástrica, parece lógico aceptar que la ADH hepática tiene el papel principal en el metabolismo del etanol¹⁸.

b.2 Distribución

El etanol presenta una cinética de dos compartimientos, y su velocidad de distribución depende de factores que gobiernan la circulación periférica. Un aumento en el flujo sanguíneo periférico produce menor concentración máxima, y los cambios repentinos en él pueden originar modificaciones abruptas en la concentración sanguínea de etanol por un incremento en el flujo desde los compartimientos periféricos hacia el central.

El volumen de distribución del etanol es determinado por el total de agua corporal, y un aumento del primero produce una disminución en la concentración máxima de etanol. Los factores que influyen en el total de agua corporal, como el peso total y el porcentaje de grasas corporales, también determinan el volumen de distribución del etanol¹⁸.

b.3 Metabolismo

Entre 95% y 98% del etanol ingerido es metabolizado; el paso limitante parece ser la reoxidación del NADH a NAD⁺, el cual actúa como coenzima para la conversión de etanol a acetaldehído y de éste a acetato mediante las enzimas alcohol y aldehído deshidrogenasas.

Las últimas presentan polimorfismo, y se registra gran variabilidad racial y étnica en su actividad enzimática. Cuando se ingiere una dosis moderada de etanol, éste es eliminado siguiendo una cinética de orden cero, mientras que la ADH se satura luego de haber bebido cantidades mínimas. Otras enzima que interviene en el metabolismo del alcohol es la CYP2E1 microsomal, la cual es inducible y aumenta la depuración del etanol en grandes bebedores, por lo que tiene un efecto opuesto al de la eliminación limitada. Por otra parte, los alimentos incrementan la velocidad de metabolismo del etanol mediante el aumento en la actividad enzimática¹⁸.

4.5 ENFERMEDADES RELACIONADAS CON EL CONSUMO EXCESIVO DE BEBIDAS REFRESCANTES:

a. Riesgo de retraso del crecimiento por consumo excesivo de zumos de frutas

En un estudio observacional transversal, la ingestión de más de 360 ml diarios de zumos de frutas en niños de 2 a 5 años se asociaba con talla baja y obesidad¹⁹. Además, el consumo excesivo de zumos se ha considerado un factor de riesgo de fracaso de crecimiento no orgánico²⁰. Sin embargo, en estudios longitudinales de 3 a 5 años²¹ y de 2 a 3 años de edad²² no se demostró ninguna alteración en el crecimiento. Por tanto, probablemente se necesiten más estudios para aclarar esta posible relación.

b. Riesgo de diarrea por alteración de la absorción de los hidratos de carbono por consumo excesivo de zumos de fruta

Los hidratos de carbono más comúnmente presentes en los zumos de fruta natural son la glucosa, fructosa, sacarosa y sorbitol. La sacarosa es hidrolizada a glucosa y fructosa en el intestino delgado por acción de la sacarasa- isomaltasa. Mientras la glucosa es absorbida en el borde en cepillo del intestino delgado por un mecanismo de transporte activo (SGLT-1) acoplado al sodio, la fructosa lo hace por un mecanismo facilitado por una molécula transportadora GLUT5²³, de modo que se absorbe con mayor rapidez si la fructosa y la glucosa son equimolares²⁴. El sorbitol es un hidrato de carbono que se absorbe por vía pasiva a un ritmo muy bajo, por lo que gran parte del mismo no es absorbido. Además, podría interferir en la absorción de fructosa.

Tanto la fructosa como el sorbitol no absorbidos en el intestino delgado llegan al colon, donde son fermentados por las bacterias intestinales produciendo hidrógeno, CO₂, ácidos propiónico, acético y butírico, lo que provoca meteorismo, flatulencia y dolor abdominal. La carga osmolar de los azúcares no absorbidos arrastra agua por efecto osmótico y es responsable de la diarrea, incluso de la diarrea crónica^{25,26}. Los zumos de frutas con mayor equilibrio en glucosa y fructosa son el zumo de uva y naranja. El zumo de piña, con mayor concentración de glucosa que fructosa, no plantea problemas de absorción. Sin embargo, los zumos de pera y de manzana contienen doble concentración de fructosa que de glucosa, por lo que pueden asociarse a malabsorción de fructosa si se

beben en grandes cantidades. En cuanto al contenido en sorbitol, quienes más lo contienen son el zumo de pera y el de manzana. Así pues, la diarrea crónica inespecífica puede ser favorecida por la excesiva ingesta de zumos de fruta ricos en sorbitol y/o con una relación fructosa-glucosa elevada²⁷. En resumen, y a la vista de estos estudios, puede afirmarse que en cantidades moderadas (10 ml/kg) ningún zumo de frutas planteará problemas de absorción en niños sanos²⁸. En cantidades elevadas los mejor tolerados deben ser los de piña y naranja y los de pera y manzana los peor tolerados.

c. Empleo inadecuado de las bebidas refrescantes y zumos de frutas en la diarrea aguda

En el manejo de la diarrea aguda es un pilar básico el empleo de una solución de rehidratación oral cuya composición para Europa ha sido preconizada por la European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition (ESPGHAN)²⁹. En este sentido, las bebidas refrescantes son inadecuadas por tener insuficiente glucosa, sodio y osmolaridad (es el caso de las colas *light* y las gaseosas) o por excesiva osmolaridad y elevada relación glucosa/sodio con sodio insuficiente para el grupo de las colas, tés y bebidas isotónicas³⁰. Tampoco los zumos de frutas son adecuados por el excesivo contenido en hidratos de carbono y escaso sodio, con lo que puede favorecer una hiponatremia y la malabsorción de hidratos de carbono³¹.

d. Empleo discutible de los zumos para el tratamiento del estreñimiento

La malabsorción de hidratos de carbono que puede resultar del uso excesivo de zumos parece servirles de argumento a algunos autores para recomendar el zumo como tratamiento del estreñimiento³².

e. Alergia a zumos de frutas

Aunque se ha atribuido a los zumos de frutas la posibilidad de desarrollar alergia en niños pequeños, ésta es muy infrecuente³³.

f. Interacciones farmacológicas de los zumos de frutas

El zumo de pomelo inhibe el citocromo P-450 (CYP3A4) localizado en el intestino y en el hígado, con lo que hay un retraso en la absorción y se reduce el efecto de primer paso en el metabolismo del midazolam, por lo que aumenta las concentraciones plasmáticas hasta en un 56 %. También altera la absorción de cisaprida, dextrometorfano, antagonistas del calcio y ciclosporina, por lo que no debe tomarse zumo de pomelo en combinación con estos fármacos³⁴⁻³⁶.

El zumo de naranja aumenta, así mismo, la biodisponibilidad del dextrome-torfano por el mismo mecanismo³⁴.

g. Consumo de bebidas blandas y riesgo de sobrepeso y obesidad

El incremento notable de la prevalencia de obesidad experimentado en las últimas décadas se ha definido como una pandemia o enfermedad

mundial. Es en niños y adolescentes donde el aumento del porcentaje de ellos con exceso de peso y obesidad ha sido más manifiesto, convirtiéndose en el problema médico más común en la edad pediátrica^{37,38}. Así en Estados Unidos el incremento de la prevalencia de la obesidad en niños y adolescentes ha sido del 100 % entre 1980 y 1994³⁷.

h. Dislipemia y bebidas blandas

Algunos estudios en adultos sugieren que el consumo de zumos y bebidas azucaradas provocan cambios metabólicos en el perfil lipoproteico que conducen a dislipemia aterogénica, caracterizada por una elevación de los triacilglicéridos, de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) pequeñas densas y una disminución de las de alta densidad (HDL)^{39, 40}.

i. Alteración del metabolismo de la glucosa y bebidas blandas

Un estudio en adolescentes pone de manifiesto que el consumo regular de bebidas blandas que contienen hidratos de carbono induce un incremento de las concentraciones de glucosa e insulina una hora después de haberlo consumido. Esta respuesta de la insulina está linealmente correlacionada con el IMC, pudiendo establecerse un círculo vicioso entre bebidas densas en energía, incremento de IMC y respuesta insulínica⁴¹.

4.6 ESTUDIOS PREVIOS

En Perú no se han realizado estudios acerca de la presencia y cuantificación de etanol en bebidas refrescantes u otros productos, como componente de los mismos. El único trabajo relacionado a bebidas refrescante se realizó en la Universidad Antenor Orrego de Tacna, el cual puso de manifiesto ciertas características físico-químicas y microbiológicas de este tipo de bebida resaltando su aporte energético y nutritivo en comparación con las bebidas alcohólicas⁴².

El estudio más reciente relacionado sobre el tema fue realizado como trabajo de investigación por P. Varó y C. Guillen en España (2000), en el cual se determinó la cantidad de etanol en 16 bebidas correspondientes a siete marcas diferentes de cuatro grupos de bebidas refrescantes: aromáticas, de extractos, zumos de fruta y para diluir, y se estableció que el contenido alcohólico en todas las muestras analizadas está por debajo del 0.5 % vol., por lo que todas cumplen con las normas de calidad establecidas en España para este tipo de productos (1 % vol.). Este estudio se tomó como base de la metodología analítica para la determinación de alcoholes por enzimoimmunoanálisis⁴³.

Pastor P. y et al (2000) realizó un análisis del contenido de etanol entre las denominadas bebidas "Sin alcohol" en España y concluyó que ninguna de las bebidas analizadas incumple con la normativa vigente, ya que no se encontró bebida alguna que exceda el 1% vol. en contenido de etanol⁴⁴.

Villaamil y et. al (2005) realizaron una extensa investigación, sobre la determinación cuantitativa de alcohol etílico y metílico en bebidas no alcohólicas, en jugos de frutas y vegetales y concluyó que aunque las concentraciones de etanol halladas en los jugos se hallan por debajo del límite máximo establecido en el Codex Alimentarius Argentino (0.5 % v/v) y en el Codex Alimentarius (3-5 g/Kg) su presencia es significativa^{45,46}.

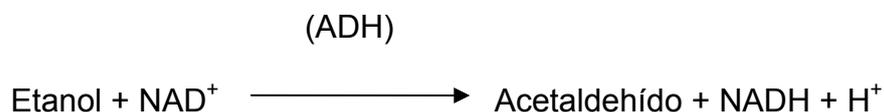
V. PARTE EXPERIMENTAL

5.1 METODOLOGÍA DEL ANÁLISIS DEL ETANOL POR ESPECTROFOTOMETRÍA ENZIMÁTICA

La utilización de métodos enzimáticos en el análisis de alimentos es muy conocida^{47,16} y su aplicación para la determinación de etanol en bebidas de bajo contenido alcohólico ha sido recomendada por varios autores^{17,18,48}.

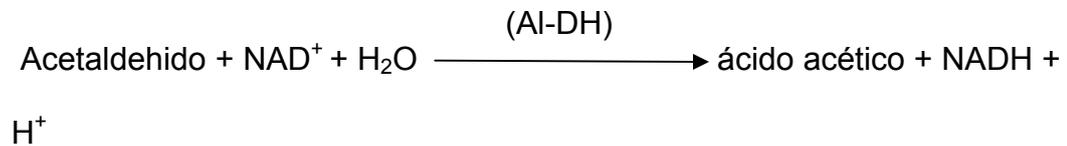
Los métodos enzimáticos son los más utilizados para la determinación de alcohol en alimentos⁴³, los cuales son bastantes específicos. Si bien existe cierta reacción con otros alcoholes como propanol y butanol, esta interferencia usualmente carece de importancia clínica. Sin embargo, debido a su especificidad, este método no detecta la presencia de otros alcoholes. Estos procedimientos ofrecen una sensibilidad adecuada para las mediciones clínicamente significativas⁴⁹.

La cuantificación del etanol por el método de espectrofotometría enzimática requiere dos reacciones enzimáticas, la primera reacción está catalizada por el alcohol deshidrogenasa (ADH), en la que el etanol se oxida en acetaldehído por dinucleótido nicotinamida-adenina (NAD⁺)⁵⁰.



Sin embargo, dado que el equilibrio de la reacción se produce a favor del etanol y NAD⁺, se requiere otra reacción para atrapar los productos. Esto se

consigue por oxidación cuantitativa del acetaldehído en ácido acético en presencia de aldehído deshidrogenasa (Al-DH) y NAD^+ ⁵⁰



La cantidad de NADH que se forma en esta reacción es estequiométrica con dos veces la cantidad de etanol. Lo que se mide es el NADH por el incremento en la absorción a 340 nm ⁵¹.

La reacción produce la oxidación del alcohol a acetaldehído con la consiguiente reducción de la coenzima dinucleótido de nicotinamida adenina (NAD) a NADH. La coenzima reducida puede ser medida directamente a 340 nm ⁴⁶.

5.2 MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1. Universo

Bebidas refrescantes de mayor consumo en Lima Metropolitana.

5.2.2. Muestra

Muestras de cuatro grupos de bebidas refrescantes: bebidas gasificadas jarabeadas (gaseosas), refrescos líquidos, néctares de fruta, otras bebidas (rehidratantes y especiales) y bebidas instantáneas en polvo tomadas aleatoriamente de los supermercados de Lima Metropolitana, por ser de gran demanda poblacional.

5.2.3. Medios

5.2.3.1 Recursos materiales

Equipo:

- Espectrofotómetro UV/Visible Hewlett Packard
- Balanza analítica

Materiales

- Micropipeta de 10, 50 y 100 μL
- Embudo de vidrio
- Gradilla
- Tubos de ensayo de vidrio con tapa rosca
- Cubetas de plástico desechables UV-Visible
- Papel filtro Whatman No. 9
- Papel parafinado
- Pizetas

Reactivos

- Kit enzimático de Megazyme para la determinación de etanol
- Tiras indicadores de pH
- Agua destilada
- Hidróxido de sodio 2 N
- Carbón activado

5.2.4. Método

Para la cuantificación de etanol se utilizó el Kit de Megazyme, que se basa en un método enzimático utilizando alcohol deshidrogenasa que oxida al etanol a acetaldehído, el cual se acopla al aldehído deshidrogenasa, formándose NADH que se mide a 340 nm. Cada una de las muestras fue analizada por triplicado.

5.3 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

5.3.1 Preparación de la muestra:

Las muestras se trataron directamente, sin dilución previa debido a su bajo contenido de etanol. Dependiendo del tipo de muestra, se procedió de la siguiente manera:

- Muestras ácidas: Se debe aumentar el pH de la solución a 9.0 aproximadamente utilizando NaOH 2 M.
- Muestras gasificadas: Se desgasifican aumentando el pH a aproximadamente 9.0 con NaOH 2 M.
- Muestras muy coloreadas: Se tratan con carbón activado 0.2 g por cada 10 mL de muestra. Filtrar con papel Whatman.

5.3.2 Composición del kit de Megazyme:

BOTELLA 1: Tampón de pirofosfato de potasio (15 mL, 1.5 M, pH 9,0) más azida de sodio 0,02 % (w/v) como conservante. Estabilidad > 2 años a 4 °C.

BOTELLA 2: NAD⁺ (155 mg). Estable durante >5 años a -20 °C.

BOTELLA 3: Suspensión aldehído deshidrogenasa (Al-DH) (1,3 mL, 15 U/mL). Estable durante > 2 años a -20 °C.

BOTELLA 4: Suspensión de alcohol deshidrogenasa (ADH) (1,3 mL, 167 U/mL). Estable durante > 2 años a 4 °C.

BOTELLA 5: Solución de etanol estándar (5 mL, 5 mg/mL). Estable en un contenedor bien sellado (según se entrega) durante > 2 años a 4 °C.

5.3.3 Preparación de las soluciones/suspensiones de reactivos

- Use el contenido de la botella 1 según se suministra. Estable durante > 2 años a 4 °C.
- Diluya el contenido de la botella 2 en 12,4 mL de agua destilada. Divídala en partes alícuotas del tamaño adecuado y guárdelas en tubos de polipropileno a -20 °C entre uso y uso y fresco mientras se está usando, si es posible. Estable durante > 2 años a -20 °C.
- Use el contenido de la botella 3 y 4 según se suministra. Antes de abrirla por primera vez, agite la botella para eliminar cualquier enzima que se pueda haber quedado en el tapón de goma. De manera que almacene las botellas en la posición adecuada. Agite bien la botella para que se mezcle el contenido antes de utilizarla. Estable durante >2 años a 4 °C (ADH) o -20 °C (Al-DH).
- Diluya 0,5 mL del contenido de la botella 5 en 50 mL con agua destilada. Guárdelo en una botella Duran cerrada. Cuando se diluye, esta solución es estable durante 2 días a 4 °C.

5.3.4 Condiciones del procedimiento:

Longitud de onda: 340 nm

Cubeta: paso de luz de 1 cm (vidrio o plástico con tapa)

Temperatura: ~ 20-25 °C

Volumen final: 2,54 mL

Solución de muestra: en 0,10 - 2,00 mL de volumen de muestra

Medir contra corriente de aire (sin cubeta en el paso de luz) o contra agua

Pipetear en cubetas:	Muestras sin tratar	Muestra
Agua destilada (~ 25 °C)	2,10 mL	2,00 mL
Muestra	-	0,10 mL
Sol. muestra 1 (tampón pirofosfato)	0,20 mL	0,20 mL
Solución 2 (NAD ⁺)	0,20 mL	0,20 mL
Susp. 3 (aldehído deshidrogenasa)	0,02 mL	0,02 mL
Mezcla*, lea la absorción de las soluciones (A ₁) transcurridos aprox. 2 min e inicie las reacciones añadiendo:		
Susp. 4 (alcohol deshidrogenasa)	0,02 mL	0,02 mL
Mezcla*, lea la absorción de las soluciones (A ₂) al final de la reacción (aprox. 5 min.).		

5.4. CÁLCULOS

$$\% \text{ etanol} = \frac{V \times 46.07}{6300 \times 1.0 \times v \times 2} \times 0.1266 \times \Delta A \text{ etanol}$$

Donde:

V = Volumen final (mL)

v = Volumen de muestra (mL)

$$\Delta A \text{ etanol} = [(Absorbancia \text{ de la muestra } 5') - (Absorbancia \text{ de la muestra } 2')] - [(Absorbancia \text{ de la muestra sin tratar } 5') - (Absorbancia \text{ de la muestra sin tratar } 2')]$$

* Debido a que la muestra no ha sido diluida durante la preparación, el resultado no se multiplicó por el factor de dilución.

5.5. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

El trabajo de tesis se basa en una investigación descriptiva y transversal.

5.1 Diseño estadístico de la investigación:

5.1.1 Diseño del Muestreo: Se analizaron diez muestras de cuatro diferentes tipos de bebidas refrescantes, por triplicado, para hacer un total de 120 análisis. Las 40 muestras se tomaron en un muestreo no probabilístico, en los supermercados de Lima Metropolitana.

5.2 Diseño experimental:

Se determinó y cuantificó la presencia de etanol en las bebidas bajo estudio, midiendo la absorbancia en el estándar y en las muestras.

5.2.1 Análisis Estadístico: Se determinó la absorbancia, por cada bebida refrescante estudiada.

5.2.2 Análisis de Datos: Se determinó por cada una de las 40 bebidas refrescantes, la existencia o ausencia de etanol.

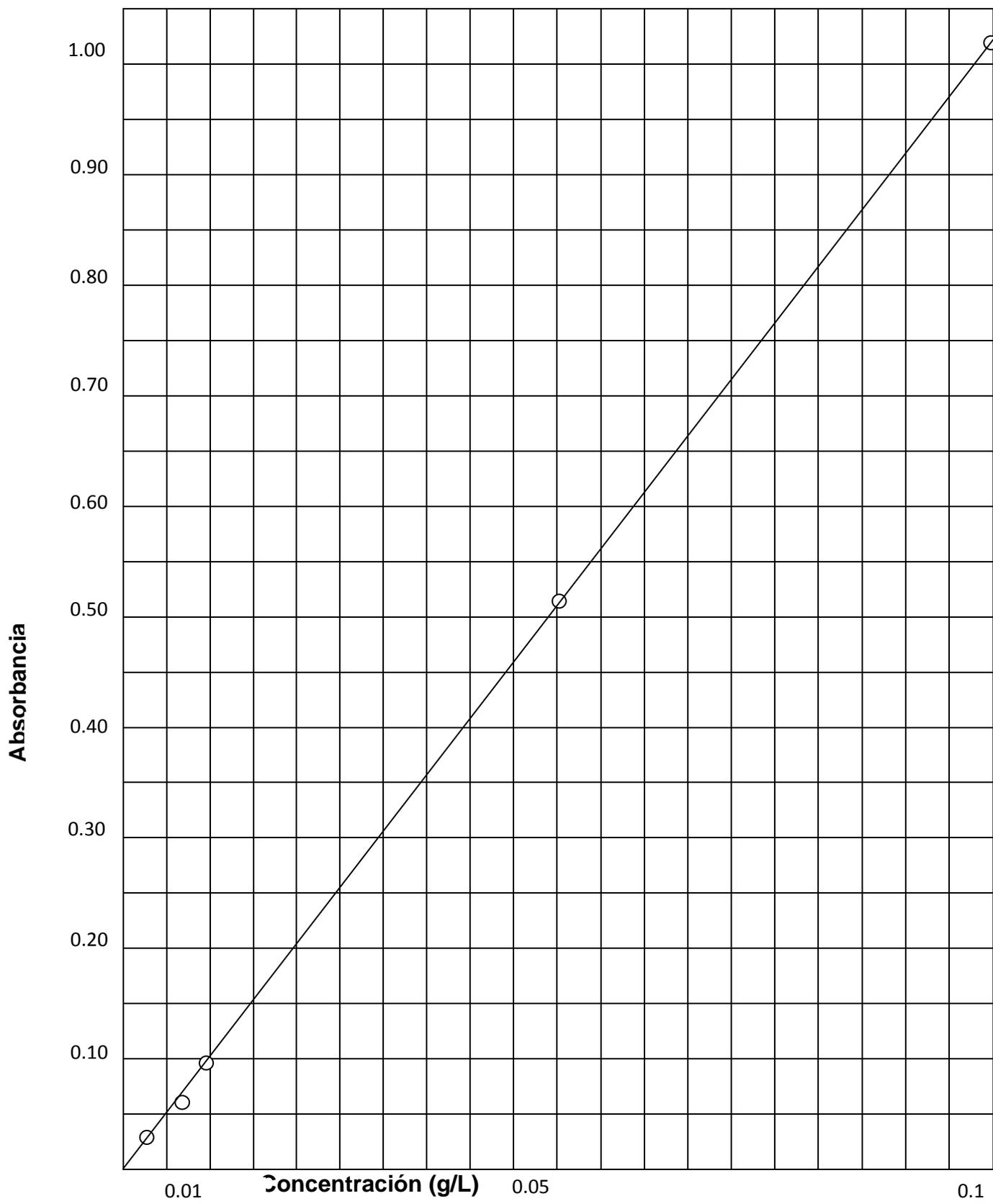
5.6. CURVA DE CALIBRACIÓN:

Por lo general, para el análisis mediante espectrofotometría UV-Visible es posible preparar curvas de calibración “permanentes”. Esto se refiere a que una curva de calibración puede usarse con varios lotes de análisis, durante varios meses. Sin embargo, se recomienda elaborarla cada vez que se cambien o preparen reactivos.

- Con bureta medir exactamente 0.025, 0.05, 0.1, 0.5, 1 ml de la solución estándar preparada (botella 5, 5mg/mL) y pasarlos a una fiola de 50 ml, diluir con agua (pueden usarse fiolas mas grandes tomando alícuotas proporcionales). Nota: las soluciones finales presentan una concentración de 0.0025, 0.005, 0.01, 0.05 y 0.1 g/L respectivamente.
- Realizar el procedimiento normal como si la solución estándar fuese la muestra problema con cada una de las concentraciones preparadas.
- Medir la absorbancia a 340 nm.
- Graficar la absorbancia en función de la concentración a la longitud de onda de análisis.

CONCENTRACION (g/L)	ABSORBANCIA
0.0025	0.026
0.005	0.053
0.01	0.10
0.05	0.53
0.1	1.07

Gráfico 1: Curva de calibración de estándares



VI. RESULTADOS

CUANTIFICACIÓN DE ETANOL EN BEBIDAS REFRESCANTES DE MAYOR CONSUMO EN LIMA METROPOLITANA

Tabla 8. Concentración de etanol en aguas gasificadas jarabeadas (gaseosas)

Muestra No.	Absorbancia	Concentración de etanol (g/L)	Concentración de etanol (%)
1	0.41550		
	0.40059		
	0.42030		
Promedio	0.41	0.039	0.0049
2	0.03180		
	0.05479		
	0.04256		
Promedio	0.04	0.0038	0.00048
3	0.05235		
	0.03117		
	0.04284		
Promedio	0.04	0.0038	0.00048
4	1.5590		
	1.5745		
	1.5482		
Promedio	1.56	14.7	1.86
5	0.96746		
	0.89863		

	0.92483		
Promedio	0.93	0.088	0.011
6	0.00412		
	0.00352		
	0.00521		
Promedio	0.0004	0.000038	0.0000048
7	2.34684		
	2.40507		
	2.58634		
Promedio	2.44	0.23	0.029
8	0.11025		
	0.07089		
	0.09748		
Promedio	0.09	0.0085	0.001
9	1.58723		
	1.28764		
	1.48629		
Promedio	1.45	0.14	0.018
10	0.85691		
	1.07823		
	0.98618		
Promedio	0.97	0.09	0.011

Gráfico 2. Concentración de etanol en aguas gasificadas jarabeadas

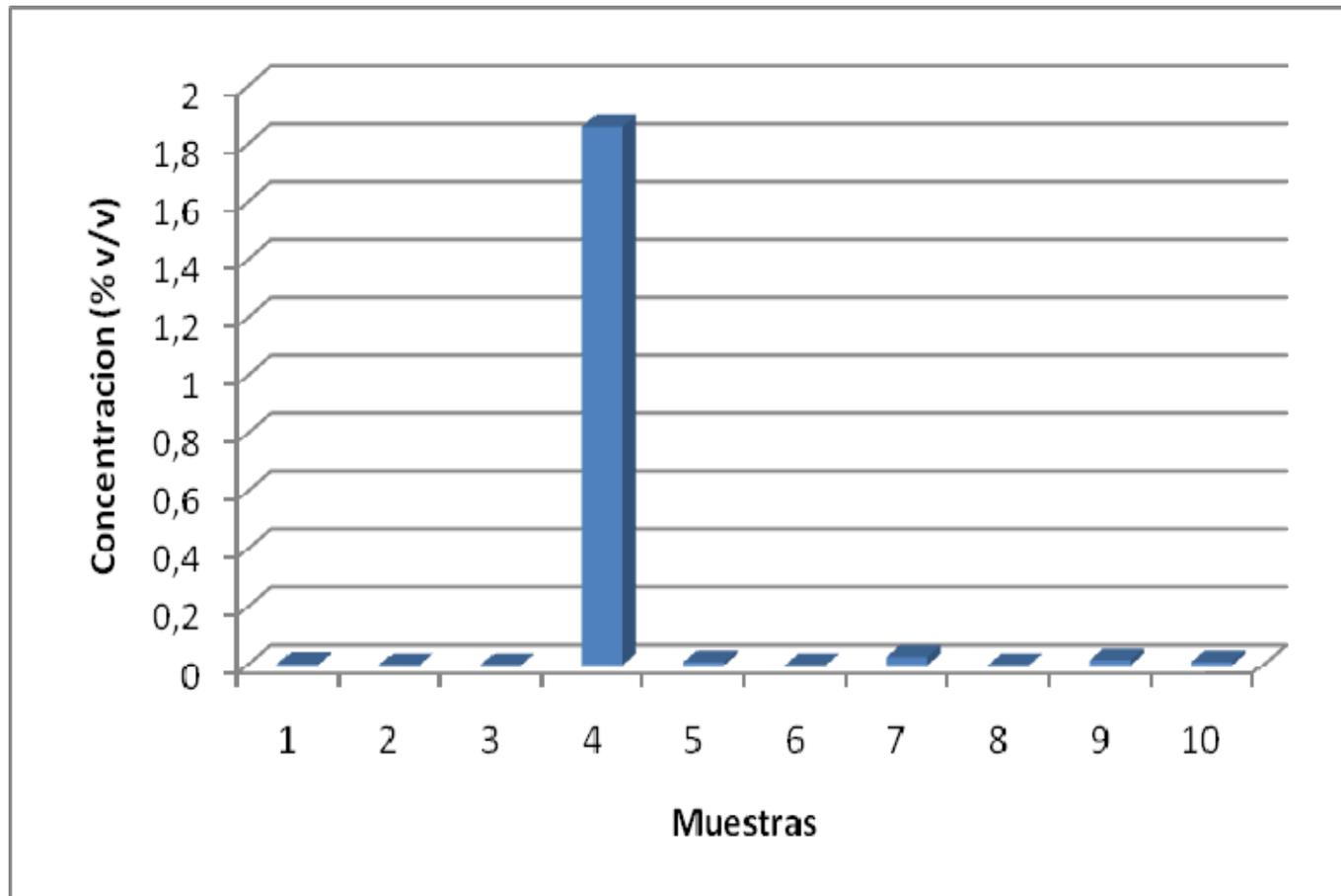


Tabla 9. Concentración de etanol en refrescos líquidos

Muestra No.	Absorbancia	Concentración de etanol (g/L)	Concentración de etanol (% v/v)
11	1.4010		
	1.4140		
	1.3986		
Promedio	1.39	13.11	1.66
12	2.41630		
	2.29700		
	2.38610		
Promedio	2.37	22	2.79
13	2.50440		
	2.36680		
	2.44862		
Promedio	2.44	23	2.91
14	1.38868		
	1.05780		
	1.14862		
Promedio	1.20	0.11	0.014
15	1.15248		
	1.13918		
	1.08479		
Promedio	1.13	10.65	1.35
16	1.71194		
	1.69275		

	1.73276		
Promedio	1.71	16.13	2.04
17	0.20125		
	0.19458		
	0.18795		
Promedio	0.19	0.018	0.0023
18	0.42152		
	0.49412		
	0.46782		
Promedio	0.46	0.043	0.0054
19	0.03569		
	0.04967		
	0.03896		
Promedio	0.04	0.0038	0.00048
20	0.06782		
	0.07185		
	0.06178		
Promedio	0.06	0.0057	0.00072

Gráfico 3. Concentración de etanol en refrescos líquidos

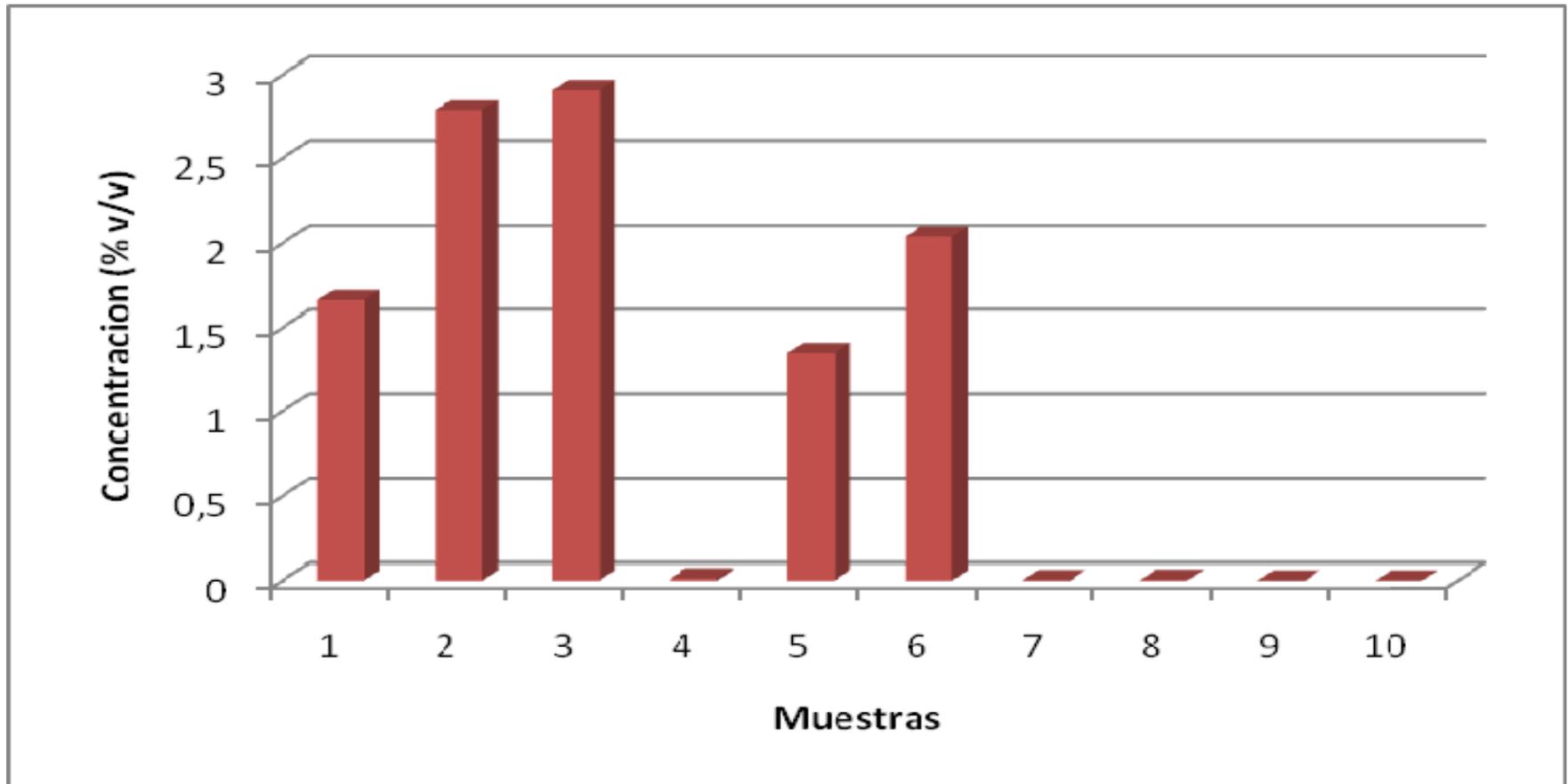


Tabla 10. Concentración de etanol en néctares (zumos de fruta)

Muestra No.	Absorbancia	Concentración de etanol g/L)	Concentración de etanol (%)
21	0.45800		
	0.43080		
	0.39482		
Promedio	0.43	0.04	0.0051
22	0.06021		
	0.11086		
	0.08962		
Promedio	0.09	0.0085	0.0011
23	0.00658		
	0.00586		
	0.00489		
Promedio	0.005	0.00047	0.00006
24	0.04708		
	0.04154		
	0.04098		
Promedio	0.04	0.0038	0.00048
25	0.15824		
	0.20485		
	0.18942		
Promedio	0.18	0.017	0.0022

Gráfico 4. Concentración de etanol en néctares de fruta

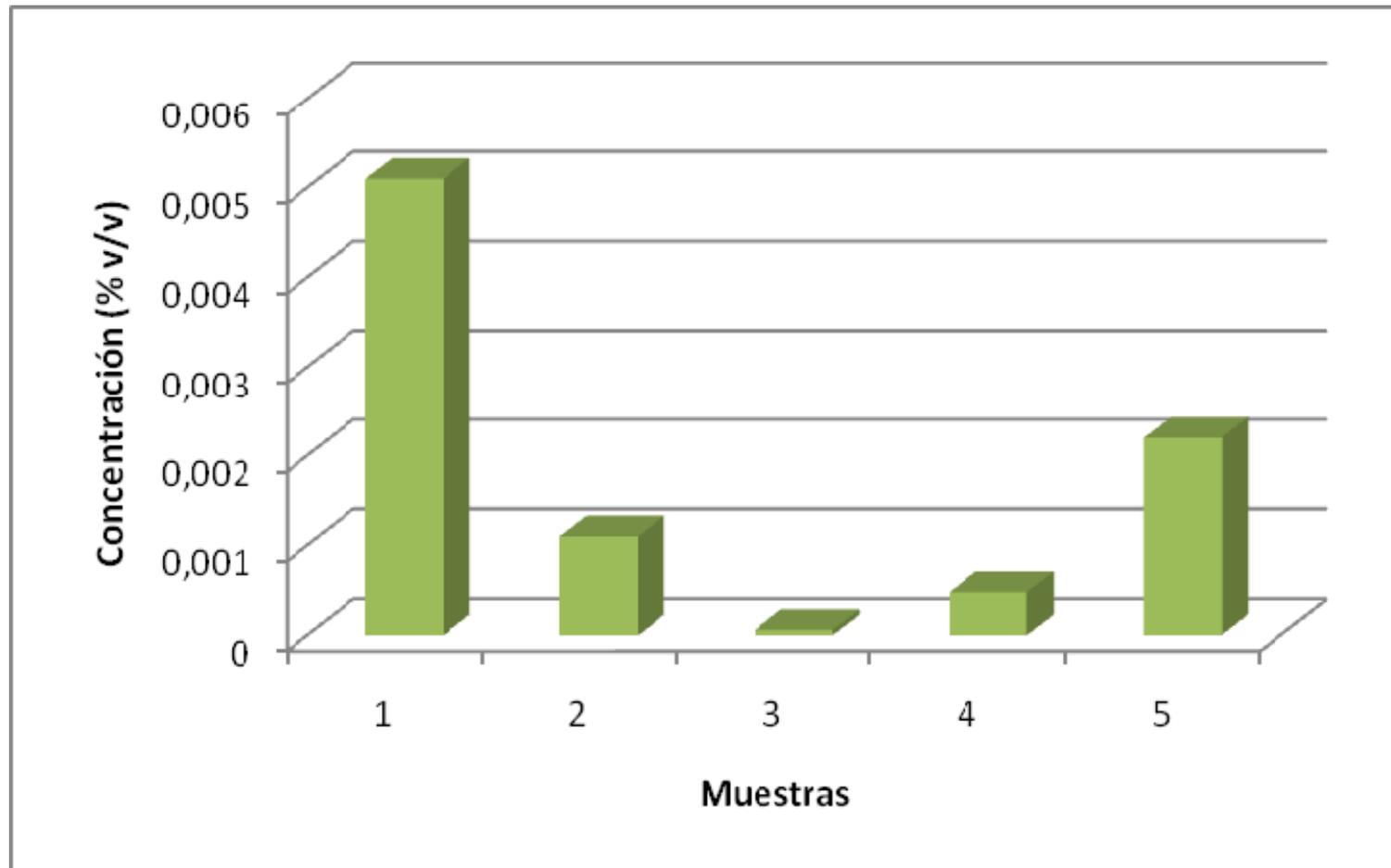


Tabla 11. Concentración de etanol en otras bebidas (rehidratantes y especiales)

Muestra No.	Absorbancia	Concentración de etanol (g/L)	Concentración de etanol (%)
26	0.00972		
	0.00785		
	0.00896		
Promedio	0.008	0.00075	0.000095
27	0.08344		
	0.07595		
	0.07822		
Promedio	0.08	0.0075	0.00095
28	0.05962		
	0.07824		
	0.06892		
Promedio	0.07	0.0066	0.00084
29	0.00864		
	0.00999		
	0.00942		
Promedio	0.009	0.00085	0.00011
30	0.02864		
	0.03485		
	0.02978		
Promedio	0.03	0.0028	0.00035

Gráfico 5. Concentración de etanol en bebidas rehidratantes y especiales

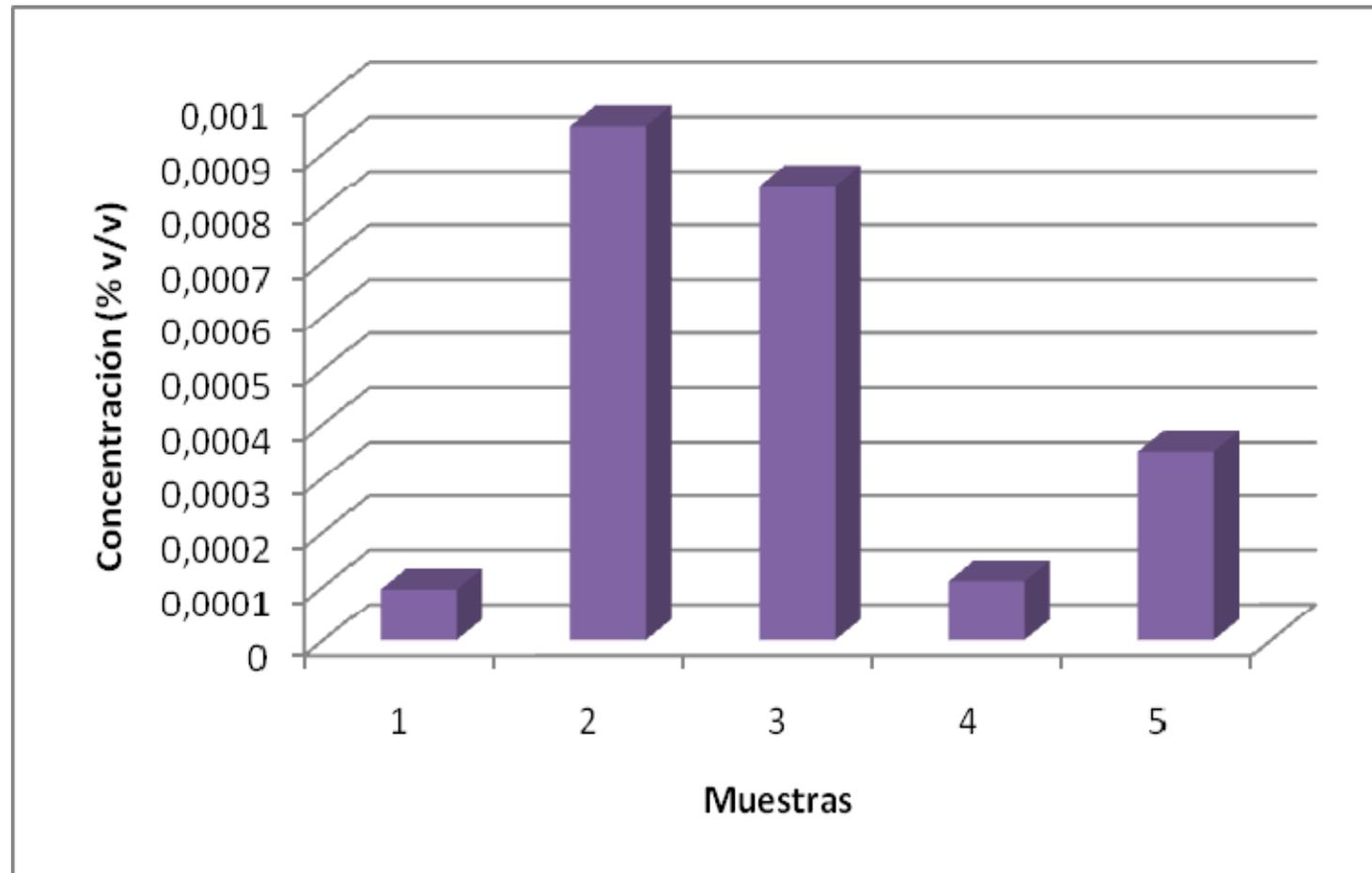


Tabla 12. Concentración de etanol en bebidas instantáneas en polvo

Muestra No.	Absorbancia	Concentración de etanol (g/L)	Concentración de etanol (%)
31	2.01740		
	2.03062		
	2.02896		
Promedio	2.03	19.15	2.42
32	0.00340		
	0.02930		
	0.01782		
Promedio	0.02	0.0019	0.00024
33	0.03275		
	0.02680		
	0.04895		
Promedio	0.04	0.0038	0.00048
34	0.01625		
	0.00550		
	0.00985		
Promedio	0.01	0.00094	0.00012
35	2.07143		
	2.08268		
	2.04856		
Promedio	2.07	19.53	2.47
36	2.00638		
	2.00619		

	2.00598		
Promedio	2.00	18.87	2.39
37	0.07265		
	0.07062		
	0.06924		
Promedio	0.07	0.0066	0.0089
38	0.05930		
	0.48598		
	0.29873		
Promedio	0.28	0.026	0.0033
39	0.00874		
	0.00486		
	0.00684		
Promedio	0.006	0.00057	0.000072
40	1.56875		
	1.57860		
	1.60596		
Promedio	1.58	15.00	1.89

Gráfico 6: Concentración de etanol de bebidas instantáneas en polvo

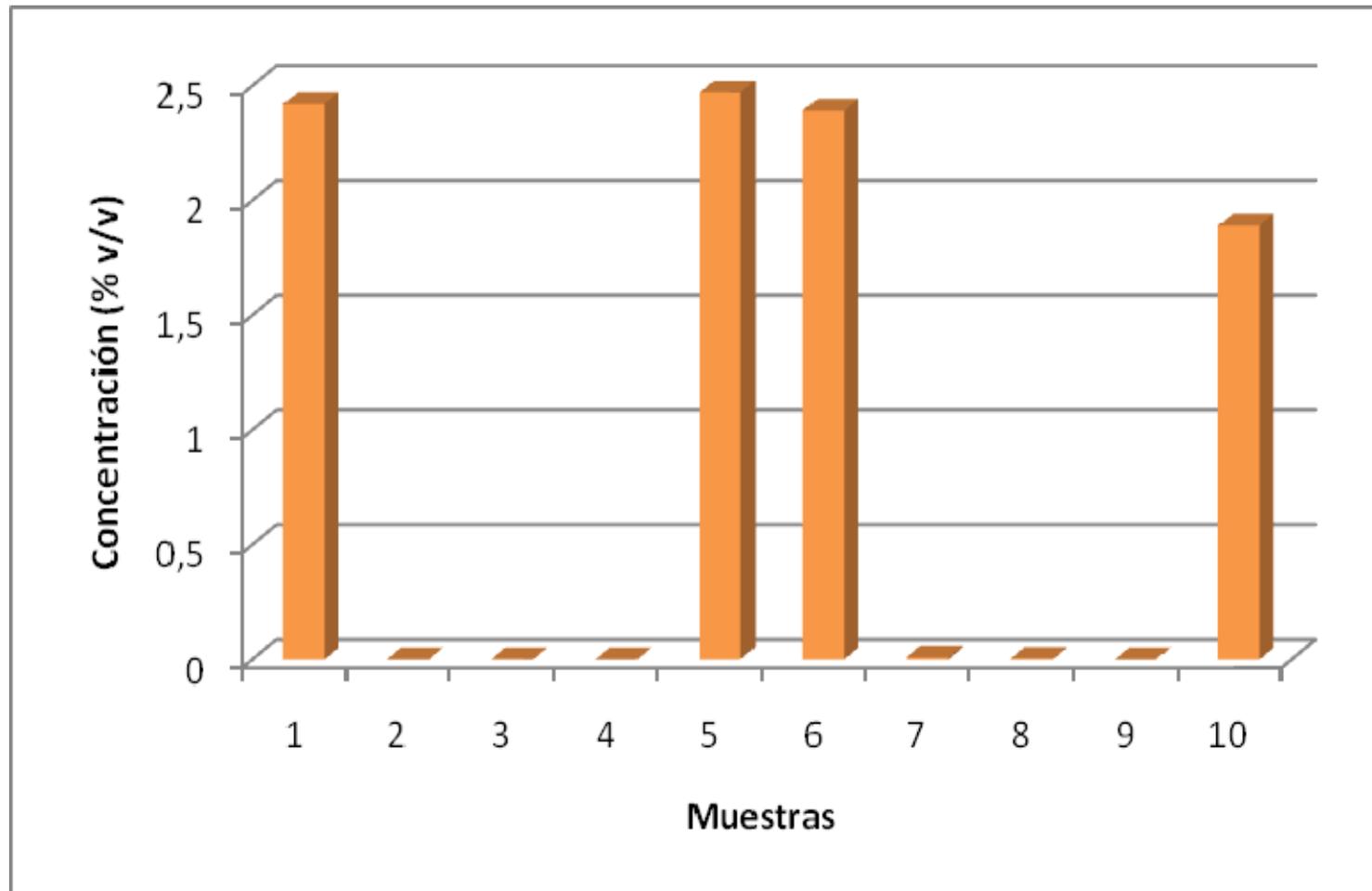


TABLA 13. Cumplimiento del Reglamento Técnico Sanitario Español y la NTP 214.001 de las muestras de bebidas refrescantes evaluadas por espectrofotometría (< 0.5% V/V)

MUESTRA	NORMA
1	Cumple
2	Cumple
3	Cumple
4	No Cumple
5	Cumple
6	Cumple
7	Cumple
8	Cumple
9	Cumple
10	Cumple
11	No Cumple
12	No cumple
13	No cumple
14	Cumple
15	No Cumple
16	No Cumple
17	Cumple
18	Cumple
19	Cumple
20	Cumple
21	Cumple
22	Cumple

23	Cumple
24	Cumple
25	Cumple
26	Cumple
27	Cumple
28	Cumple
29	Cumple
30	Cumple
31	No Cumple
32	Cumple
33	Cumple
34	Cumple
35	No Cumple
36	No Cumple
37	Cumple
38	Cumple
39	Cumple
40	No Cumple

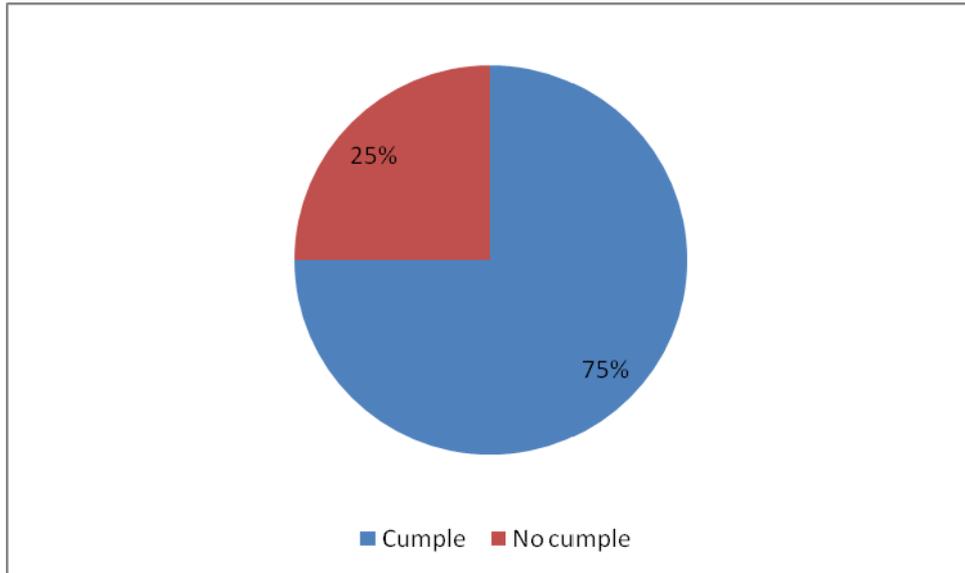


Gráfico 7. Evaluación del Cumplimiento del Reglamento Técnico Sanitario de España para bebidas refrescantes y la NTP 214.001

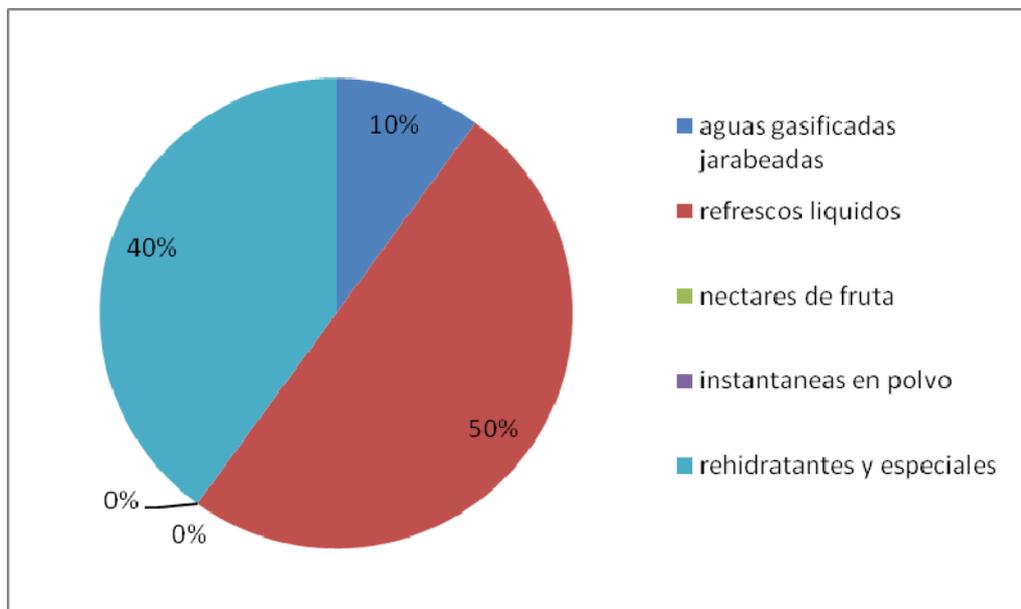


Gráfico 8. No Cumplimiento del Reglamento Técnico Sanitario de España para bebidas refrescantes y la NTP 214.001 de acuerdo al tipo de bebida refrescante analizada

VII. DISCUSIÓN

El presente trabajo de investigación tuvo como finalidad la determinación de etanol en bebidas refrescantes de Lima Metropolitana, encontrándose que algunas muestras analizadas presentan concentraciones de etanol muy por encima de los límites establecidos en Normativas de otros países como el Reglamento español para bebidas refrescantes y la Norma Técnica Peruana 214.001 específica para bebidas gasificadas jarabeadas. Su presencia hace evidente el riesgo de contaminación microbiológica y la aparición de efectos indeseables que trae consigo el consumo continuo de estas bebidas en niños y adolescentes, ya que no se elaboran bajo buenas prácticas de manufactura, ni con el consecuente control de calidad adecuado.

La normativa tomada como referencia para la comparación de resultados es la española, debido a que en Perú no se cuenta con ningún reglamento oficial referente al control de etanol en bebidas refrescantes; sin embargo, sí existe una Norma Técnica (NTP 214.001) que especifica su análisis sólo en las bebidas gasificadas jarabeadas, el cual es realizado eventualmente por el Centro Nacional de Control de Calidad del Instituto Nacional de Salud (INS).

La investigación fue realizada analizando 40 muestras de las bebidas refrescantes de mayor consumo de Lima Metropolitana, las cuales fueron agrupadas en: aguas gasificadas jarabeadas, refrescos líquidos, néctares de fruta, bebidas rehidratantes, bebidas especiales y bebidas instantáneas en polvo.

La concentración de etanol hallada en todas las muestras fue variable, desde 0.0000048% hasta un máximo de 2.91%. De todas las muestras analizadas, 25 % no cumplen con la normativa de referencia y 75 % sí cumple. A partir de estos resultados, se determinó que las bebidas analizadas con mayor porcentaje de etanol son los refrescos líquidos (50 %), las bebidas rehidratantes especiales (40 %) y las aguas gasificadas jarabeadas (10 %). En el caso de los néctares de frutas y bebidas instantáneas en polvo, la concentración de etanol está por debajo del límite establecido (<0.5 % v/v).

Goldberger *et al*⁵² reportan la presencia de etanol en bebidas no-alcohólicas en concentraciones entre 0,04 y 0,96 g/L correspondientes a 0,005 y 0,12 mL/dL.

En jugos frescos, pasteurizados, concentrados y esterilizados, Shaw PE *et al*⁵³ señalan concentraciones mínimas de etanol comprendidas entre 0,002 y 0,059 mL/dL y máximas entre 0,081 y 0,180 mL/dL. En los mismos jugos las concentraciones extremas de metanol fueron: mínimas entre 0,000 y 0,008 mL/dL y máximas entre 0,003 y 0,024 mL/dL.

Es sabido que el etanol es generado en los jugos por fermentación de la glucosa en presencia de levaduras (*Hansenula and Pichia*) y ciertos hongos (*Saccharomyces*) según lo describen Francis *et al*⁵⁴ y Kennes *et al*⁵⁵. La piel de la fruta es el habitat natural de levaduras y microorganismos, por lo cual es posible que por procesos de fermentación de los azúcares presentes en los jugos se genere etanol.

Según Pesis *et al*⁵⁶, las frutas una vez recolectadas suelen conservarse, antes de la obtención del jugo, y uno de los problemas observados es la acumulación de metabolitos indeseables.

Por lo cual, Trifiro *et al*⁵⁷ recomiendan realizar el análisis de alcoholes y otros compuestos volátiles, los cuales son indicadores de crecimiento microbiano, y resulta esencial para una mejor evaluación de la calidad del producto final.

Finalmente, debido a la cantidad de etanol encontrada en este tipo de bebidas, es necesario realizar un seguimiento, verificar su proceso de manufactura y velar por el cumplimiento de las buenas prácticas, así como el control de calidad necesario para salvaguardar la salud de los consumidores, principalmente niños y adolescentes.

VIII. CONCLUSIONES

1. El etanol se presentó a diferentes concentraciones como componente entre las 40 bebidas refrescantes de mayor consumo analizadas (bebidas jarabeadas, refrescos líquidos, néctares de fruta, bebidas rehidratantes y especiales). La concentración de etanol obtenida en las muestras fue variable, desde 0.0000048 % hasta un máximo de 2.91 %.
2. El 75 % de las bebidas refrescantes analizadas cumplen con las especificaciones de calidad para bebidas de su tipo tomando como referencia la Reglamentación técnico-sanitaria de bebidas refrescantes de España y la Norma Técnica Peruana 214.001 que establece 0.5 % v/v como el nivel máximo permitido de alcohol solamente para bebidas gasificadas jarabeadas; sin embargo, 25 % no cumplen con las especificaciones debido a la presencia de etanol dentro de su composición, lo que sería un indicador de contaminación microbiológica y/o de malas prácticas de manufactura, ya que por su clasificación pertenecen al rubro de bebidas sin alcohol (etanol).
3. En el caso de bebidas gasificadas jarabeadas (gaseosas), el 90% de las muestras analizadas cumplen con la NTP 214.001 que establece un límite máximo de 0.5% v/v de etanol.
4. Todas las muestras analizadas presentan etanol. Los mayores porcentajes de etanol se encontraron entre los refrescos líquidos (50 %), las bebidas rehidratantes especiales (40 %) y las aguas

gasificadas jarabeadas (10 %). En los néctares de frutas y bebidas instantáneas en polvo, el etanol está por debajo del límite establecido (<0.5 % v/v).

IX. RECOMENDACIONES

- I. Incluir la concentración de etanol como un parámetro fisicoquímico para la determinación de la calidad de las bebidas refrescantes (refrescos líquidos, néctares de fruta, bebidas instantáneas en polvo y bebidas rehidratantes y especiales) considerándose un límite máximo de 0.5% v/v.
- II. Por tratarse de una muestra pequeña no es posible generalizar los resultados obtenidos hacia todas las bebidas refrescantes de Perú, pero puede ser utilizada como una guía que encamine la realización de nuevas investigaciones que tomen en cuenta una mayor casuística para poder establecer un patrón de resultados más exacto.
- III. Establecer una correcta definición y clasificación de este tipo de bebidas de acuerdo a nuestra realidad económica, sociocultural y demográfica, tomando como referencia los Reglamentos Sanitarios de España y el Codex Alimentarius.
- IV. Realizar controles de calidad fisicoquímica por medio del Centro Nacional de Control de Calidad del Instituto Nacional de Salud (INS), de forma continua.
- V. Presentar los resultados obtenidos a las autoridades de Salud (Ministerio de Salud, DIGESA), como una contribución para la regulación y vigilancia en la producción y distribución de bebidas refrescantes.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Gerrior S, Putnam J, Bente L. Milk and milk products; their importance in the American diet. Food Rev 1998; p. 29-37.
- (2) Dykes WRG, Sheiham A. Preschool children's consumption of drinks: Implications for dental health. Community Dent Health 2000; 17: 8-13.
- (3) Morton JF, Guthrie JF. Changes in children's total fat intakes and their food group sources of fat, 1989-91 versus 1994-95: Implications for diet quality. Fam Econ Nutr Rev 1998; 11: 45-57.
- (4) Comité de Nutrición de la Asociación Española de Pediatría. Consumo de frutas y de bebidas refrescantes por niños y adolescentes en España: Implicaciones para la salud de su mal uso y abuso: An Pediatr 2003; 58 (6): 584-593.
- (5) Banco Wiese Sudameris. Reporte Sectorial. Gaseosas: Los bajos precios debilitan a la industria. Lima; 2002.
- (6) Morris B. Jacobs. Manufacture and analysis of carbonated beverages. Chemical publishing CO. INC. New York, 1959.
- (7) Instituto Nacional de Defensa al Consumidor y Propiedad Intelectual. Catalogo Especializado de Normas Técnicas Peruanas. Lima: Indecopi; 2011.
- (8) Codex Alimentarius. Norma General para los aditivos alimentarios: Codex Stan 192-1995, rev. 12, 2011.
- (9) BOE RD. *Reglamento técnico sanitario para la elaboración, circulación y venta de bebidas refrescantes*. Madrid, 1992 (23)

- (10) Registro Sanitario de Alimentos [base de datos en línea]. Lima. Dirección General de Salud Ambiental: 2010 [fecha de acceso 15 de julio de 2010]. URL disponible en:
http://www.digesa.sld.pe/Expedientes/Consulta_Registro_Sanitario.asp
[X](#)
- (11) INDECOPI. Norma Técnica Peruana: NTP 203.111. REFRESCOS. Requisitos. 1ª Edición. 2010.
- (12) INDECOPI. Norma Técnica Nacional: NTP 214.2001. Bebidas gasificadas jarabeadas. Requisitos. 1985.
- (13) INDECOPI. Norma Técnica Peruana: NTP 203.110. JUGOS, NECTARES Y BEBIDAS DE FRUTA. Requisitos. 1ª Edición. 2009.
- (14) Asociación Nacional de bebidas refrescantes (ANFABRA). Proceso de fabricación de bebidas refrescantes [sede Web]. Madrid: Anfabra.es [acceso 20 de octubre de 2010]. Disponible en: <http://www.anfabra.es>.
- (15) Norberg A, Jones W A, et al. Variabilidad en la Farmacocinética del Etanol. *Clinical Pharmacokinetics* 2003; 42(1):1-31.
- (16) Maier H. Métodos modernos de análisis de alimentos. Vol III. Métodos electroquímicos y enzimáticos. Ed. Acribia. Zaragoza, 1982.
- (17) European Brewery Convention. Analytical IV-EBC, Method 9.2 EBC (1987).
- (18) American Society of Brewing Chemists. "*Methods of Analysis*". Eight Revisaded Edition. Method Beer 4F.ASBC. (1992).

- (19) Dennison BA, Rockwell HL, Baker SL. Excess fruit juice consumption by preschool-aged children is associated with short stature and obesity. *Pediatrics* 1997; 99:15-22.
- (20) Smith MM, Lifshitz F. Excess fruit juice consumption as a contributing factor in nonorganic failure to thrive. *Pediatrics* 1994; 93:438-443
- (21) Skinner JD, Carruth BR, Moran J III, Houck K, Coletta F. Fruit juice intake is not related to children's growth. *Pediatrics* 1999; 103:58-64
- (22) Alexy U, Sichert Hellert W, Kersting M, Manz F, Schoch G. Fruit juice consumption and the prevalence of obesity and short stature in German preschool children: Results of the DONALD study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999; 29:343-349.
- (23) Mahraoui L, Takeda J, Mesonero J. Regulation of expression of the human fructose transporter (GLUT5) by cyclic AMP. *Biochem* 1994; 301:169-75.
- (24) Riby JE, Fujisawa T, Kretchmer N. Fructose absorption. *Am J Clin Nutr* 1993; 58 (Suppl 5):748-753
- (25) Davidson M, Wasserman R. The irritable colon of childhood (chronic non-specific diarrhea syndrome). *J Pediatr* 1996; 69: 1027-1038.
- (26) Hyams JS, Etienne NL, Leichtner AM, Theuer RC. Carbohydrate malabsorption following fruit juice ingestion in young children. *Pediatrics* 1988; 82:64-68.
- (27) Nobigrot T, Chasalow FI, Lifshitz F. Carbohydrate absorption from one serving of fruit juice in young children: age and carbohydrate composition effects. *J Am Coll Nutr* 1997; 16:152-158.

- (28) Lifschitz CH. Carbohydrate absorption from fruit juices in infants. Pediatrics 2000; 105:ed. URL: <http://www.pediatrics.org/cgi/content/full/105/1/e4>.
- (29) Szajewska H, Hoekstra JH, Sandhu B. Management of acute gastroenteritis in Europe and the impact of the new recommendations: a multicenter study. The Working Group on acute Diarrhoea of the European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2000; 30:522-527.
- (30) Vitoria I, Castells X, Calatayud O, Arias T. Rehidratación oral con bebidas refrescantes. Riesgo de yatrogenia. Acta Pediatr Esp 2002; 60:205-210.
- (31) American Academy of Pediatrics. Committee on Nutrition. The Use and Misuse of Fruit Juice in Pediatrics. Pediatrics 2001; 107: 1210-1214.
- (32) Baker SS, Liptak GS, Colletti RB, Croffie JM, Di Lorenzo C, Ector W, et al. Constipation in infants and children: evaluation and treatment. J Pediatr Gastroenterol Nutr 1999; 29:612-626.
- (33) Blanco Quirós A, Sánchez Villares E. Pathogenic basis of food allergy treatment. En: Reinhardt D, Schmidt E, editors. Food Allergy. New York: Raven Press, 1988; p. 265-270.
- (34) Di Marco MP, Edwards DJ, Wainer IW, Ducharme MP. The effect of grapefruit juice and seville orange juice on the pharmacokinetics of dextromethorphan: the role of gut YP3A and P-glycoprotein. Life Sci 2002; 71:1149-1160.

- (35) Koivisto KT, Lilja JJ, Backman JT, Neuvonen PJ. Repeated consumption of grapefruit juice considerably increases plasma concentrations of cisapride. *Clin Pharmacol Ther* 1999; 66:448-453.
- (36) Kane GC, Lipsky JJ. Drug-grapefruit juice interactions. *Mayo Clin Proc* 2000; 75:933-942.
- (37) National Center for Health Statistics/Center for Diseases Control. More American children and teens are overweight [en línea]. 1999. [fecha de acceso 12 de enero del 2010]. Disponible en:
<http://www.cdc.gov/nchs/releases/01news/overwght99.htm>.
- (38) Ludwig DS, Peterson KE, Gortmaker SL. Relation between consumption of sugar-sweetened drinks and childhood obesity: A prospective, observational analysis. *Lancet* 2001; 357:505-508.
- (39) Krauss RM. Triglycerides and atherogenic lipoproteins: Rationale for lipid management. *Am J Med* 1998; 105:58S-62S.
- (40) Parks EJ, Hellerstein MK. Carbohydrate-induced hypertriglycerolemia: Historical perspective and review of biological mechanisms. *Am J Clin Nutr* 2000; 71:412-433.
- (41) Janssens JP, Shapira N, Debeuf P, Michiels L, Putman R, Bruckers L, et al. Effects of soft drink and table beer consumption on insulin response in normal teenagers and carbohydrate drink in youngsters. *Eur J Cancer Prev* 1999; 8:289-295.
- (42) Angulo J; Jonorato P; Valdez A. "*Evaluación de parámetros para la obtención de una limonada artificial embotellada*". Facultad de

Ingenierías Alimentarias. Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. Tacna, 2003.

- (43) Varó P. y Guillem C. "*Determinación de etanol en bebidas refrescantes por enzimuno-análisis*". Alimentación: equipos y biotecnología. Mayo 2000; (4): 95-98
- (44) Pastor P. y et al. "*Contenido alcohólico de las bebidas sin alcohol*". Adicciones 2000; 12(3): 323-327.
- (45) Código Alimentario Argentino. Capítulo XII. Bebidas hídricas, agua, agua gasificada, Jugos. Art. 1040, Art. 1041 y Art. 1064, de la Canal y Asociados, Buenos Aires, 1992: 344-349 pp.
- (46) FAO/WHO. Codex Alimentarius Volumen 6. Fruit Juices and Related Products. [CD ROM]. Rome: Joint FAO/WHO Food Standards Programme. 1997.
- (47) Boehringer Mannheim GmbH, "*Methods of Bioanalysis and Food Analysis*". Mannheim: Boehringer Mannheim GMBH, 1995.
- (48) Buckee, G. y Baker, C. "*Enzymatic Determination of etanol in alcohol-free and low alcohol beers*". Brau Rundsch 1986; 97 (10): 202-203.
- (49) AOAC. *Official Methods of Analysis*. 15 ed. USA (1990).
- (50) Pesce A. y Kaplan L. Química clínica - Métodos. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, 1990.
- (51) Beutler H.O. Ethanol. In *Methods of Enzymatic Analysis*. (Bergmeyer, H. U.) Ed. 3rd ed. VCH Publishers (UK) Ltd. Cambridge, 1988; VI: 598-606

- (52) Goldberger B.A; Cone E.J.; Kadehjian L. (1996) Unsuspected Ethanol Ingestion Through Soft Drinks and Flavoured Beverages. *Journal of Analytical Toxicology*, 20, 332-333.
- (53) Shaw, P. E.; Buslig, B. S.; Mozonas, M. G. (1993). Classification of Commercial Orange Juice Types by Pattern Recognition Involving Volatile Constituents Quantified by Gas Chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41, 809-813.
- (54) Francis J. y Harmer P.W. (1988) Zumos de frutas y bebidas refrescantes. M. D. Ranken, Acribia, Zaragoza 305- 308 pp
- (55) Kennes C.; Veiga M. C.; Dubourguier H. C.; Touzel J. P.; Albagnac G.; Naveau H.; Nyns E. J. (1991) Trophic relationships between *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus plantarum* and their metabolism of glucose and citrate. *Applied Environmental Microbiology*, 57, 1046-1051
- (56) Pesis E.; Dvir O. ; Feygenberg O. ; Ben Arie R. ; Ackerman M.; Lichter A. (2002) Production of acetaldehyde and ethanol during maturation and modified atmosphere storage of litchi fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 26, 157–165
- (57) Trifiro, A.; Saccani, G.; Gherardi, S.; Vicini, E.; Spotti, E.; Previdi, M. P.; Ndagijimana, M.; Cavalli, S.; Reschiotto, C. (1997) Use of ion chromatography for monitoring microbial spoilage in the fruit juice industry. *Journal of Chromatography*, 770, 243-252.

INDICE DE TABLAS

<u>Nº</u>	<u>Título</u>	<u>Página</u>
1	Requisitos físico-químicos establecidos por la NTP 203.111 para refrescos	28
2	Requisitos microbiológicos establecidos por la NTP 203.111 para refrescos	28
3	Requisitos microbiológicos establecidos por la NTP 214.001 para bebidas gasificadas jarabeadas	30
4	Requisitos físico-químicos establecidos por la NTP 214.001 para bebidas gasificadas jarabeadas	30
5	Requisito microbiológico establecidos por la NTP 203.110 para jugos de fruta	31
6	Requisito microbiológico establecidos por la NTP 203.110 para néctares de fruta	32
7	Requisito microbiológico establecidos por la NTP 203.110 para bebidas de fruta	33
8	Concentración de etanol en aguas gasificadas jarabeadas (gaseosas)	61
9	Concentración de etanol en refrescos líquidos	64
10	Concentración de etanol en néctares (zumos de fruta)	67
11	Concentración de etanol en otras bebidas (rehidratantes y especiales)	69
12	Concentración de etanol en bebidas instantáneas en polvo	71
13	Cumplimiento del reglamento técnico sanitario español y la NTP 214.001 de las muestras de bebidas refrescantes evaluadas por espectrofotometría visible (< 0.5% v/v)	74
14	Puntos de muestreo de las bebidas refrescantes	93
15	Métodos analíticos para la determinación de alcohol etílico en alimentos según la AOAC	93
16	Ficha de recolección de datos	99

INDICE DE GRÁFICOS

<u>Nº</u>	<u>Título</u>	<u>Página</u>
1	Curva de calibración de estándares	60
2	Concentración de etanol en aguas gasificadas jarabeadas	63
3	Concentración de etanol en refrescos líquidos	66
4	Concentración de etanol en néctares de fruta	68
5	Concentración de etanol en bebidas rehidratantes y especiales	70
6	Concentración de etanol de bebidas instantáneas en polvo	73
7	Evaluación del Cumplimiento del Reglamento Técnico Sanitario de España para bebidas refrescantes y la NTP 214.001	76
8	No Cumplimiento del Reglamento Técnico Sanitario de España para bebidas refrescantes y la NTP 214.001 de acuerdo al tipo de bebida refrescante analizada	76

INDICE DE FIGURAS

<u>Nº</u>	<u>Título</u>	<u>Página</u>
1	Muestras en diferentes Supermercados de Lima Metropolitana	96
2	Espectrofotómetro UV/Visible Hewlett Packard	98
3	Kit Enzimático de Megazyme para determinación de etanol	98

XI. ANEXOS

TABLA 14. Puntos de muestreo de las bebidas refrescantes

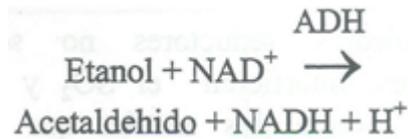
Supermercado	Distrito	Nº de muestras recolectadas
Supermercado Tottus	San Juan de Miraflores	6
Supermercados Wong	Surco	8
Hipermercado Plaza Veá	Surco	8
Hipermercado Metro	Cercado de Lima	6
Supermercado Metro	San Juan de Miraflores	7
Supermercado Plaza Veá	Ate	5

TABLA 15. Métodos analíticos para la determinación de alcohol etílico en alimentos según la AOAC

<p>HIDROMETRÍA</p>	<p>El contenido de etanol se puede medir en el destilado a partir de un volumen de la muestra exactamente medido.</p> <p>Los azúcares reductores no son destilables. Interfieren el SO₂ y el ácido acético a los niveles que se señalan a continuación:</p> <p>Niveles de SO₂ superiores a 200 mg/l Acidez volátil que exceda 0,10%</p> <p>Por esta razón las muestras deben neutralizarse antes de la destilación. La determinación se efectúa por medio de un hidrómetro calibrado y se registra la temperatura. El porcentaje de etanol en volumen se obtiene de tablas específicas.</p> <p>También se puede determinar el porcentaje de etanol en volumen con hidrómetros que miden el peso específico y consultar posteriormente las tablas pertinentes.</p> <p>Los hidrómetros para etanol deben calibrarse con soluciones de etanol exactamente preparadas. Este método requiere bastante experiencia y cuidados extremos en todo el proceso de neutralización, destilación, medición y control de temperatura.</p>
<p>MÉTODO DENSITOMÉTRICO</p>	<p>Requiere de un equipo especial. Mide el peso específico de la muestra, por el cambio de frecuencia de oscilación en un</p>

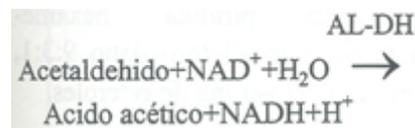
	<p>tubo en U comparado con dos estándares.</p> <p>El peso específico se convierte a porcentaje de etanol a 15,56 °C. Se aplica a destilados entre 25-79 ° alcohólicos.</p> <p>El control de la temperatura y presión son factores importantes a considerar en la determinación.</p>
MÉTODO REFRACTOMÉTRICO	Ocupa el refractómetro de inmersión. Debe tenerse un muy buen control de la temperatura a 15,56°C. A temperaturas diferentes se aplican factores de corrección.
DETERMINACIÓN DEL ETANOL EN PESO	Se utiliza el método del picnómetro. Se debe tener la precaución de un buen control de peso del picnómetro y bien calibrado, y un muy buen control de temperatura.
DETERMINACIÓN DE ETANOL POR EL MÉTODO DE DICROMATO DE POTASIO	<p>El etanol obtenido por destilación se oxida cuantitativamente a ácido acético por un exceso de dicromato de potasio estandarizado.</p> $3\text{C}_2\text{H}_5\text{OH} + 2\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-} + 16\text{H}^+ \rightarrow 3\text{CH}_3\text{COOH} + 4\text{Cr}^{3+} + 11\text{H}_2\text{O}$ <p>El exceso de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ se determina con solución de sulfato ferroso y amonio estandarizado. Los tiempos y temperatura de incubación para oxidar el etanol a ácido acético son críticos.</p> <p>Debe tenerse especial precaución con el material de vidrio, exactitud de las mediciones, calibración de pipetas, etc. Debe realizarse un blanco.</p>
ANÁLISIS DE ETANOL POR CROMATOGRAFÍA GAS-LÍQUIDO (GLC)	<p>El etanol presente en vinos, cervezas, jugos se puede separar de otros componentes por GLC. Para mejorar los aspectos cuantitativos se usa 2-propanol como estándar interno.</p> <p>La relación de área de ambos picos se compara con la de una solución patrón de etanol y 2-propanol.</p> <p>Se pueden emplear columnas empacadas de acero inoxidable o vidrio de 2 m rellenas con Porapack QS, Carbowax 0,2 % 1500 sobre Carbopack C 80 -100 mesh, Chromosorb 103.</p> <p>Se recomienda determinar el porcentaje de etanol en volumen por un método oficial para efectos de control.</p>
MÉTODO ENZIMÁTICO	El etanol se puede oxidar a acetaldehído por el NAD en presencia de la enzima alcohol dehidrogenasa (ADH) para producir NADH. Es una reacción estequiométrica en

condiciones experimentales adecuadas. El NADH producido se determina espectrofotométricamente a 334, 340 o 360 nm.



Actualmente se dispone de mezclas preparadas. Debe tenerse precaución en la medición cuantitativa de volúmenes muy pequeños de reactivo y muestra.

La reacción se desplaza a la derecha en medio alcalino, atrapando el acetaldehido formado y luego oxidándolo a ácido acético en presencia de aldehído dehidrogenasa.



Dependiendo de la longitud de onda que se elija, se debe tener la precaución de que la concentración de etanol sea de 0,01 a 0,12g/l (365 nm) o de 0,005 a 0,06g/l(340o334nm).

En general en alimentos líquidos se recomienda clarificar y filtrar.

El método es muy sensible, debe tenerse especial cuidado con el agua empleada que debe estar libre de etanol. Igualmente se recomienda tapar las cubetas en el momento de la lectura. El etanol es muy volátil. Debe trabajarse en atmósfera libre de etanol. Para controlar el método se recomienda emplear una solución patrón de etanol.

FIGURA 1. Muestras en diferentes Supermercados de Lima Metropolitana





FIGURA 2. Espectrofotómetro UV/Visible Hewlett Packard

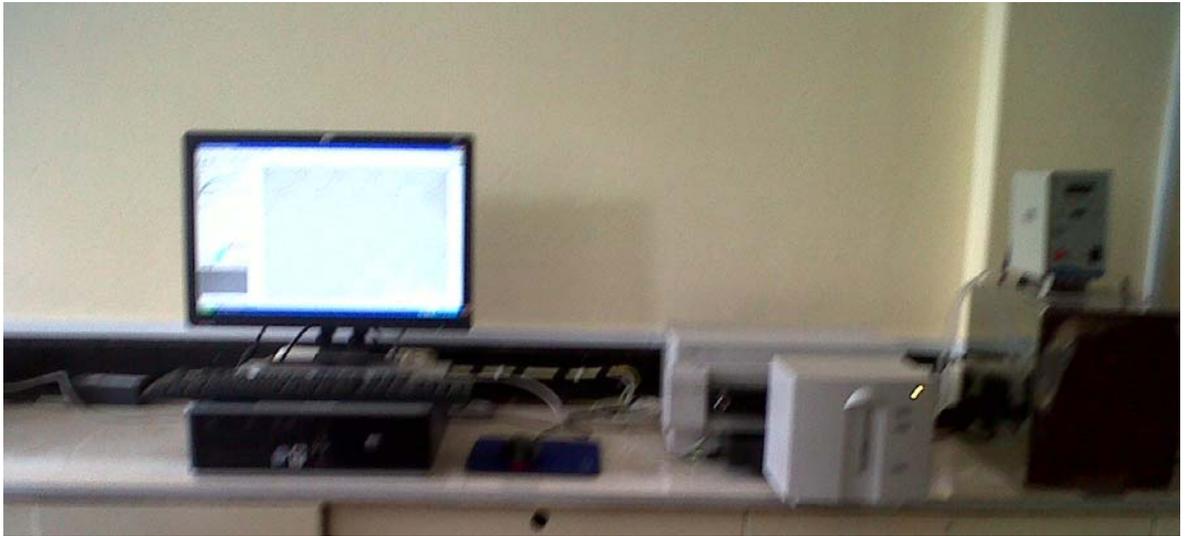


FIGURA 3. Kit Enzimático de Megazyme para determinación de etanol



TABLA 16. Ficha de Recolección de datos

GRUPO	Muestra	Absorbancia inicial (2 min)	Absorbancia final (5 min)	Diferencia de absorción	Concentración (% v/v)
Aguas gasificadas jarabeadas (gaseosas)					
Refrescos líquidos					
Néctares de fruta					
Bebidas rehidratantes y especiales					
Bebidas instantáneas en polvo					