



## Revista Española de Nutrición Humana y Dietética

Spanish Journal of Human Nutrition and Dietetics

### INVESTIGACIÓN – **versión post-print**

**Esta es la versión revisada por pares aceptada para publicación. El artículo puede recibir modificaciones de estilo y de formato.**

### **Validación de un método enzimático-colorimétrico para la determinación de fructosa en refrescos comerciales**

### **Validation of an enzymatic colorimetric assay for fructose content determination in soft drinks**

**Luciana Olmedo<sup>a</sup>, María Florencia Henning<sup>a</sup>, Brenda Pappalardo<sup>b</sup>, Silvia Mónica García<sup>b</sup>, Magalí Pellon Maison<sup>a,\*</sup>.**

<sup>a</sup> Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata. La Plata, Argentina.

<sup>b</sup> Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata. La Plata, Argentina.

\* magalipellon@med.unlp.edu.ar

Recibido: 23/06/2020; Aceptado: 28/07/2020; Publicado: 04/09/2020

**CITA:** Olmedo L, Henning MF, Pappalardo B, García SM, Pellon Maison M. Validación de un método enzimático-colorimétrico para la determinación de fructosa en refrescos comerciales. Rev Esp Nutr Hum Diet. 2021; 25(1). doi: 10.14306/renhyd.25.1.1087 [ahead of print]

La Revista Española de Nutrición Humana y Dietética se esfuerza por mantener a un sistema de publicación continua, de modo que los artículos se publiquen antes de su formato final (antes de que el número al que pertenecen se haya cerrado y/o publicado). De este modo, intentamos poner los artículos a disposición de los lectores/usuarios lo antes posible.

*The Spanish Journal of Human Nutrition and Dietetics strives to maintain a continuous publication system, so that the articles are published before its final format (before the number to which they belong is closed and/or published). In this way, we try to put the articles available to readers/users as soon as possible.*

## RESUMEN

**Introducción:** Argentina es uno de los países con mayor consumo de bebidas azucaradas en el mundo. El consumo elevado de estas bebidas, se asocia con el desarrollo de sobrepeso, obesidad y otros factores de riesgo cardiometabólico, efectos atribuidos a su alto contenido de fructosa. Los objetivos de este trabajo fueron: validar un método específico, accesible y económico para la determinación de fructosa y glucosa en bebidas azucaradas, evaluar su contenido en refrescos comercializados en Argentina y comparar los resultados obtenidos con las declaraciones de los rótulos nutricionales.

**Materiales y métodos:** Se seleccionó un método enzimático-colorimétrico comercial desarrollado para su uso en la industria alimentaria. El método se validó por primera vez para la determinación de fructosa y glucosa en bebidas azucaradas, mediante la determinación del sesgo, la recuperación, la repetibilidad y la reproductibilidad interna. El contenido de fructosa y glucosa se evaluó en treinta bebidas azucaradas. Los resultados obtenidos se contrastaron con la información del rótulo nutricional.

**Resultados:** todos los parámetros obtenidos en el protocolo de validación indican que el método es adecuado para su utilización en la determinación de fructosa y glucosa en bebidas azucaradas. El contenido de fructosa varió entre 2,2 y 14,3 g por porción, mientras que el de glucosa varió entre 1,7 y 10,5 g por porción. En el 83% de las bebidas analizadas, el jarabe de maíz de alta fructosa fue el único edulcorante utilizado en la formulación. En el 75% de las bebidas endulzadas exclusivamente con jarabe de maíz de alta fructosa, se encontró una relación fructosa: glucosa mayor a lo esperado para el uso de jarabe de maíz de alta fructosa-55.

**Conclusiones:** el método enzimático-colorimétrico resulta adecuado para la determinación de fructosa y glucosa en bebidas azucaradas. El mismo presenta la ventaja de ser específico, económico y de no requerir equipamiento sofisticado.

**Palabras clave:** Fructosa; Jarabe de Maíz Alto en Fructosa; Azúcares; Edulcorantes Nutritivos; Bebidas Azucaradas.

## ABSTRACT

**Introduction:** Argentina is one of the countries with the highest consumption of sugary drinks in the world. The high consumption of these drinks is associated with the development of overweight, obesity and other cardio-metabolic risk factors, effects attributed to their high fructose content. The objectives of this work were: to validate a specific, accessible and inexpensive method for the determination of fructose and glucose in sugary drinks, to evaluate their content in soft drinks marketed in Argentina and to compare the results obtained with the declarations of the nutritional labels.

**Materials and methods:** A commercial enzymatic-colorimetric method developed for use in the food industry was selected. The method was validated for the first time for the determination of fructose and glucose in sugary drinks, by determining bias, recovery, repeatability, and internal reproducibility. The fructose and glucose content was evaluated in thirty sugary drinks. The results obtained were contrasted with the information on the nutritional label.

**Results:** all the parameters obtained in the validation protocol indicate that the method is suitable for use in the determination of fructose and glucose in sugary drinks. Fructose content ranged between 2.2 and 14.3 g per serving, while glucose content ranged between 1.7 and 10.5 g per serving. In 83% of the beverages tested, high fructose corn syrup was the only sweetener used in the formulation. In 75% of the drinks sweetened exclusively with high fructose corn syrup, a higher fructose: glucose ratio was found than expected for the use of high fructose-55 corn syrup.

**Conclusions:** the enzymatic-colorimetric method is suitable for the determination of fructose and glucose in sugary drinks. It has the advantage of being specific, economical and of not requiring sophisticated equipment.

**Keywords:** Fructose; High Fructose Corn Syrup; Sugars; Nutritive Sweeteners; Sugar-Sweetened Beverages.

## **MENSAJES CLAVE**

- 1- El contenido de fructosa y glucosa en bebidas azucaradas se puede determinar mediante el uso de un método enzimático-colorimétrico, previamente validado en la industria vinícola.
- 2- El jarabe de maíz de alta fructosa se encuentra ampliamente distribuido en la elaboración de bebidas azucaradas en Argentina, aunque su presencia se declara de manera ambigua en los rótulos nutricionales.
- 3- En tres cuartas partes de las bebidas endulzadas con jarabe de maíz de alta fructosa la relación fructosa: glucosa es mayor al valor esperado para el uso de jarabe de maíz de alta fructosa-55 como edulcorante, por lo que aun considerando los rótulos que refieren su uso, no es posible estimar el contenido de fructosa en estas bebidas.

## INTRODUCCIÓN

Según la Organización Mundial de la Salud, la obesidad es considerada la pandemia del siglo XXI<sup>1</sup>. Su prevalencia mundial se ha triplicado entre 1975 y 2016, lo que conlleva a un mayor número de muertes a nivel global en comparación con la desnutrición<sup>2-4</sup>. En Argentina, la cuarta encuesta nacional de factores de riesgo para enfermedades crónicas no transmisibles realizada en 2018, reportó que el 36,2% de la población tenía sobrepeso, mientras que el 25,4% presentaba obesidad<sup>5</sup>, por lo que la prevalencia de obesidad se incrementó en un 79,3% en relación al año 2005.

La obesidad es una enfermedad multifactorial con componentes genéticos, ambientales y de estilo de vida, como la malnutrición, el sedentarismo, el contexto sociocultural o la cronodisrupción. El consumo de bebidas endulzadas con edulcorantes calóricos, también denominadas bebidas azucaradas, se ha asociado con la ganancia de peso y de grasa visceral, así como también con un incremento del riesgo de desarrollar diabetes y enfermedad arterial coronaria, independientemente de la adiposidad<sup>6-10</sup>. En Argentina, el consumo de bebidas azucaradas es muy elevado. Según un reporte de mercado publicado por Euromonitor International<sup>11</sup>, el país lideró el consumo de refrescos a nivel mundial en 2016 con una ingesta de 131 litros per cápita y por año. Asimismo, el estudio HidratAr mostró que el 50% de la ingesta de líquidos en la población argentina corresponde a bebidas e infusiones azucaradas<sup>12</sup>, las que a su vez aportan el 26,9 % de los azúcares libres consumidos por los argentinos<sup>13</sup>.

Los edulcorantes calóricos más ampliamente utilizados en la elaboración de bebidas azucaradas son la sacarosa, denominada azúcar en los rótulos nutricionales según el código alimentario argentino, y el jarabe de maíz de alta fructosa (JMAF). La sacarosa es un disacárido extraído de la caña de azúcar que consiste en una molécula de glucosa y una de fructosa unidas mediante enlace glucosídico (contiene 50% glucosa y 50% fructosa), mientras que el JMAF es un edulcorante obtenido a partir de la hidrólisis del almidón de maíz<sup>14</sup>. El JMAF más comúnmente utilizado en la elaboración de bebidas azucaradas es el JMAF-55, compuesto por 55% de fructosa, 41% de glucosa y 4% de otros azúcares. Brasil es el principal productor de azúcar en el mundo seguido de la India y la Unión Europea, mientras que el principal productor mundial de JMAF es Estados Unidos<sup>15</sup>. En América Latina el principal país productor de JMAF es Argentina. Estos edulcorantes se utilizan solos o en combinación en la formulación de bebidas azucaradas.

El impacto negativo del consumo de las bebidas azucaradas sobre la salud, se atribuye principalmente a ingesta elevada de fructosa. El metabolismo de la fructosa posee características diferenciales que promueven la lipogénesis de novo, la esteatosis hepática, la resistencia hepática a la insulina, la ingesta de tipo adictivo y una menor inhibición del apetito<sup>16</sup>. Aunque

este efecto deletéreo de la fructosa ha sido ampliamente descrito<sup>16-19</sup>, las prácticas actuales de etiquetado nutricional no proveen información acerca del contenido de este monosacárido en alimentos y bebidas. De acuerdo con el Código Alimentario Argentino<sup>20</sup>, la declaración del contenido de carbohidratos totales en bebidas es obligatoria, aunque no es necesario declarar el contenido de azúcares. Sin embargo, algunos fabricantes incluyen esta especificación en la información nutricional, haciendo referencia a todos los monosacáridos y disacáridos que son digeridos, absorbidos y metabolizados por los seres humanos, excluyendo a los polialcoholes. Adicionalmente, no es obligatoria la declaración de cada uno de los tipos de azúcares utilizados como edulcorantes en la lista de ingredientes, ni tampoco hacer referencia a la utilización de JMAF en el rotulado.

Teniendo en cuenta el impacto negativo del consumo de un exceso de fructosa en la salud y que en Argentina la principal fuente de este monosacárido proviene de la ingesta de bebidas azucaradas, el objetivo de este trabajo fue validar un método sencillo y económico que permita determinar el contenido de fructosa en refrescos y utilizarlo para determinar su contenido en bebidas comercializadas en Argentina.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Selección del método de medida y fundamento

Para determinar el contenido de fructosa y glucosa en bebidas azucaradas se seleccionó un método enzimático-colorimétrico comercial desarrollado por la compañía “Megazyme Internacional Irlanda” para su uso en la industria alimentaria (kit de ensayo K-FRUGLU). El método se escogió por su simplicidad, asequibilidad, costo y por la ventaja de ser un método altamente específico. El mismo fue validado para su utilización industria vinícola<sup>21</sup> pero no ha sido validado aún para su utilización en bebidas azucaradas. El fundamento del método se basa en la fosforilación y posterior oxidación enzimática de la fructosa y glucosa, con la consecuente producción de NADPH, el cual se determina mediante espectrofotometría. En nuestro laboratorio, se adaptó el protocolo original para utilizar un espectrofotómetro Nanodrop como instrumento de medida (Thermo Scientific, NanoDrop 2000 c). Para ello, las muestras fueron preparadas conforme a las instrucciones del fabricante, siguiendo el procedimiento del ensayo de microplacas y para la lectura de las absorbancias (A1, A2 y A3) se tomaron 2  $\mu$ L de la muestra. El protocolo utilizado se resume en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Protocolo del ensayo enzimático-colorimétrico utilizando un espectrofotómetro Nanodrop para la determinación de fructosa y glucosa en bebidas.

Longitud de onda: 340 nm

Solución estándar (provista por el fabricante): 0,2 µg/µL de cada glúcido (glucosa y fructosa)

Volumen final: 234 µL

<b>Pipetear en tubos Eppendorf</b>	<b>Blanco (x2)</b>	<b>Muestra (x2)</b>	<b>Estándar (x2)</b>
Agua miliQ	210 µL	190 µL	190 µL
Muestra	-	20 µL	-
Estándar	-	-	20 µL
Solución I (buffer)	10 µL	10 µL	10 µL
Solución II (NADP+)	10 µL	10 µL	10 µL
<b>Centrifugar e incubar en baño caliente durante 5 min a 30°C.</b>			
<b>Centrifugan nuevamente y realizar la medición de A1 en el espectrofotómetro.</b>			
Solución III (HK + G6P-DH)	2 µL	2 µL	2 µL
<b>Centrifugar e incubar en baño caliente a 30°C durante 30 min.</b>			
<b>Centrifugar nuevamente y realizar la medición de A2 en el espectrofotómetro.</b>			
Solución IV (PGI)	2 µL	2 µL	2 µL
<b>Homogeneizar e incubar a 30 °C durante 45 min.</b>			
<b>Centrifugar y realizar la medición de A3 en el espectrofotómetro.</b>			
<b>Cálculo de la concentración de glucosa y fructosa:</b>			
[glucosa]= (Vf x MW / ε x d x V mtra) x ΔA glucosa			
[fructosa]= (Vf x MW / ε x d x V mtra) x ΔA fructosa			
ΔA glucosa = (A2-A1) muestra - (A2-A1) blanco			
ΔA fructosa = (A3-A2) muestra - (A3-A2) blanco			
HK: hexoquinasa			
G6P-DH: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa			
PGI: fosfoglucosa isomerasa			
Vf: volumen final			
V mtra: volumen de la muestra			
MW (peso molecular) glucosa= 180,16			
MW (peso molecular) fructosa= 180,16			
ε NADPH (coeficiente de extinción de NADPH a 340 nm) = 6300 L/mol cm			
d= 0,1 cm			



### **Protocolo de validación del método**

**Linealidad.** Se utilizaron estándares de glucosa y fructosa para cubrir el rango de 1 a 8  $\mu\text{g}$  de cada azúcar. Cada uno de los seis puntos de la curva (1, 2, 3, 4, 6 y 8  $\mu\text{g}$ ) se determinó por triplicado. El criterio de linealidad aceptable fue un coeficiente de correlación  $>0,99$ , calculado a partir de un modelo de regresión lineal.

**Exactitud.** La veracidad del método se determinó por sesgo y recuperación. El sesgo se obtuvo midiendo diez veces la concentración de glucosa y fructosa de la solución estándar provista por el fabricante (valor esperado de 0,2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  para cada azúcar). Para comparar la media de los valores obtenidos con el valor esperado, se utilizó la tabla de valores críticos de la distribución t de dos colas. La recuperación se analizó disolviendo cantidades de glucosa y fructosa en refrescos sin azúcares, de modo de obtener una concentración de 0,2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  para cada azúcar. Para este ensayo de recuperación se utilizaron dos gaseosas (sabor cola y limón) y un agua saborizada como matrices y se calculó el porcentaje medio de recuperación y la desviación estándar relativa. La precisión se estableció en términos de repetibilidad y reproducibilidad. La repetibilidad se determinó midiendo diez veces la concentración de glucosa y fructosa en bebidas azucaradas, bajo las mismas condiciones en un periodo corto de tiempo. La reproducibilidad interna se calculó midiendo estas las concentraciones por diferentes operadores en distintos días. En ambos casos, se calcularon la desviación estándar y el porcentaje del coeficiente de variación (% CV). La aceptabilidad se determinó utilizando el coeficiente de variación de Horwitz.

### **Determinación del contenido de fructosa y glucosa en bebidas azucaradas y su correlación con las declaraciones del rótulo nutricional**

Se llevó a cabo un estudio descriptivo de corte transversal en la ciudad de La Plata, capital de la Provincia de Buenos Aires, Argentina. Considerando la oferta de bebidas disponible en supermercados durante el año 2018 y 2019, se seleccionaron bebidas al azar entre aquellas que contenían edulcorantes calóricos en su lista de ingredientes, y se clasificaron como gaseosas (n=12), aguas saborizadas (n=15) y bebidas de rehidratación (n=3). Se consideraron gaseosas a aquellas bebidas carbonatadas con dióxido de carbono y adicionadas con sustancias aromatizantes naturales; éstas difieren de las aguas saborizadas únicamente por el nivel de gasificación. Las bebidas de rehidratación comprendieron a aquellas elaboradas para proveer energía y reponer las pérdidas de agua y minerales ocasionadas luego de esfuerzos físicos de más de una hora de duración. De las dos compañías multinacionales más populares (llamadas compañías multinacionales A y B) se seleccionaron gaseosas sabor cola, naranja, limón y pomelo,

y también aguas saborizadas y bebidas de rehidratación. Adicionalmente, se seleccionaron gaseosas, aguas saborizadas y bebidas de rehidratación de otras compañías multinacionales (llamadas C, D y E) y de proveedores de la industria nacional (llamadas compañías nacionales A, B y C).

**Registro de las declaraciones del rótulo nutricional:** Para cada bebida, se registró el contenido de carbohidratos y azúcares totales a partir de la etiqueta de información nutricional, mientras que de la lista de ingredientes se extrajo el tipo de edulcorante utilizado.

**Cuantificación de fructosa y glucosa:** Se empleó el método validado descrito anteriormente. Para ello, las bebidas se desgasificaron mediante agitación magnética durante toda la noche y se diluyeron en agua mili-Q (1/125, 1/250 o 1/500) teniendo en cuenta el contenido de carbohidratos totales declarado en la etiqueta de información nutricional.

## RESULTADOS

### Validación del método

Linealidad: el coeficiente de correlación para la glucosa fue de 0,992 y para la fructosa de 0,997. La exactitud, entendida como una combinación de veracidad y precisión, se determinó mediante los siguientes parámetros: sesgo, recuperación, repetibilidad, y reproducibilidad interna. El sesgo obtenido fue aceptable con un nivel de significancia de 0,05 ( $t$  calculado = 0,43 <  $t$  crítico = 2,262;  $\alpha$  = 0,05,  $n-1=9$ ). La recuperación fue de  $96,5 \pm 2,8\%$  para la glucosa y de  $98,2 \pm 2,4\%$  para la fructosa. Estos porcentajes de recuperación son aceptables de acuerdo con el criterio de la AOAC Internacional (valor aceptable 90-107% para 200 ppm). A partir del experimento de repetibilidad se calculó un % CV de 3,8, mientras que el de reproducibilidad interna presentó un % CV de 4,1. Ambos valores fueron aceptables de acuerdo con el coeficiente de Horwitz (% CV aceptable para repetibilidad <4,00; % CV aceptable para reproducibilidad interna: <5,33). Estos resultados demuestran que el método enzimático-colorimétrico resultó adecuado para la determinación de fructosa y glucosa en refrescos.

**Análisis de los rótulos nutricionales.** Todas las bebidas declararon el contenido de azúcares totales en el rótulo nutricional. Este valor osciló entre 4 y 25 g por porción de 200 mL, siendo el promedio general de  $16,1 \pm 6,5$  g por porción. Las gaseosas presentaron un promedio de  $21,4 \pm 2,4$  g por porción, las aguas saborizadas de  $9,4 \pm 4,2$  y las bebidas de rehidratación de  $12 \pm 0$  g por porción. El registro de la lista de ingredientes del rótulo nutricional demostró que los azúcares son declarados como: "JMAF y/o Azúcar" ( $n=8$ ), "JMAF o Azúcar" ( $n=8$ ), "JMAF" ( $n=8$ ), "JMAF y Azúcar" ( $n=2$ ), "Azúcares" ( $n=3$ ), y "Azúcar" ( $n=1$ ). Por lo tanto, se puede inferir que los edulcorantes utilizados en la fabricación de estas bebidas son sacarosa (azúcar), JMAF, o una mezcla de ambos. Para los refrescos que declaran "JMAF y/o Azúcar", "JMAF o Azúcar" y "Azúcares" el tipo de edulcorante que contiene el refresco resulta indeterminado.

**Cuantificación de fructosa y glucosa.** Mediante la utilización del método enzimático-colorimétrico validado en nuestro laboratorio, se determinó el contenido de fructosa y glucosa en los refrescos seleccionados; los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2. El contenido de fructosa osciló entre 2,2 y 14,3 g por porción, mientras que el de glucosa osciló entre 1,7 y 10,5 g por porción. Sólo en el caso los refrescos fabricados por la compañía nacional C, el contenido de fructosa más glucosa excede al contenido de azúcares totales declarado en la etiqueta de información nutricional. Por otra parte, el contenido de fructosa más glucosa representa más del 90% de los azúcares declarados en la etiqueta de información nutricional en veintiún refrescos (70% de las bebidas analizadas), resultado compatible con el uso de JMAF como único edulcorante. Para los refrescos fabricados por la compañía multinacional E, el contenido de fructosa más glucosa representa entre el 70 y el 85% de los azúcares declarados en la etiqueta de información nutricional; sin embargo, la lista de ingredientes sólo refiere el uso de JMAF como edulcorante en estas bebidas. Estos resultados permiten concluir que el 83% de las bebidas analizadas utilizan JMAF como único edulcorante. Para las bebidas restantes, el contenido de fructosa más glucosa representa entre el 50 y el 85% de los azúcares totales declarados en el rótulo, lo que concuerda con el uso de una mezcla de JMAF y sacarosa, en concordancia con lo que indican los rótulos nutricionales.

**Tabla 2.** Contenido de glucosa y fructosa en refrescos comerciales. Los ingredientes y el contenido de azúcares fueron obtenidos a partir del rotulado nutricional, mientras que el contenido de glucosa y fructosa fue determinado mediante un ensayo enzimático-colorimétrico.

	Ingredientes declarados	Azúcares declarados (g/200 mL)	Glucosa (g/200 mL)	Fructosa (g/200 mL)	Glu + Fru (g/200 mL) *	Relación Fru: glu
<b>Compañía Multinacional A</b>						
Gaseosa pomelo	JMAF o Azúcar	20	7,4 ± 0,2	11,8 ± 0,1	19,2 ± 0,3 (96)	1,59 ± 0,04
Gaseosa tónica	JMAF o Azúcar	17	6,9 ± 0,2	9,7 ± 0,9	16,6 ± 0,7 (98)	1,41 ± 0,14
Gaseosa naranja	Azúcares	25	10,5 ± 0,5	12,9 ± 0,3	23,4 ± 0,8 (94)	1,23 ± 0,06
Gaseosa cola	Azúcares	22	8,5 ± 0,6	12,2 ± 0,0	20,6 ± 0,6 (94)	1,43 ± 0,10
Gaseosa limón	Azúcares	21	8,7 ± 0,5	12,5 ± 0,7	21,2 ± 0,2 (100)	1,44 ± 0,11
Agua saborizada manzana	JMAF o Azúcar	15	5,6 ± 0,2	9,2 ± 0,3	14,8 ± 0,6 (98)	1,64 ± 0,08
Agua saborizada pera	JMAF o Azúcar	15	5,9 ± 0,0	9,0 ± 0,0	14,9 ± 0,0 (99)	1,52 ± 0,00
Agua saborizada pera	JMAF o Azúcar	7,6	3,5 ± 0,0	4,1 ± 0,0	7,6 ± 0,0 (100)	1,17 ± 0,00
Agua saborizada té verde-pomelo	JMAF o Azúcar	8,5	3,0 ± 0,1	4,9 ± 0,5	7,9 ± 0,3 (93)	1,63 ± 0,18
Bebida de rehidratación manzana	JMAF o Azúcar	12	4,9 ± 0,2	6,7 ± 0,0	11,6 ± 0,2 (97)	1,37 ± 0,05
<b>Compañía Multinacional B</b>						
Gaseosa pomelo	JMAF y/o Azúcar	23	7,5 ± 0,3	13,6 ± 0,3	21,0 ± 0,7 (91)	1,81 ± 0,09
Gaseosa naranja	Azúcar	19	3,8 ± 0,2	4,7 ± 0,3	8,5 ± 0,1 (45)	1,23 ± 0,09
Gaseosa limón	JMAF y/o Azúcar	21	4,4 ± 0,3	5,9 ± 0,9	10,3 ± 0,6 (49)	1,34 ± 0,23
Gaseosa cola	JMAF y/o Azúcar	23	10,1 ± 0,6	11,7 ± 0,2	21,8 ± 0,3 (95)	1,16 ± 0,07
Bebida de rehidratación manzana	JMAF y/o Azúcar	12	4,8 ± 0,0	5,3 ± 0,1	10,1 ± 0,1 (84)	1,10 ± 0,02
Bebida de rehidratación naranja	JMAF y/o Azúcar	12	5,0 ± 0,2	5,4 ± 0,5	10,4 ± 0,3 (86)	1,08 ± 0,11
<b>Compañía Multinacional C</b>						
Agua saborizada manzana	JMAF y/o Azúcar	3,9	1,7 ± 0,0	2,2 ± 0,3	3,8 ± 0,3 (97)	1,29 ± 0,18
Agua saborizada naranja	JMAF y/o Azúcar	4	1,7 ± 0,0	2,3 ± 0,0	4,0 ± 0,1 (100)	1,35 ± 0,01
Agua saborizada	JMAF y/o Azúcar	8	4,3 ± 0,8	3,41 ± 0,06	7,7 ± 0,7 (96)	0,79 ± 0,14

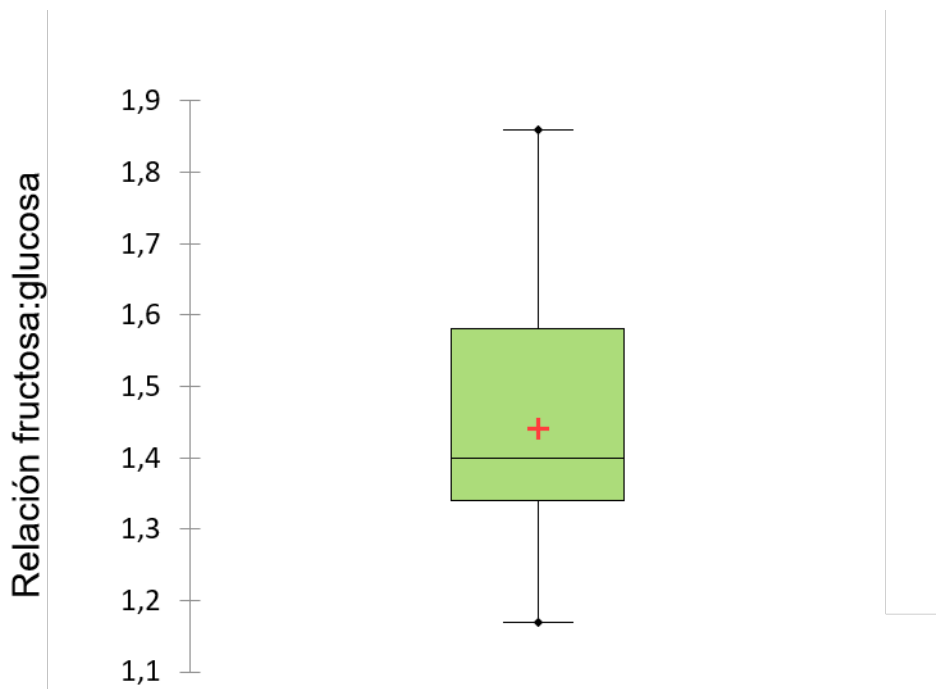
limón						
Agua saborizada pomelo	JMAF y/o Azúcar	16	7,3 ± 0,8	8,59 ± 0,06	15,9 ± 0,7 (99)	1,18± 0,12
<b>Compañía Multinacional D</b>						
Agua saborizada limón	JMAF o Azúcar	7,8	2,9 ± 0,2	4,6 ± 0,2	7,4 ± 0,1 (95)	1,59± 0,13
<b>Compañía multinacional E</b>						
Agua saborizada naranja-durazno	JMAF	7,2	2,1 ± 0,1	2,9 ± 0,2	5,0 ± 0,1 (70)	1,38± 0,16
Agua saborizada naranja	JMAF	7,2	2,2 ± 0,2	3,0 ± 0,4	5,2 ± 0,6 (72)	1,36± 0,22
Agua saborizada pomelo	JMAF	7	2,3 ± 0,2	3,9 ± 0,1	6,2 ± 0,1 (89)	1,69± 0,15
Agua saborizada manzana	JMAF	7	2,1 ± 0,2	3,9 ± 0,2	6 ± 0,1 (85)	1,86± 0,20
<b>Compañía Nacional A</b>						
Agua saborizada naranja	JMAF	9,2	3,5 ± 0,1	4,9 ± 0,1	8,5 ± 0,0 (92)	1,40± 0,05
<b>Compañía Nacional B</b>						
Gaseosa naranja	JMAF y/o Azúcar	25	6,2 ± 0,5	7,6 ± 0,3	13,9 ± 0,1 (56)	1,23± 0,11
<b>Compañía Nacional C</b>						
Agua saborizada guaraná	Azúcares (JMAF)	17	7,4 ± 0,0	11,7 ± 0,0	19,1 ± 0,0 (112)	1,58± 0,00
Gaseosa cola	Azúcares (JMAF)	19	9,3 ± 0,6	14,3 ± 0,2	23,6 ± 0,3 (124)	1,54± 0,10
Gaseosa naranja	Azúcares (JMAF)	22	10,4 ± 0,8	14,0 ± 0,1	24,5 ± 0,7 (110)	1,35± 0,10

Fru: fructosa; Glu: Glucosa; JMAF: Jarabe de maíz de alta fructosa.

\* Porcentaje del total de azúcares declarados en la etiqueta de información nutricional.

Como se mencionó arriba, el JMAF-55 es el edulcorante de elección en la fabricación de refrescos. Este jarabe se encuentra conformado por un 55% de fructosa, un 41% de glucosa y un 4% de otros azúcares, por lo que la relación fructosa: glucosa esperada es de 1,34. La Figura 1 muestra la relación fructosa: glucosa obtenida mediante análisis de los refrescos endulzados exclusivamente con JMAF. El diagrama de cajas exhibe un sesgo de los datos hacia la derecha, con un valor medio de 1,4 y un promedio de 1,43. El primer cuartil del conjunto de datos presenta un valor de 1,34, el cual coincide con la relación esperada para la utilización de JMAF-55 como edulcorante. Por lo tanto, se puede inferir que en el 75% de las bebidas endulzadas con JMAF la relación fructosa: glucosa es mayor a la esperada.

**Figura 1.** Relación fructosa: glucosa determinada en los refrescos endulzados exclusivamente con JMAF.





## DISCUSIÓN

Según nuestro conocimiento, este es el primer estudio que emplea un ensayo enzimático-colorimétrico para cuantificar fructosa y glucosa en refrescos. Los resultados del protocolo de validación muestran que este método es adecuado para dicho propósito. Este método presenta la ventaja de ser específico, económico y de no requerir equipamiento sofisticado.

El análisis del rotulado nutricional muestra que en el 63% de las bebidas analizadas, el tipo de edulcorante utilizado por el fabricante resulta indeterminado. A pesar de que estas prácticas de etiquetado nutricional pueden deberse al aprovechamiento de las fluctuaciones de precios y disponibilidad de los edulcorantes, también podrían ser consecuencia de la mala prensa del JMAF. En un trabajo publicado en 2004<sup>22</sup>, la utilización de JMAF se propuso como causal de la epidemia de la obesidad. Este estudio fue el disparador de una gran controversia. Aunque existe evidencia que indica que el JMAF es metabólicamente distinto que la sacarosa y que posee efectos más perjudiciales para la salud<sup>23-26</sup>, otros estudios se contraponen a estos hallazgos<sup>27,28</sup>. Las proporciones de fructosa y glucosa expresadas como porcentaje del total de azúcares en bebidas endulzadas con JMAF también ha sido tema de debate. Algunas investigaciones demostraron que la relación de fructosa: glucosa es mayor a la esperada en bebidas endulzadas con JMAF, encontrándose relaciones de 60:40<sup>29,30</sup>. Estos resultados han sido criticados, argumentando que la metodología implementada para la determinación de estos azúcares (AOAC 977.20) está destinada a la separación de sacarosa, fructosa y glucosa de la miel y no permite detectar maltosa y otros azúcares<sup>31</sup>, provocando una distribución inadecuada de los carbohidratos. En este sentido, cuando se utiliza el método AOAC 979.23 (carbohidratos en jarabe de maíz)<sup>32</sup>, el porcentaje de fructosa de los azúcares totales concuerda con el valor esperado (55,58%). Más allá de esta controversia, que se focaliza en cómo expresar la proporción de fructosa y glucosa respecto al total de azúcares, se conoce con certeza que en el JMAF-55 la relación fructosa: glucosa esperada es de 1,34. En este trabajo utilizamos un ensayo enzimático-colorimétrico que no permite detectar sacarosa, maltosa y otros azúcares. Sin embargo, el método es muy específico para detectar fructosa y glucosa, y por lo tanto permite calcular la relación fructosa: glucosa. Nuestros resultados muestran que en el 75% de las bebidas endulzadas con JMAF analizadas, la relación fructosa: glucosa es mayor a la esperada, lo que concuerda con los mencionados estudios previos<sup>29,30</sup>. El rotulado nutricional ambiguo y la variedad de composiciones detectadas, evidencian que el consumo de fructosa proveniente de bebidas azucaradas no puede estimarse a partir del etiquetado.

## **CONCLUSIÓN**

El contenido de fructosa en bebidas azucaradas puede determinarse fácilmente mediante la utilización de un método enzimático-colorimétrico. Considerando los efectos perjudiciales, ampliamente documentados, del consumo excesivo de fructosa sobre la salud, y la controversia existente acerca de la diferencia metabólica entre el consumo de JMAF y de sacarosa, creemos que es necesario investigar en mayor profundidad el efecto de dosis-respuesta del consumo de fructosa sobre distintos factores de riesgo cardiometabólico. El método validado en este trabajo es rápido, económico y adecuado para medir el contenido de fructosa y glucosa en bebidas azucaradas.

## **CONTRIBUCIÓN DE AUTORÍA**

LO realizó la búsqueda bibliográfica, realizó los experimentos, contribuyó a la discusión de resultados y redactó el manuscrito; MFH realizó los experimentos y contribuyó a la discusión de los resultados; BP contribuyó a la discusión de resultados, SMG contribuyó al diseño del estudio y discusión de los resultados; MPM contribuyó al diseño del estudio, discusión de resultados y redacción del manuscrito.

## **FINANCIACIÓN**

Este trabajo fue subsidiado por la Universidad Nacional de La Plata (código del proyecto: M196).

## **CONFLICTO DE INTERESES**

Los autores expresan que no existen conflictos de interés al redactar el manuscrito.

## REFERENCIAS

- (1) De Lorenzo A, Gratteri S, Gualtieri P, Cammarano A, Bertucci P, Di Renzo L. Why primary obesity is a disease? *J Transl Med.* 2019;17(1).
- (2) OMS. Obesidad y sobrepeso. Datos y cifras. 2020. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
- (3) Tobias DK, Hu FB. The association between BMI and mortality: implications for obesity prevention. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2018;6(12):916–917.
- (4) Abarca-Gómez L, Abdeen ZA, Hamid ZA, et al. Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016. *Lancet.* 2017;390:2627–2642.
- (5) INDEC, . S de G de S. 4° Encuesta Nacional de Factores de Riesgo. 1a ed. (Todesca J, ed.). Ciudad Autónoma de Buenos Aires; 2019.
- (6) Malik VS. Sugar sweetened beverages and cardiometabolic health. *Curr Opin Cardiol.* 2017;32(5):572–579.
- (7) Hu FB. Resolved: There is sufficient scientific evidence that decreasing sugar-sweetened beverage consumption will reduce the prevalence of obesity and obesity-related diseases. *Obes Rev.* 2013;14(8):606–619.
- (8) Te Morenga LA, Howatson AJ, Jones RM, Mann J. Dietary sugars and cardiometabolic risk: Systematic review and meta-analyses of randomized controlled trials of the effects on blood pressure and lipids. *Am J Clin Nutr.* 2014;100(1):65–79.
- (9) Morenga L Te, Mallard S, Mann J. Dietary sugars and body weight: Systematic review and meta-analyses of randomised controlled trials and cohort studies. *BMJ.* 2013;345(7891).
- (10) Vartanian LR, Schwartz MB, Brownell KD. Effects of soft drink consumption on nutrition and health: A systematic review and meta-analysis. *Am J Public Health.* 2007;97(4):667–675.
- (11) Euromonitor International. Carbonates in Argentina. 2017. Disponible en: <http://www.euromonitor.com/carbonates-in-argentina/report>. Último acceso: 16/06/2017.
- (12) Carmuega E. Perfil de ingesta de líquidos. Situación de la Argentina en el contexto Latino Americano. 2013:1–33.
- (13) Kovalskys I, Cavagnari BM, Favieri A, et al. Main sources of added sugars in Argentina. *Medicina (B Aires).* 2019;79(5):358–366.
- (14) White JS. Sucrose, HFCS, and fructose: History, manufacture, composition, applications, and production. En: *Fructose, High Fructose Corn Syrup, Sucrose and Health.* Springer New York; 2014:13–33.

- (15) Santillán-Fernández A, García-Chávez L, Vásquez-Bautista N, et al. Impacto de la sustitución del azúcar de caña por edulcorantes de alta intensidad en México. 1ra ed. México; 2017.
- (16) Hannou SA, Haslam DE, McKeown NM, Herman MA. Fructose metabolism and metabolic disease. *J Clin Invest*. 2018;128(2):545–555.
- (17) Zhang DM, Jiao RQ, Kong LD. High dietary fructose: Direct or indirect dangerous factors disturbing tissue and organ functions. *Nutrients*. 2017;9(4).
- (18) Hernández-Díazcouder A, Romero-Nava R, Carbó R, Sánchez-Lozada LG, Sánchez-Muñoz F. High Fructose Intake and Adipogenesis. *Int J Mol Sci*. 2019;20(11).
- (19) Stanhope KL. Sugar consumption, metabolic disease and obesity: The state of the controversy. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2016;53(1):52–67.
- (20) ANMAT. Capítulo V: Normas Para La Rotulación Y Publicidad De Los Alimentos. Código Aliment Argentino. 2017.
- (21) Charneck, Simon J., Daverede, Christine., Galant, Patrick., McCleary B V. Megazyme “Advanced” Wine Test Kits General characteristics and validation. *Rev des Oenologues*. 2006;120.
- (22) Bray GA, Nielsen SJ, Popkin BM. Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. *Am J Clin Nutr*. 2004;79(4):537–543.
- (23) Sadowska J, Bruszkowska M. Assessing the effect of sugar type and form of its intake on selected parameters of carbohydrate-lipid metabolism and plasma atherogenic indices in rats. *Rocz Panstw Zakl Hig*. 2019;70(1):59–67.
- (24) Goran MI, Ulijaszek SJ, Ventura EE. High fructose corn syrup and diabetes prevalence: A global perspective. *Glob Public Health*. 2013;8(1):55–64.
- (25) Mock K, Lateef S, Benedito VA, Tou JC. High-fructose corn syrup-55 consumption alters hepatic lipid metabolism and promotes triglyceride accumulation. *J Nutr Biochem*. 2017;39:32–39.
- (26) Stanhope KL, Havel PJ. Endocrine and metabolic effects of consuming beverages sweetened with fructose, glucose, sucrose, or high-fructose corn syrup. *Am J Clin Nutr*. 2008;88(6).
- (27) White JS. Straight talk about high-fructose corn syrup: What it is and what it ain't. *Am J Clin Nutr*. 2008.
- (28) Rippe JM, Angelopoulos TJ. Sucrose, High-Fructose Corn Syrup, and Fructose, Their Metabolism and Potential Health Effects: What Do We Really Know? *Adv Nutr*. 2013;4(2):236–245.
- (29) Ventura EE, Davis JN, Goran MI. Sugar content of popular sweetened beverages based on objective laboratory analysis: Focus on fructose content. *Obesity*. 2011;19(4):868–874.

- (30) Walker RW, Dumke KA, Goran MI. Fructose content in popular beverages made with and without high-fructose corn syrup. *Nutrition*. 2014;30(7–8):928–935.
- (31) Hobbs LJ, Krueger D. Response to “response to the letter regarding ‘sugar content of popular sweetened beverages’”. *Obesity*. 2011;19(4):688.
- (32) White JS, Hobbs LJ, Fernandez S. Fructose content and composition of commercial HFCS-sweetened carbonated beverages. *Int J Obes*. 2015;39(1):176–182.