



---

---

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE  
HIDALGO**

**INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA  
ÁREA ACADÉMICA DE QUÍMICA**

**Desarrollo de un método espectrofotométrico para  
determinar ciclamato por degradación de antocianinas**

**TESIS**

Que para obtener el grado de:

**LICENCIADA DE QUÍMICA EN ALIMENTOS**

Presenta:

**Karla Itzel De Jesús Fuentes**

Asesora:

**Dra. Araceli Castañeda Ovando**

Mineral de la Reforma, Hgo.

Junio de 2015.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO  
INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA  
Licenciatura de Química en Alimentos

**M. en A. JULIO CÉSAR LEINES MEDÉCIGO,  
DIRECTOR DE CONTROL ESCOLAR  
DE LA U.A.E.H.,  
Presente:**

Por este conducto le comunico que el jurado asignado a la pasante de la Licenciatura de Química en Alimentos **Karla Itzel De Jesús Fuentes**, quien presenta el trabajo de investigación **“Desarrollo de un método espectrofotométrico para determinar ciclamato por degradación de antocianinas”**, después de revisar el trabajo en reunión de Sinodales, estos han decidido autorizar la impresión del mismo, hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación se anotan las firmas de conformidad de los integrantes del Jurado:

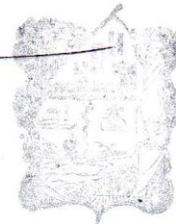
Presidente	<b>Dr. Javier Añorve Morga</b>
Primer vocal	<b>Dra. Araceli Castañeda Ovando</b>
Segundo vocal	<b>Dra. Judith Jaimez Ordaz</b>
Tercer vocal	<b>Dr. Gian Arturo Álvarez Romero</b>
Secretario	<b>Dra. Elizabeth Contreras López</b>
Primer suplente	<b>Dr. Luis Guillermo González Olivares</b>
Segundo suplente	<b>Dra. Silvia Nieto Velázquez</b>

Sin otro particular, reitero a usted la seguridad de mi atenta consideración.

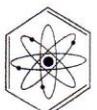
ATENTAMENTE  
“Amor, Orden y Progreso”  
Pachuca Hidalgo, 4 de junio de 2015.

Dr. Gian Arturo Álvarez Romero  
Coordinador Adjunto de la Licenciatura de  
Química en Alimentos

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE HIDALGO



CENTRO DE INVESTIGACIONES  
QUÍMICAS



Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería,  
Carretera Pachuca - Tulancingo Km. 4.5, Ciudad del Conocimiento,  
Colonia Carboneras, Mineral de la Reforma, Hidalgo, México, C.P. 42184  
Tel. +52 771 7172000 ext. 2518  
cgomez@uaeh.edu.mx



El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Físicoquímica de Alimentos 2 del Área Académica de Química de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

## **Agradecimientos**

*Quiero agradecer a todas las personas que han hecho posible este logro, que creyeron en mí y que siempre estuvieron a mi lado.*

*A mi madre por ser siempre la que me motiva y apoya, la que me anima con su ejemplo a dar lo mejor de mí cada día, a jamás conformarme y siempre encontrar lo positivo de cada experiencia.*

*A mi padre que siempre mostró confianza en que era capaz de lograr lo que me propusiera y que me ayudó cuando lo necesite.*

*A mis mejores amigos Fer y Lucero por ser como mis hermanos y siempre tener tiempo para escucharme y sacarme una sonrisa en los momentos de felicidad y desesperación.*

*También JC gracias por compartir experiencias y apoyarme todos estos años.*

*A mi asesora la Dra. Araceli por su confianza, compartir sus conocimientos, ayudarme durante mi formación profesional y brindarme su amistad.*

*A mi tutor el Dr. Añorve por apoyarme y siempre estar pendiente de mi desarrollo en la universidad, fue un gran consejero.*

*A mis compañeros de la carrera, con los que compartí muchas experiencias que nos harán mejores como personas y profesionistas, gracias a todos por compartir esas horas de laboratorio, esas desveladas haciendo trabajos y reportes que parecían eternos y por siempre compartir aquellas bromas que hacían más llevadero el día a día.*

*De igual manera quiero agradecer a mis amigos, los exploradores de Yucatán, mi familia de Mérida, con la que compartí una de las mejores experiencias de mi vida. A mi roomie Gabby por brindarme su amistad y siempre tener esa actitud tan positiva, que aun ahora, alegra mis días. A Oscar de Chihuahua por ser un gran amigo que siempre compartió su curiosidad y gusto por el estudio de los alimentos; y a César por hacer que mi vida cambiara en Mérida, por lograr que viera las cosas de manera diferente y porque hoy sigue haciéndome feliz.*

*Y finalmente quiero agradecer a Omalley quien me acompañó durante doce años de mi vida y desafortunadamente tuvo que partir, gracias acompañarme en esas desveladas y brindarme tu cariño incondicional.*

# Índice general

1. Introducción .....	1
2. Antecedentes.....	2
2.1. Edulcorantes .....	2
2.1.1. Aspectos generales.....	2
2.1.2. Clasificación.....	2
2.1.3. Ciclamatos .....	4
2.1.3.1. Propiedades fisicoquímicas .....	5
2.1.3.2. Edulcorantes utilizados en sinergismo con ciclamatos .....	6
<b>Acesulfame K</b> .....	7
<b>Aspartame</b> .....	7
<b>Sacarina</b> .....	8
<b>Sucralosa</b> .....	9
<b>Taumatina</b> .....	9
2.1.3.3. Métodos de determinación de ciclamatos .....	10
2.2. Antocianinas .....	10
2.2.1. Degradación de las antocianinas .....	12
3. Objetivos .....	14
3.1. General .....	14
3.2. Específicos .....	14
4. Metodología experimental .....	15
4.1. Reactivos y equipo .....	15
4.1.1. Reactivos .....	15
4.1.2. Equipo.....	15
4.2. Extracto de antocianinas .....	15
4.2.1. Preparación.....	15
4.2.2. Determinación de antocianinas monoméricas.....	16
4.3. Desarrollo de un método para determinar ciclamato .....	16

4.3.1.	Estudio de las condiciones de trabajo .....	17
4.3.1.1.	Preparación del hidrolizado de ciclamato .....	17
4.3.1.2.	Interacción directa de ciclamato con antocianinas .....	17
4.3.1.3.	Interacción de antocianinas con el exceso de nitrito .....	18
4.3.1.4.	Concentración óptima de nitrito .....	18
4.3.1.5.	Tiempo óptimo de reacción .....	18
4.3.1.6.	Temperatura óptima .....	18
4.3.1.7.	Efecto de edulcorantes sinérgicos .....	19
4.3.2.	Determinación de ciclamato .....	20
4.3.2.1.	Curvas de calibración .....	20
4.3.2.2.	Porcentaje de recuperación del método propuesto .....	20
4.3.3.	Evaluación del porcentaje de recuperación del método oficial .....	20
4.3.4.	Análisis de muestras reales .....	21
4.3.4.1.	Muestras .....	21
4.3.4.2.	Análisis .....	21
4.3.5.	Análisis de datos .....	22
5.	Resultados y discusión .....	23
5.1.	Contenido de antocianinas monoméricas .....	23
5.2.	Interacción del ciclamato con antocianinas .....	23
5.3.	Interacción del exceso de ácido nitroso con antocianinas .....	24
5.4.	Determinación del tiempo óptimo de reacción .....	26
5.5.	Determinación de la temperatura óptima de reacción .....	27
5.6.	Efecto de la concentración de ion nitrito .....	28
5.7.	Validación del método .....	30
5.8.	Efecto de los edulcorantes sinérgicos .....	32
5.9.	Muestras reales .....	34
6.	Conclusiones .....	36
	Referencias .....	37

## **1. Introducción**

El ciclamato y sus sales de sodio y calcio son considerados aditivos y han sido utilizados desde la década de los 50's. Estos se usan como edulcorantes y se añaden a los alimentos como suplemento de la sacarosa, debido a que presentan bajo contenido calórico y un poder edulcorante mayor que este azúcar. Algunas veces se emplea en edulcorantes de mesa con la sacarina (Perez, *et al.*, 2011).

El ciclamato en el intestino, puede dar origen a la formación de la ciclohexilamina, compuesto tóxico, que podría provocar en algunas personas los siguientes efectos crónicos en la salud: cáncer de colon, alteraciones en la síntesis de hormonas tiroideas y atrofia en el hígado y riñón.

Para determinar la presencia de estos compuestos en bebidas y otros alimentos existen diversos métodos, sin embargo, estos métodos son complejos, invierten demasiado tiempo en la determinación y usan productos costosos y tóxicos para el medio ambiente.

Por ello, el objetivo de la presente investigación es desarrollar un método para la determinación de ciclamatos en edulcorantes de mesa, haciendo uso de antocianinas provenientes del extracto de flor de Jamaica (*Hibiscus subdariffa L.*). Este método se basa en la hidrólisis del ciclamato para generar iones sulfito ácido, los cuales reaccionan con ácido nitroso; el exceso de éste último se utiliza para reaccionar con las antocianinas, que sufren una degradación del color. Esta reacción permite realizar la determinación indirecta de ciclamato midiendo la decoloración, por medio de espectrofotometría UV-vis.

El método que se propone presenta notables ventajas sobre el método oficial (AOAC), debido a que la determinación se lleva a cabo en un tiempo más corto, se usa extracto de flor de Jamaica que es económico y de fácil preparación, además de que se utiliza menor cantidad de reactivos, lo que genera menos residuos y lo hace más amigable con el ambiente.

## **2. Antecedentes**

### **2.1. Edulcorantes**

#### **2.1.1. Aspectos generales**

Los edulcorantes son agentes que producen un sabor dulce, propiedad sensorial que le da a ciertos alimentos gran aceptación entre los consumidores. El edulcorante más utilizado es la sacarosa, ya que se adiciona o está presente en los alimentos de forma natural. Por ello la sacarosa, es el edulcorante modelo para determinar la capacidad edulcorante o poder edulcorante (PE) y se le asigna un valor de 1. El poder edulcorante hace referencia a la capacidad de una sustancia para causar un sabor dulce (Badui, 2006).

La sacarosa es un edulcorante que debe consumirse de forma regulada o restringida, debido a que es una fuente de glucosa, y existen enfermedades que se asocian al consumo de productos con alto contenido de la misma. Algunas de estas enfermedades son diabetes mellitus tipo dos, obesidad y afecciones cardiovasculares (Malik *et al.*, 2010).

La sacarosa se ha ido sustituyendo por otros edulcorantes a los que se les denomina como no nutritivos, que pueden ser naturales o sintéticos, y que ofrecen un sabor dulce sin aporte de glucosa. Sin embargo, la sustitución por los edulcorantes sintéticos a veces no es sencilla, ya que la sacarosa tiene en ocasiones otras funciones en el alimento como agente conservador o texturizante, como es el caso de las mermeladas (Badui, 2006).

Existe una gran variedad de edulcorantes sintéticos, pero sólo se permite el uso de algunos; los que se usan comúnmente son el acesulfame K, aspartame, ciclamato, sacarina y sucralosa (Choi, Hsu, & Wong, 2000).

#### **2.1.2. Clasificación**

Generalmente los edulcorantes pueden dividirse en nutritivos y no nutritivos. La sacarosa es el principal edulcorante natural que se usa en la industria alimentaria y es considerada como un edulcorante nutritivo, en este grupo también

se encuentran los edulcorantes sacáridos (fructosa, glucosa, galactosa, lactosa) y los no sacáridos (xilitol, sorbitol y palatina) (Fatibello *et al.*, 1996).

Por otro lado dentro de los edulcorantes no nutritivos se encuentran los naturales y sintéticos, los cuales son clasificados según su origen (Fatibello *et al.*, 1996).

Los edulcorantes no nutritivos naturales se obtienen a partir de plantas, éstos tienen un alto PE y son considerados como una alternativa más segura que los edulcorantes artificiales (Alonso, 2010). En la Tabla 1, se mencionan algunos de los edulcorantes naturales más comunes con algunas de sus características.

**Tabla 1.** Edulcorantes naturales, y algunas de sus características

<b>Edulcorante</b>	<b>Fuente</b>	<b>PE</b>	<b>IDA</b>	<b>Referencias</b>
<b>Neohesperidina (dihidrochalconas)</b>	Naranja amarga ( <i>Citrus aurantium</i> )	1800	5 mg/kg/pc	(Borrego <i>et al.</i> , 1993)
<b>Esteviósidos</b>	<i>Stevia rebaudiana Bertoni</i>	300	4 mg/kg/pc	(Abou-Arab <i>et al.</i> , 2010)
<b>Glicirricina</b>	Palo dulce u orozú ( <i>Glycyrrhiza glabra</i> )	60	9 mg/kg/pc	(Ishizawa <i>et al.</i> , 1995)
<b>Jarabe de maíz de alta fructosa</b>	Dextrosa del almidón de maíz	130	GRAS	(Alonso, 2010), (Codex Alimentarius, 2014)
<b>Taumatina</b>	Katemphe ( <i>Thaumatococcus daniellii</i> B.)	1600	2 mg/kg/pc	(Alonso, 2010)

GRAS= Generalmente Reconocido como Seguro o por sus siglas en inglés Generally Recognized As Safe, IDA= Ingesta Diaria Admisible, PE= Poder Edulcorante

Por otro lado, los edulcorantes no nutritivos sintéticos son de origen artificial, creados por síntesis química. Son no calóricos y por ello se ha generalizado su uso para la producción de alimentos y endulzantes bajos en

calorías. Estos productos son principalmente enfocados a consumidores diabéticos u obesos que deben restringir su ingesta de carbohidratos, aunque su consumo ya se ha hecho general (Echavarría & Velasco, 2011).

El uso de edulcorantes sintéticos ha causado gran controversia debido a que se ha demostrado que algunos de ellos son cancerígenos y dañan seriamente a la salud del consumidor (Giannuzzi & Molina, 1995). En la Tabla 2 se mencionan los edulcorantes artificiales más utilizados y algunas de sus características.

**Tabla 2.** Edulcorantes sintetizados químicamente y algunas de sus características

<b>Edulcorante</b>	<b>PE</b>	<b>IDA</b>	<b>Referencias</b>
<b>Acesulfame K</b>	200	15 mg/kg/pc	(Giannuzzi & Molina, 1995)
<b>Aspartame</b>	200	50 mg/kg/pc	(Raben <i>et al.</i> , 2002)
<b>Ciclamato</b>	30-50	11 mg/kg/pc	(Choi, Hsu & Wong, 2000)
<b>Sacarina</b>	300	5 mg/kg/pc	(Echavarría & Velasco, 2011)
<b>Sucralosa</b>	600	15 mg/kg/pc	(Raben, Vasilaras, Moller & Astrup, 2002)
<b>Derivados de triptófano</b>	25-50	30 mg/kg/pc	(Alonso, 2010)

### **2.1.3. Ciclamatos**

El ciclamato fue sintetizado por primera vez en 1937 por Michael Sveda, durante décadas fue utilizado y recomendado para personas con diabetes ya que no podían hacer uso de productos con sacarosa. En 1958 se le dio la clasificación de aditivo GRAS (Generally Recognized As Safe) y se incrementó dramáticamente su consumo. Por ello se comenzaron a hacer estudios sobre su toxicidad, revelando que el ciclamato es carcinogénico debido a la formación del metabolito ciclohexilamina en el intestino, lo que provocó que en 1970 se restringiera su uso (O'Brien, 2012).

Sin embargo, hay países en donde aún se utiliza, como en China, Indonesia, Australia, Nueva Zelanda y la Unión Europea (Ni *et al.*, 2009). Actualmente se permite en los productos alimenticios una cantidad de hasta 400 mg/kg de ciclamato de sodio (CODEX Alimentarius CX/FA 12/44/2)

Los ciclamatos son sales (de sodio o de calcio) del ácido ciclohexilsulfámico, se emplean como aditivo alimentario fungiendo como edulcorantes. El ciclamato de sodio es muy estable, ya que no se ve afectado por cambios en la temperatura, ni acidez y es considerablemente más dulce que el ciclamato de calcio (O'Brien Nabors, 2012).

El Codex Alimentarius, en su 26<sup>a</sup> reunión, estableció para el ciclamato y sus sales una IDA de 0-11 mg/kg/pc basado en los efectos carcinogénicos que tienen sobre animales, debido a la formación del metabolito ciclohexilamina (Pérez *et al.*, 2011).

La ciclohexilamina se puede formar en el intestino, ya que sólo el 37% del ciclamato que se consume es absorbido por este órgano y el resto es metabolizado por la flora nativa. Además de que se ha demostrado que la ciclohexilamina puede provocar alergias y alterar la síntesis de hormonas tiroideas en humanos (Alonso, 2010).

### **2.1.3.1. Propiedades fisicoquímicas**

Desde el punto de vista físico, el ciclamato es un polvo blanco, cristalino, inodoro, de sabor dulce con un PE de 30-50. Tiene una solubilidad en agua de 210 g/L, pero es insoluble en benceno, cloroformo, etanol y éter dietílico (Badui, 2006).

Su nombre químico corresponde al ácido ciclohexilsulfámico, sal monosódica, su fórmula química es  $C_6H_{12}NO_3S \cdot Na$  con un peso molecular de 201.2 g/mol (Figura 1) Desde el punto de vista químico, la molécula se produce por sulfonación de la ciclohexilamina (Perez *et al.*, 2011).

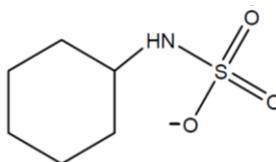


Figura 1. Estructura química de los ciclamatos.

### 2.1.3.2. Edulcorantes utilizados en sinergismo con ciclamatos

El efecto sinérgico hace referencia a la combinación de dos o más edulcorantes para incrementar su PE, lo cual se logra debido a que los edulcorantes mezclados son detectados por sitios diferentes del receptor sensorial. El aumento en el PE no podría alcanzarse de manera individual, debido a que cuando dos edulcorantes se mezclan, el dulzor se incrementa y además es diferente (Grenby, 1996).

El sinergismo en los edulcorantes es mayor mientras menor sea el nivel de dulzor y va disminuyendo conforme se va aumentando el dulzor debido a las características de los edulcorantes no calóricos (O'Donnell & Kearsley, 2012).

Debido a su sabor amargo y al mismo tiempo salado, el ciclamato suele mezclarse con otros edulcorantes, principalmente sacarina, aspartame y acesulfame K. Con los últimos, se ha encontrado que el ciclamato muestra un efecto sinérgico aumentando en un 25% su PE mientras que al combinarlo con la sacarina aumenta un 24% (O'Donnell & Kearsley, 2012). En la Tabla 3 se muestra el sinergismo del ciclamato con otros edulcorantes.

Tabla 3. Sinergismo de ciclamato con otros edulcorantes (Grenby, 1996; O'Donnell & Kearsley, 2012).

Edulcorante	Proporción (mg de ciclamato/ mg de edulcorante)	Porcentaje de aumento en el PE
Acesulfame K	1:6	36%
Aspartame	1:4.5	26%
Sacarina	10:1	24%
Sucralosa	1:1.5	17%
Taumantina	NR	19%

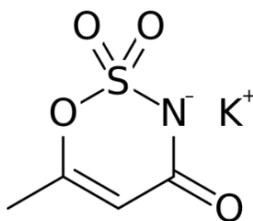
NR= no reportado.

## **Acesulfame K**

El acesulfame K fue descubierto accidentalmente en 1967 por Karl Kraus y Harald Jensen, hoy es uno de los edulcorantes más importantes utilizados en productos alimenticios (O'Donnell & Kearsley, 2012).

El acesulfame K es un polvo blanco cristalino y posee un sabor dulce muy fuerte. Es muy soluble en agua y etanol, tiene un PE de 200 y una IDA de 15 mg/kg/pc. Es utilizado como edulcorante en gran variedad de alimentos debido a su alto nivel de estabilidad a altas temperaturas, se usa comúnmente en productos como mermeladas, bebidas, confitados, edulcorantes de mesa, entre otros (O'Brien, 2012).

En México está permitido el uso de este como edulcorante con un límite de 350mg/L (NOM-218-SSA1-2011). Su estructura química se presenta en la Figura 2.



**Figura 2.** Estructura química del acesulfame K.

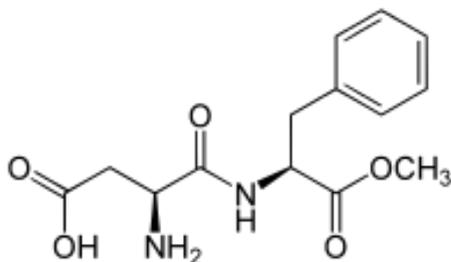
## **Aspartame**

Fue descubierto en 1965 por los laboratorios G.D. Searle. Es un edulcorante producido a partir de L-fenilalanina y L-ácido aspártico unidos por un enlace éster (Mitchell, 2006).

Es un polvo blanco cristalino, inodoro con un sabor dulce muy intenso. Es muy soluble en agua y en etanol, tiene un PE de 200 y una IDA de 50 mg/kg/pc (Mitchell, 2006).

En México se permite su uso como sustituto de azúcar, con un límite máximo de 350mg/L en bebidas, jarabes, concentrados entre otros (NOM-218-

SSA1-2011). En la Figura 3 se presenta la estructura química del aspartame (Gayol, 2003).

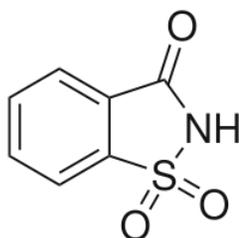


**Figura 3.** Estructura química del aspartame.

### **Sacarina**

La sacarina fue descubierta en 1879 por Remsen y Fahlberg, fue el primer compuesto orgánico con sabor dulce más potente que la sacarosa (O'Brien, 2012). Está disponible de forma comercial como sales de sodio y calcio, además de su forma ácida. Es un polvo blanco, cristalino, muy soluble en agua, con una solubilidad de 1200 g/L, aunque su forma ácida es muy poco soluble. Tiene un PE de 300 y una IDA establecida de 5 mg/kg/pc, la sal más utilizada en alimentos es la sal sódica, que generalmente es empleada con ciclamato de sodio. Es usada en diversos alimentos como jugos, gelatinas, postres, helados, entre otros (O'Donnell & Kearsley, 2012).

En México se permite el uso de 30mg de sacarina por porción de alimentos y de 400mg por kg en bebidas no alcohólicas (NOM-086-SSA1-1994). En la Figura 4 se presenta la estructura química de la sacarina.



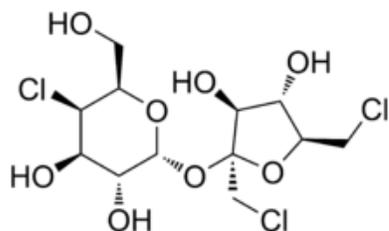
**Figura 4.** Estructura química de la sacarina.

## Sucralosa

Es uno de los edulcorantes de uso más reciente en la industria alimentaria. Como es un derivado de la sacarosa se le considera no carcinogénico. Posee un PE de 600 y un IDA de 15mg/kg/pc. Es un aditivo alimentario que presenta buena solubilidad en agua; además de gran estabilidad en alimentos procesados (O'Donnell & Kearsley, 2012).

En combinación con otros edulcorantes presenta sinergismo y es muy utilizado en bebidas, productos de frutas como mermeladas y jaleas, productos lácteos, helados y como edulcorante de mesa (International Sweeteners Association, 2010).

En México se ha establecido un límite máximo de 0.1% para su uso en cereales para desayuno, 0.065% en mezclas para productos de panadería y 0.15% en edulcorantes de mesa (NOM-086-SSA1-1994). Su estructura química se muestra en la Figura 5



**Figura 5.** Estructura química de la sucralosa.

## Taumatina

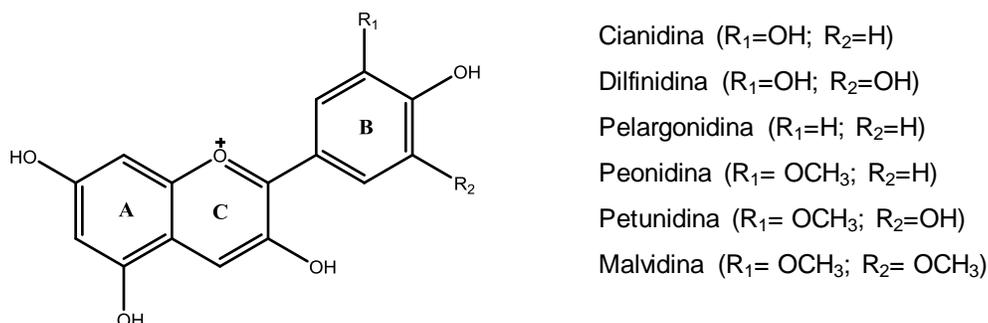
La taumatina es un conjunto de polipéptidos extraídos de la pulpa de la planta conocida como katempe (*Thaumatococcus daniellii Benth*) originaria de África. Fue utilizada en Japón por primera vez hasta 1979 como edulcorante. Es considerada la sustancia más dulce que existe, con un PE 1600. Tiene un peso molecular de 22000 y está conformada por 207 aminoácidos, estando ausente la histidina. Es termoestable, es considerada inocua, no es teratogénica, ni mutagénica y su IDA es de 2mg/kg/pc (Alonso, 2010).

### 2.1.3.3. Métodos de determinación de ciclamatos

En la literatura se reportan una gama de métodos para la determinación de ciclamatos estos se resumen en la Tabla 4, donde se indican el tipo de muestras en las que fueron aplicados.

## 2.2. Antocianinas

Las antocianinas son glucósidos de antocianidinas que se encuentran presentes en tejidos vegetales, incluyendo flores y frutos, proporcionándoles un color de amarillo a azul (Ramos, Schmitt, & Gómez, 2006), probablemente son el grupo más importante de pigmentos vegetales visibles, además de la clorofila, son pertenecientes a la familia de los flavonoides, compuestos por dos anillos aromáticos A y B unidos por una cadena de 3 carbonos. Las variaciones del anillo B dan como resultado las seis principales antocianidinas que se presentan en la figura 6 (Garzon, 2008).



**Figura 6.** Estructura química de las antocianinas principales.

La estructura y estabilidad de las antocianinas se ven afectadas por el pH. La acidez posee un efecto protector sobre la molécula en soluciones acuosas con pH por debajo de 2, ya que las antocianinas se encuentran en su forma más estable como catión flavilio que es de un color rojo intenso (Garzon, 2008).

**Tabla 4.** Métodos empleados para la determinación de ciclamato en alimentos.

<b>Técnica</b>	<b>LOD</b>	<b>Ventajas</b>	<b>Desventajas</b>	<b>Otros edulcorantes determinados</b>	<b>Referencias</b>
Electroforesis capilar acoplada a detección por conductividad	5-10 µg/g	Aplicable a muestras sólidas y líquidas	Uso de equipo muy costoso para la determinación	Aspartame, sacarina y acesulfame K	(Masao <i>et al.</i> , 2007)
Espectrometría Raman con Transformada de Fourier	0.8 mg/g	Método más rápido que HPLC. Sin uso de solventes	No viable para muestras con monohidrato de glucosa	Sacarina	(Armenta <i>et al.</i> , 2004)
HPLC/MS	25 µm/L	Método preciso y versátil. Aplicable a bebidas	Uso de equipo costoso Tratamiento de la muestra	Acesulfame K, aspartame, alitame, sacarina, dulcina, neotame, sucralosa	(Zygler <i>et al.</i> , 2011)
Cromatografía de gases con detector de ionización de llama, headspace y microextracción de gota	5 µmol/L	Método preciso. Aplicable a edulcorantes de mesa y bebidas	Uso de Equipo costoso Tratamiento de la muestra		(Hashemi <i>et al.</i> , 2011)
Turbidimetría con inyección en flujo	0.02% w/v	Aplicable a bebidas y edulcorantes de mesa	Tiempo muy largo para la determinación		(Llamas <i>et al.</i> , 2005)
Cinética diferencial por espectrofotometría	0.6 mg/L	Aplicable a edulcorantes de mesa y bebidas	Uso de permanganato No viable para mezclas de edulcorantes	Acesulfame K, sacarina	
Determinación espectrofotométrica con sistema de inyección en flujo	30 µmol/L	Aplicable a mezclas de edulcorantes	Tratamiento de la muestra		(Rocha <i>et al.</i> , 2005)
Gravimetría	200 mg/L	Método oficial. Aplicable a bebidas y edulcorantes de mesa	Alto LOD No viable con mezclas de edulcorantes Tiempo muy largo para la determinación		(AOAC 957.10)

LOD=Límite de detección

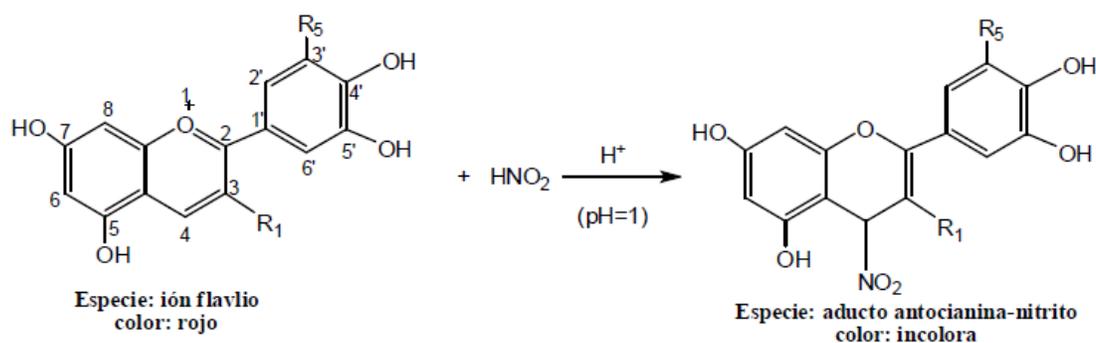
Además del pH, la temperatura también tiene un efecto considerable sobre la estabilidad y estructura de las antocianinas ya que a los 60°C, comienza a haber degradación en su estructura, debido a la pérdida del azúcar glicosilante en la posición tres de la molécula y la apertura del anillo provocando la producción de chalconas incoloras (Timberlake, 1980).

Es importante considerar la estabilidad del pigmento de las antocianinas durante su procesamiento y almacenamiento ya que también son susceptibles a otros factores como su misma estructura química, concentración, presencia de oxígeno y actividad de agua (Galan-Vidal *et al.*, 2014).

### 2.2.1. Degradación de las antocianinas

Anteriormente se han descrito reacciones entre las antocianinas monoméricas y especies oxidantes, reductores, nucleófilos y electrófilos; un ejemplo de éstas es la decoloración que presentan con la condensación de diversos aminoácidos, catequinas u otros nucleófilos de sales de flavilio, dando origen a productos incoloros, los cuales aún son reactivos y pueden sufrir cambios adicionales (Castañeda-Ovando *et al.*, 2010).

Una especie que reacciona con las antocianinas, dando lugar a productos incoloros, es el ácido nitroso (nucleófilo), la reacción que se ha propuesto se presenta en la Figura 7 (Castañeda, *et al.*, 2010).



**Figura 7.** Reacción propuesta para las antocianinas con el ácido nitroso.

Las reacciones nucleofílicas en las antocianinas suceden principalmente en el carbono 4, se ha probado que el ion nitrito actúa como nucleófilo y provoca la decoloración de las antocianinas (Castañeda-Ovando *et al.*, 2010), lo que ha permitido el diseño de métodos para determinar nitritos en aguas residuales (Timberlake, 1980), en embutidos (Galan-Vidal *et al.*, 2014) y para determinar la estabilidad de las antocianinas y piranoantocianinas en extracto de flor de Jamaica (Castañeda *et al.*, 2008). Estas reacciones pueden verse afectadas por la temperatura, ya que la degradación térmica provoca la hidrólisis de la molécula dando lugar a compuestos de una coloración café e insolubles de naturaleza polifenólica, que ya no poseen capacidad antioxidante (Castañeda-Ovando *et al.*, 2010).

### **3. Objetivos**

#### **3.1. General**

Desarrollar un método espectrofotométrico mediante una reacción de degradación de antocianinas para determinar ciclamato en edulcorantes de mesa.

#### **3.2. Específicos**

1. Optimizar el método de determinación de ciclamato considerando como factores la concentración de nitrito, la temperatura y el tiempo de reacción para obtener las mejores condiciones de análisis.
2. Evaluar el efecto de otros edulcorantes en la reacción de degradación de antocianinas para determinar la precisión del método.
3. Aplicar el método espectrofotométrico desarrollado sobre muestras comerciales (edulcorantes de mesa) para conocer su eficiencia en la determinación de ciclamato.

## **4. Metodología experimental**

### **4.1. Reactivos y equipo**

#### **4.1.1. Reactivos**

Todas las soluciones se prepararon disolviendo el reactivo grado analítico correspondiente (ciclurato de sodio 100 mg/L,  $\text{NaNO}_2$  100 mg/L, HCl 1 M,  $\text{BaCl}_2$  10%, aspartame 4500 mg/L, acesulfame K 6000 mg/L, sucralosa 1500 mg/L y sacarina 4000 mg/L) en agua desionizada. Las soluciones estándar se prepararon a partir de diluciones de la solución madre. Estas soluciones se prepararon de acuerdo a los experimentos programados diariamente.

La muestra de flor de Jamaica se obtuvo en el supermercado. Como muestras reales se analizaron cuatro edulcorantes de mesa comerciales, los cuales se describen en la sección 4.3.3.1.

#### **4.1.2. Equipo**

La temperatura de las muestras se controló con un baño de Boekel Grant PB-3600. Todas las medidas de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro marca Genesys 10s UV-Vis Thermo Scientific con celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico.

### **4.2. Extracto de antocianinas**

#### **4.2.1. Preparación**

El extracto se preparó pesando 50 g de flor de Jamaica seca, a las cuales se les agregó aproximadamente 700 mL de agua desionizada. La mezcla resultante se mantuvo en reposo durante una noche y se filtró; el filtrado se transfirió a un matraz volumétrico de 1L que contenía 150 mg de benzoato de sodio (como conservador) y se agregó agua desionizada hasta completar el volumen.

#### 4.2.2. Determinación de antocianinas monoméricas

La determinación de antocianinas monoméricas en el extracto se realizó utilizando el método de pH diferencial (Giusti & Wrolstad, 2001), se tomaron 2 mL de extracto 1 mL se aforó a 10 mL con HCl 0.1 M (pH 1) y el otro a 10 mL con buffer de acetatos (pH 4.5), ambas se midieron a 515 y 700 nm, la determinación se hizo por triplicado.

Para el cálculo de antocianinas monoméricas se utilizó la ecuación 1 y 2.

$$\text{Antocianinas monoméricas (mg L}^{-1}\text{)} = \frac{A \times PM \times FD \times 10^3}{\epsilon \times l} \quad (1)$$

$$A = (A_{515nm} - A_{700nm})_{pH 1} - (A_{515nm} - A_{700nm})_{pH 4.5} \quad (2)$$

donde:

$A$  = absorbancia de la muestra que fue diluida

$PM$  = peso molecular de la antocianina mayoritaria presente en la flor de Jamaica (cianidina-3-glucósido con un peso molecular de 449.2).

$FD$  = factor de dilución que tiene un valor de 10

$\epsilon$  = coeficiente de absortividad molar ( $26900 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ L pH 1.0}$ )

$L$  = longitud del paso óptico (1 cm)

#### 4.3. Desarrollo de un método para determinar ciclamato

Se han descrito anteriormente reacciones de degradación entre antocianinas y nucleófilos, en las que hay una decoloración por la condensación de nucleófilos con sales de flavilio (Castañeda *et al.*, 2010, Ramos, Schmitt & Gómez, 2006). Esta decoloración se utilizó para determinar espectrofotométricamente y de manera indirecta el contenido de ciclamato presente en muestras de edulcorantes de mesa.

El método se basa en una modificación al método oficial, en la que el ciclamato sufre una reacción de degradación con ácido nitroso (que se encuentra

en exceso), formando sulfato. Una vez que ha quedado en exceso el ácido nitroso (nucleófilo), reacciona con las antocianinas presentes en el extracto de flor de Jamaica, obteniendo una decoloración de estas sustancias. Midiendo el color de la solución resultante, se puede calcular la cantidad de ciclamato.

Para el desarrollo de esta metodología, fue necesario el estudio de los factores que afectan la reacción, tales como: temperatura, tiempo, concentración de nitrito y presencia de edulcorantes sinérgicos.

#### **4.3.1. Estudio de las condiciones de trabajo**

Todos los experimentos que se realizaron en esta sección fueron hechos por triplicado.

##### **4.3.1.1. Preparación del hidrolizado de ciclamato**

Para llevar a cabo la metodología propuesta, se utilizó un hidrolizado de ciclamato de sodio. Para su preparación se pesó la cantidad necesaria de ciclamato de sodio que diera una concentración final de 100 mg/L, después se disolvió con agua desionizada y se le agregaron 10 mL de HCl concentrado, se mantuvo en agitación por 30 minutos con calentamiento a 80°C; y pasado ese tiempo se aforó en un matraz volumétrico a 100 mL. Esta solución se codificó como HC (hidrolizado de ciclamato).

##### **4.3.1.2. Interacción directa de ciclamato con antocianinas**

Se llevaron a cabo pruebas para determinar si había interacción del ciclamato con el extracto de flor de Jamaica en ausencia de nitrito. Para ello, se prepararon cinco soluciones tomando alícuotas de ciclamato de sodio sin hidrolizar para preparar 4, 8, 12, 16 y 20 mg/L y transfiriéndolas a matraces volumétricos de 10 mL.

Después, se les agregaron 1.4 mL de extracto de flor de Jamaica (se ajustó a una absorbancia de 0.82 u.a. a una longitud de onda de 515 nm). Las soluciones se colocaron en un baño de calentamiento a 60°C durante un tiempo de 15 minutos. El procedimiento se repitió cambiando el tiempo a 45 minutos; al concluir

el tiempo de reacción se aforaron a 10 mL y se procedió a medir su absorbancia con una celda de cuarzo de paso óptico de 1 cm a una longitud de 515 nm. Los experimentos se realizaron por triplicado.

#### **4.3.1.3. Interacción de antocianinas con el exceso de nitrito**

Se realizaron pruebas para conocer si el exceso de nitrito reaccionaba con las antocianinas del extracto de flor de Jamaica.

Para ello se realizó el mismo procedimiento descrito en la sección 4.3.1.2, sólo que las alícuotas fueron de HC y se les añadió, previo al calentamiento, una concentración de 5 mg/L de ion nitrito.

#### **4.3.1.4. Concentración óptima de nitrito**

La concentración óptima de nitrito se determinó haciendo experimentos donde se agregaron diferentes concentraciones de ión nitrito para conocer cual era la que permitía obtener los mejores resultados.

Con las siguientes variaciones: se usó HC, a las alícuotas se les añadió una concentración de 3, 5, 7, 10 y 15 mg/L de ion nitrito previo calentamiento y las reacciones fueron durante 45 minutos.

#### **4.3.1.5. Tiempo óptimo de reacción**

Para la determinación del tiempo óptimo de reacción se llevaron a cabo tres cinéticas de reacción en seis intervalos de tiempo: 15, 30, 45, 60, 75 y 90 minutos. Se realizó el mismo procedimiento descrito en la sección 4.3.1.2, añadiendo HC y una concentración de 10 mg/L de ion nitrito, previo al calentamiento.

#### **4.3.1.6. Temperatura óptima**

Se hicieron dos experimentos, uno a temperatura ambiente y otro a 60°C, usando el procedimiento antes descrito, se añadió HC y una concentración de 10 mg/L de ion nitrito antes del calentamiento.

#### 4.3.1.7. Efecto de edulcorantes sinérgicos

Para conocer el efecto que tienen el aspartame, acesulfame K, sucralosa y sacarina, edulcorantes sinérgicos del ciclamato en el método propuesto, se hicieron dos grupos de experimentos. En el primero (experimentos 1-4), se utilizó cada uno de los edulcorantes, en la concentración en la que normalmente vienen en los productos (Tabla 5), realizando una hidrólisis a las mismas condiciones que el ciclamato (Sección 4.3.1.1). Posterior a esto, al hidrolizado se le adicionaron 10 mg/L de ion nitrito y 1.4 mg/L de extracto de antocianinas, después de someterlo a un baño termostático a 60°C por 45 min, se midieron las absorbancias a 515 nm.

**Tabla 5.** Condiciones experimentales para evaluar el efecto de los edulcorantes sinérgicos ensayados.

Exp.	Aspartame mg/L	Acesulfame K mg/L	Sucralosa mg/L	Sacarina mg/L	Ciclamato* mg/L
1	45	----	----	----	----
2	----	60	----	----	----
3	----	----	15	----	----
4	----	----	----	1	----
5	45	----	----	----	10
6	----	60	15	----	10
7	----	----	----	1	10
8	45	60	15	----	10

\*El ciclamato se utilizó en su forma hidrolizada, Exp= experimento.

En el segundo grupo (experimentos 5-8) se prepararon mezclas con ciclamato, considerando las concentraciones en las que generalmente están

presentes en los productos que los contienen (Tabla 5). El análisis se realizó de la misma forma que en los experimentos 1-4. Todas las pruebas se hicieron por triplicado.

### 4.3.2. Determinación de ciclamato

#### 4.3.2.1. Curvas de calibración

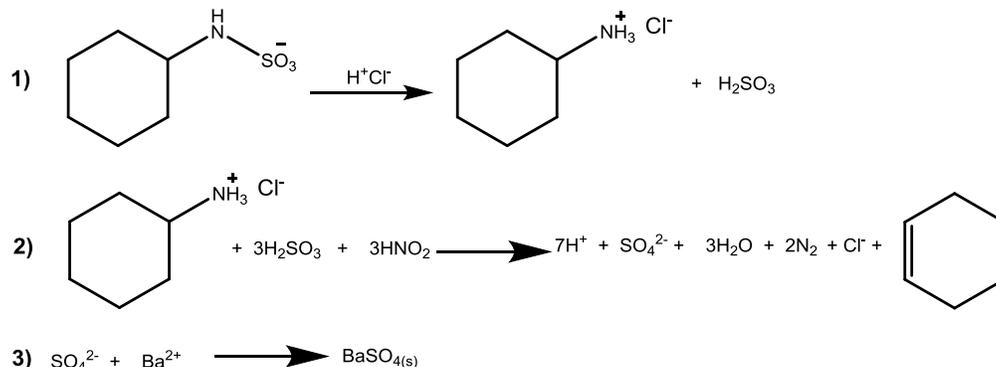
Para realizar las curvas de calibración, se usaron las condiciones experimentales óptimas que se obtuvieron en los experimentos anteriores. Usando concentraciones de 4, 8, 12, 16 y 20 mg/L de HC, con 10 mg/L de ion nitrito y 1.4 mL de extracto de antocianinas que se ajustó a una absorbancia de 0.82 u.a. a una longitud de onda de 515 nm. Se usó el tiempo de 45 minutos en un baño con calentamiento a 60°C y se leyó en un espectrofotómetro a 515 nm. Las curvas se hicieron por triplicado.

#### 4.3.2.2. Porcentaje de recuperación del método propuesto

Para calcular el porcentaje de recuperación se preparó una muestra con una concentración conocida de 10 mg/L de HC y se le realizó el mismo tratamiento (por triplicado) que a las demás muestras.

#### 4.3.3. Evaluación del porcentaje de recuperación del método oficial

De acuerdo al método AOAC 957.10 el ciclamato sufre una reacción de degradación con ácido nitroso, formando sulfato, la reacción se presenta en la Figura 8.



**Figura 8.** Reacción de degradación del ciclamato.

El método consiste en la precipitación de sulfato de bario proveniente del ciclamato, pesando este producto; por lo que, se convierte en una gravimetría.

Para la determinación de ciclamato se prepararon 100 mL de una solución con 300 mg de ciclamato de sodio, a la que se le agregaron 10 mL de HCl concentrado. A continuación se le añadieron 10 mL de una solución de cloruro de bario al 10% de cloruro de bario y se mantuvo en agitación por 30 minutos.

Después, se adicionaron 10 mL de una solución de ion nitrito al 10%, se agitó, se cubrió con un vidrio de reloj y se mantuvo en baño de vapor por dos horas, se agitó tres veces a intervalos de 30 minutos. Una vez transcurridas las dos horas, se retiró del baño y se dejó en un lugar templado durante toda la noche; posteriormente, se filtró el precipitado con un filtro de membrana de 0.45  $\mu\text{m}$  marca Whatman en un equipo de filtración. Por último; se secó en un horno a 60°C por 5 h y se procedió a pesar el filtrado hasta obtener peso constante en una balanza analítica. Este procedimiento se repitió por triplicado para evaluar el porcentaje de recuperación de ciclamato.

#### **4.3.4. Análisis de muestras reales**

##### **4.3.4.1. Muestras**

Para evaluar la efectividad del método propuesto, se analizaron cuatro muestras de distintos edulcorantes de mesa comerciales. En la Tabla 6 se describen las muestras.

##### **4.3.4.2. Análisis**

Para el análisis del edulcorante líquido, se tomó 1 mL, se pasó a un matraz volumétrico de 100 mL y se aforó con agua desionizada. Se le adicionaron 10 mL de HCl concentrado y se agitó durante 30 minutos con calentamiento a 80°C. La solución se filtró con un microfiltro de 0.45  $\mu\text{m}$  y se tomó 1 mL de esa dilución que nuevamente se transfirió a otro matraz de 10 mL y se aforó con agua desionizada.

**Tabla 6.** Muestras comerciales analizadas.

<b>Nombre</b>	<b>Presentación</b>	<b>Compañía</b>	<b>Edulcorantes contenidos</b>
<b>Natreen</b>	Líquido	Natreen®	Ciclamato, sacarina y fructosa
<b>Natreen Classic</b>	Comprimidos	Natreen®	Ciclamato, sacarina y taumatina
<b>Natreen Especial</b>	Comprimidos	Natreen®	Ciclamato, sacarina y taumatina
<b>Carrefour Discount</b>	Comprimidos	Carrefour®	Ciclamato y sacarina

Se tomó 1 mL de la muestra de la segunda dilución del hidrolizado del edulcorante, se transfirió a un matraz volumétrico de 10 mL, se adicionaron 1.4 mL de extracto de antocianinas (ajustado a una absorbancia de 0.82 u.a. a una longitud de onda de 515 nm) y se usarón las mejores condiciones experimentales obtenidas previamente. Al concluir el tiempo de reacción se aforó a 10 mL y se procedió a medir su absorbancia a una longitud de 515 nm.

Para el análisis de las muestras de edulcorantes en comprimidos, se usó un comprimido y se disolvió en agua desionizada, se le agregó 1mL de HCl concentrado y se mantuvieron en agitación durante 30 minutos con calentamiento a 80°C. La solución resultante se filtró usando microfiltros de 0.45µm y se aforó a 10 mL.

Se tomó 1 mL de la muestra del edulcorante hidrolizado y se siguió la metodología de análisis antes descrita para el edulcorante líquido. Para todas las muestras se realizó el mismo procedimiento por triplicado.

#### **4.3.5. Análisis de datos**

Los resultados que se obtuvieron durante las determinaciones, se analizaron haciendo uso de herramientas de Excel, utilizando análisis de varianza (ANOVA) para obtener los parámetros estadísticos necesarios.

## **5. Resultados y discusión**

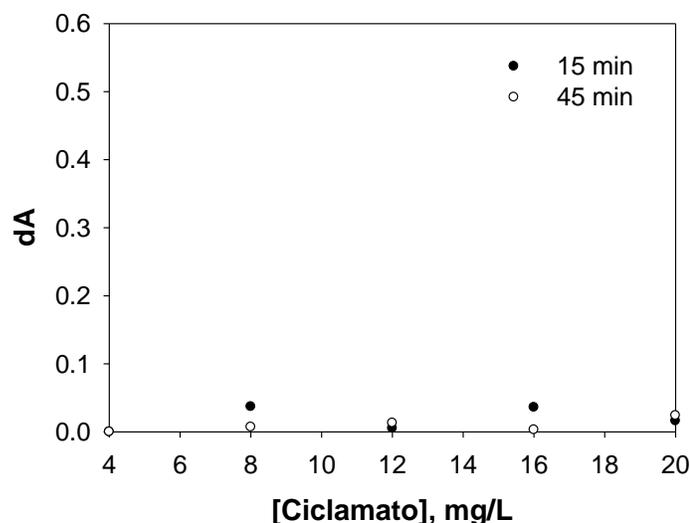
### **5.1. Contenido de antocianinas monoméricas**

Se determinaron las antocianinas monoméricas presentes en el extracto de flor de Jamaica que fue usado en todos los experimentos, presentando un contenido de  $116.22 \pm 2.17$  mg/L, valor que se encuentra dentro del rango (72-295 mg/L) reportado de antocianinas monoméricas en diversas investigaciones sobre la flor de Jamaica (Castañeda-Ovando *et al.*, 2010, Salazar-González *et al.*, 2012, Medina-Carrillo *et al.*, 2013, Salazar-González *et al.*, 2009). Este valor es importante debido a que las reacciones de decoloración de las antocianinas, ocurren entre las antocianinas monoméricas con el ion nitrito (Figura 7) (Castañeda-Ovando *et al.*, 2010).

### **5.2. Interacción del ciclamato con antocianinas**

Con la finalidad de descartar una posible reacción directa del ciclamato con las antocianinas, se hicieron pruebas adicionando el extracto de antocianinas con el ciclamato de sodio a diferentes concentraciones (4, 8, 12, 16 y 20 mg/L). En la Figura 9 se presentan las gráficas obtenidas de  $dA$  vs [Ciclamato], donde  $dA$  es la primera derivada de las medidas de absorbancia a 515nm; la primera derivada es una herramienta que se utiliza para visualizar cambios importantes en una señal analítica (Harris, 2006)

De acuerdo al gráfico (Figura 9) se puede observar que la presencia del ciclamato no provoca un cambio significativo en el color del extracto de antocianinas; por lo que se puede afirmar que no hay una reacción directa entre estos dos compuestos.



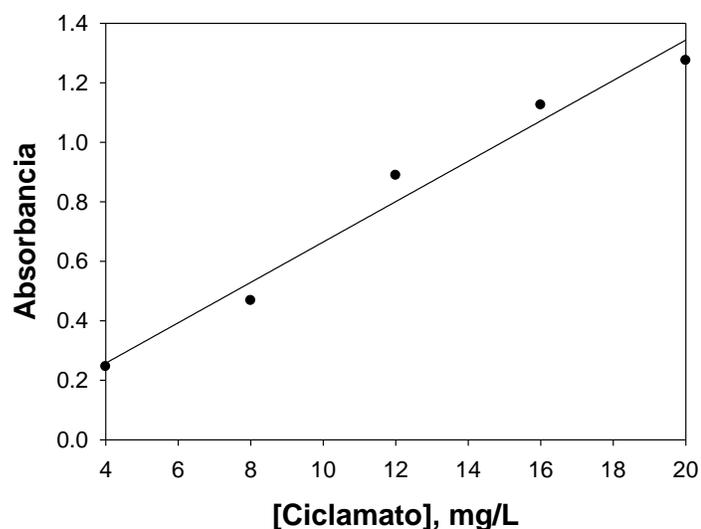
**Figura 9.** Efecto del ciclamato sobre la estabilidad de antocianinas.

Los experimentos se realizaron a dos tiempos de reacción diferentes (15 y 45 minutos), mostrando la misma tendencia. Por esta razón, fue necesario obtener primero el hidrolizado (HC), hacerlo reaccionar con nitrito de sodio en medio ácido ( $\text{HNO}_2$ ) y, finalmente, realizar la reacción con el exceso de ácido nitroso y el extracto de antocianinas.

En los apartados siguientes se muestran los resultados del efecto de diferentes factores sobre la determinación de ciclamato, vía reacción de degradación de antocianinas.

### **5.3. Interacción del exceso de ácido nitroso con antocianinas**

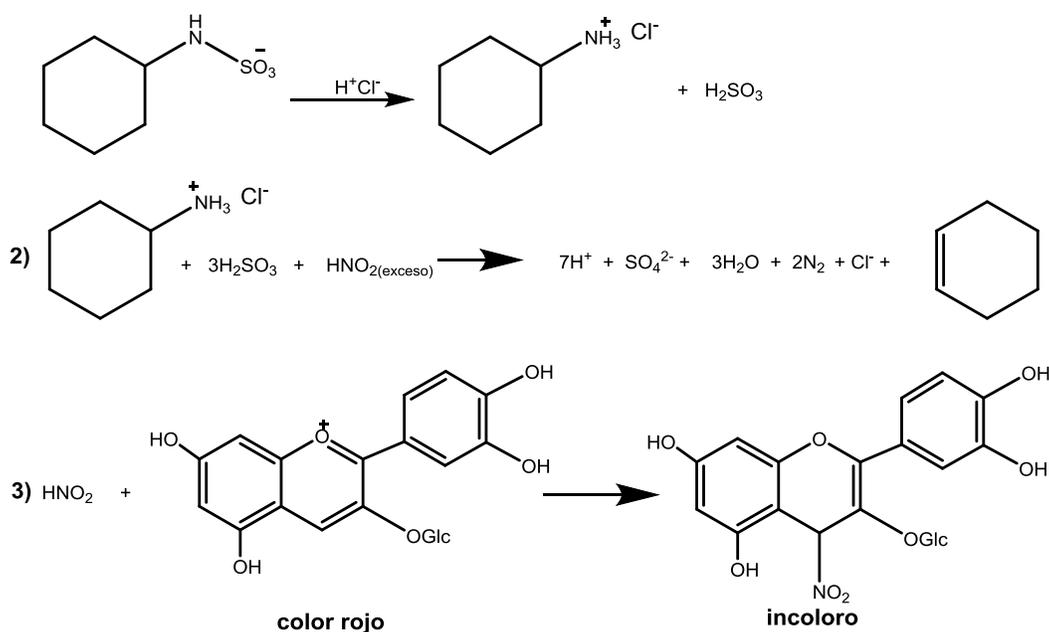
Se comprobó que hubiera reacción entre el ion nitrito y el HC con el extracto de antocianinas, obteniendo los resultados que se presentan en la Figura 10. Las medidas se realizaron 45 minutos después de mezclar a diferentes concentraciones de HC con ion nitrito a una concentración fija (5 mg/L) y extracto de antocianinas (aproximadamente 14 mg/L), manteniéndolas a 60°C; condiciones que han sido reportadas en estudios anteriores de reacciones de degradación de antocianinas (Castañeda *et al.*, 2008, Castañeda-Ovando *et al.*, 2010, Galan-Vidal *et al.*, 2014).



**Figura 10.** Efecto de la presencia de ácido nitroso en ciclamato sobre la estabilidad de antocianinas.

La gráfica presentada en la Figura 10 tiene un coeficiente de correlación de 0.9746, el cual es una herramienta que permite observar que hay una reacción. Esto es debido a que, conforme aumenta la concentración de ciclamato, queda menor cantidad de ion nitrito para reaccionar con el extracto de antocianinas, haciendo que éstas presenten menor decoloración.

De acuerdo a las observaciones realizadas durante la experimentación y a los resultados obtenidos en este apartado, se sugiere que la reacción que se lleva a cabo es la mostrada en la Figura 11.

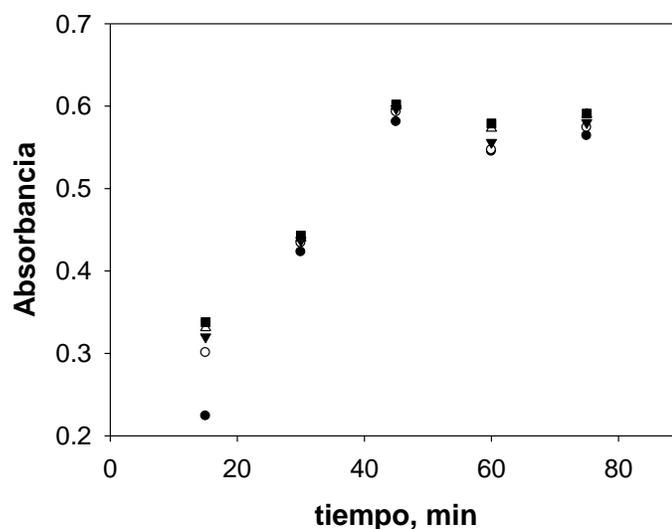


**Figura 11.** Reacción sugerida para la determinación de ciclamato vía reacción de ion nitrito con antocianinas.

#### 5.4. Determinación del tiempo óptimo de reacción

Se hicieron experimentos para conocer el tiempo óptimo necesario para que se llevara a cabo la reacción completa entre el HC y el ácido nitroso.

Como se observa en la Figura 12, los valores de absorbancias toman forma asintótica a partir de los 45 minutos, a cualquier concentración de ciclamato, lo que demuestra que después de ese tiempo se llevó por completo la reacción entre el ciclamato y el ion nitrito, por lo que no habrá diferencia significativa si se lleva a cabo la reacción en un tiempo mayor.

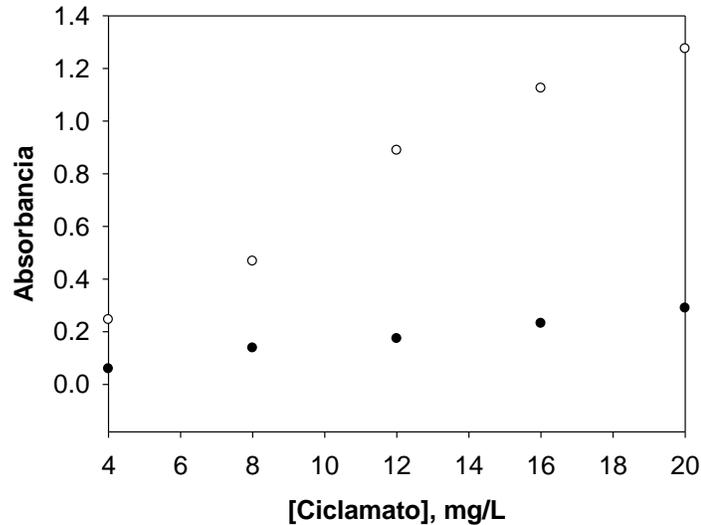


**Figura 12.** Efecto del tiempo de reacción en la reacción de ion nitrito residual con el extracto de antocianinas, a diferente concentración de ciclamato: ● 4mg/L, ○ 8 mg/L, ▼ 12 mg/L, △ 16 mg/L y ■ 20 mg/L.

### 5.5. Determinación de la temperatura óptima de reacción

Para determinar la temperatura óptima de reacción del ácido nitroso residual con el extracto de antocianinas, se hicieron experimentos a dos temperaturas, 20°C y 60°C. Se obtuvieron las curvas de calibración en el intervalo de 4-20 mg/L de ciclamato (Figura 13), en ella se observa que a 60°C la pendiente es mayor ( $0.0679 \pm 0.0149$ ), por lo que, se decidió trabajar con esta temperatura debido a que aumenta la sensibilidad del método. A 20°C se obtuvo una pendiente de  $0.0139 \pm 0.0019$ .

Además, existen estudios cinéticos acerca de la reacción de nitritos con antocianinas, en los que demuestran que a mayor temperatura la energía de activación disminuye, por ello, se ve favorecida la reacción (Castañeda *et al.*, 2008, Castañeda-Ovando *et al.*, 2010, Galan-Vidal *et al.*, 2014).



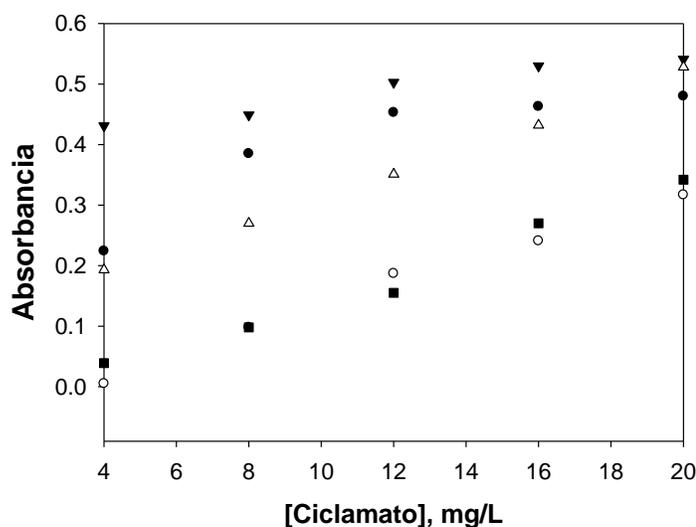
**Figura 13.** Efecto de la temperatura de reacción (● 20°C y ○ 60°C) en la reacción de ácido nitroso residual con el extracto de antocianinas.

### 5.6. Efecto de la concentración de ion nitrito

Debido a que para el método propuesto se requiere tener un exceso de ácido nitroso, se analizaron diferentes concentraciones ion nitrito, realizando los experimentos a 60°C durante 45 minutos, tomando concentraciones de ciclamato en el intervalo de 4-20 mg/L. Las curvas de calibración se muestran en la Figura 14. Es importante señalar que se realizó una corrección con el blanco, debido a que por la naturaleza de la reacción no habría decoloración completa del extracto de antocianinas (Figura 11).

Para evaluar existían diferencias significativas entre las concentraciones de ion nitrito añadidas, se realizó un análisis de varianza (ANOVA), donde  $H_0$ : no hay diferencias significativas entre las pendientes de las curvas de calibración. De acuerdo a los resultados se obtiene  $F_{cal}=8.08$  ( $P=0.05$ ), a los grados de libertad que se tienen (4,20), la  $F_{crit}=2.87$  ( $P=0.05$ ); debido a que  $F_{cal}>F_{crit}$ , si hay diferencias significativas.

Esto se puede comprobar también analizando los valores de las pendientes (Tabla 7), que permiten, de igual manera, decidir la concentración óptima de ion nitrito a utilizar en el método propuesto.



**Figura 14.** Efecto de la concentración inicial de ion nitrito en la degradación de antocianinas. Cada curva de calibración representa diferentes concentraciones de ion nitrito: ● 3mg/L, ○ 5 mg/L, ▼ 7 mg/L, △ 10 mg/L y ■ 15 mg/L.

Las concentraciones se decidieron en función a la reacción presentada en la Figura 11, tomando en consideración que la relación de la reacción entre las antocianinas con el ion nitrito es equimolar (Galan-Vidal *et al.*, 2014).

En 3 y 5 mg/L, la concentración de nitrito residual es menor, ya que la inicial está por debajo de la concentración estequiométrica requerida para la reacción, considerando la máxima concentración de ciclamato (20 mg/L). La concentración de 7 mg/L, de acuerdo a los cálculos estequiométricos es la requerida para llevar a cabo la reacción, tomando de referencia la máxima concentración de ciclamato (20 mg/L). Es por ello que la pendiente disminuye, ya que en teoría (cálculos estequiométricos), la cantidad de ion nitrito que queda sin reaccionar con el ciclamato es menor, lo que hace que la sensibilidad (pendiente) disminuya.

En las concentraciones de 10 y 15 mg/L, el ion nitrito está en exceso, lo que permite que, después de la reacción con ciclamato, quede un residual que reacciona con las antocianinas. Las pendientes obtenidas en cada una de las concentraciones son similares (Tabla 7); por lo que se decidió trabajar con 10 mg/L con la finalidad de no dejar un mayor exceso de ion nitrito, que pudiera ser un contaminante que afecte al medio ambiente.

**Tabla 7.** Pendientes obtenidas de la adición de diferentes concentraciones de ion nitrito.

<b>[NO<sub>2</sub><sup>-</sup>]<sub>agregado</sub>, mg/L</b>	<b>Pendiente</b>
<b>3</b>	0.0148±0.0105
<b>5</b>	0.0192±0.0024
<b>7</b>	0.0075±0.0023
<b>10</b>	0.0208±0.0011
<b>15</b>	0.01940±0.0035

### **5.7. Validación del método**

Para validar el método propuesto se calcularon los parámetros de regresión que se muestran en la Tabla 8. Estos son referidos tomando las siguientes condiciones: [NO<sub>2</sub><sup>-</sup>]<sub>agregada</sub>=10 mg/L, tiempo de reacción=45 min, temperatura=60°C.

De acuerdo a los datos señalados en la Tabla 8, se observa que el método propuesto tiene un intervalo lineal que permite determinar el ciclamato en muestras de edulcorantes de mesa, en los cuales, está presente a una concentración de 10 mg/L (en líquidos) y de hasta 66% (en sólidos) (CODEX Alimentarius CX/FA 12/44/2, 2012).

Por otra parte, de acuerdo a la reproducibilidad del método se obtiene un %DER de 0.06, lo que hace que el método sea preciso. Además el LOD que se obtuvo es de 0.96 mg/L, que permite cuantificar las concentraciones presentes en las muestras de edulcorantes.

Sin embargo del método estándar no pueden calcularse los parámetros de regresión, debido a que es una gravimetría, por ello no están reportados los datos.

Para evaluar la exactitud del método se calculó el porcentaje de recuperación, éste si se pudo evaluar en los dos métodos (propuesto y estándar), logrando un 91.12%, para el propuesto y de 73.04% para el estándar, lo que hace que el método sugerido sea mejor.

El método estándar (AOAC 957.10) tiene un porcentaje de recuperación considerablemente bajo, por ello es necesario analizar una muestra con una cantidad mayor de ciclamato para obtener resultados que sean exactos, ya que se reporta que puede ser usado para muestras que contengan entre 10-300 mg de ciclamato.

**Tabla 8.** Parámetros de regresión de la curva de calibrado [Ciclamato] vs Absorbancia.

<b>Parámetro</b>	<b>Método propuesto</b>
Desviación estándar residual, $s_e$	0.0063
Número de estándares, n	5
Coefficiente de correlación, $r^2$	0.9983
Intersección, $a \pm t_{s_a}$	0.1052 $\pm$ 0.0066
Sensibilidad, $b \pm t_{s_b}$	0.0208 $\pm$ 0.0005
Rango lineal (mg/L)	3.19-20
Límite de detección (mg/L)	0.96
Reproducibilidad (%DER, n=3)	0.62 (4 mg/L)

De igual manera se debe tomar en cuenta es el tiempo en el que se lleva a cabo la determinación. Para el método propuesto, el tiempo es de aproximadamente 1.5 h; mientras que para el método gravimétrico (estándar), es de aproximadamente 26 h, sin considerar que el paso de filtración puede llegar a complicar la determinación, por que puede haber pérdidas e incluso demorar aún mas la determinación.

### **5.8. Efecto de los edulcorantes sinérgicos**

Se analizó el efecto del sinergismo de los edulcorantes que se usan comúnmente con ciclamato (aspartame, acesulfame K, sucralosa y sacarina) sobre los parámetros de regresión que se obtuvieron para el método propuesto, con el fin de evaluar su impacto en la determinación de ciclamato.

Los experimentos se dividieron en dos grupos, en el primero (Tabla 5, experimentos 1-4). Con el aspartame (45 mg/L) hubo una decoloración completa del extracto de antocianinas, lo que significa que todo el ácido nitroso sólo reaccionó con las antocianinas, y no con el edulcorante. En el caso de el acesulfame K (60 mg/L), el extracto no se decoloró por completo, obteniéndose una medida de absorbancia de  $0.790 \pm 0.002$  ua, que comparada con la inicial (0.820 ua) indica que prácticamente todo el ion nitrito reaccionó con el acesulfame K.

Este comportamiento se debe a que en medio ácido el acesulfame K se descompone a ácido acetoacetamida-N-sulfónico; éste a su vez, sufre una reacción de hidrólisis (favorecida por la temperatura), formando acetoacetamida y ácido sulfónico (Giannuzzi & Molina, 1995).

El ácido sulfónico formado es el que reacciona con el ion nitrito, siendo el responsable de que se consuma esta especie y que por tanto, no decolore al extracto. En otras palabras, la presencia de acesulfame K puede ocasionar errores por defecto en la determinación del ciclamato.

La sucralosa (15 mg/L) generó una decoloración parcial del extracto, obteniéndose una medida de absorbancia de  $0.280 \pm 0.002$  ua, lo que significa que el ion nitrito reaccionó con el extracto, pero también tuvo interacción con la sucralosa.

Es importante resaltar que la sucralosa se obtuvo a partir de una muestra comercial, que además contenía maltodextrina y dextrina, las cuales a pH ácido y altas temperaturas sufren reacciones de hidrólisis, dando lugar a la formación de glucosa, que es un azúcar reductor. En medio ácido, el ácido nitroso reacciona con sustancias reductoras, como ácido ascórbico y azúcares reductores formando óxido nitroso (Forrest & Pérez, 1979), lo que provoca que el ácido nitroso no reaccione por completo con el extracto de antocianinas.

Finalmente, para la sacarina (1mg/L) no hubo interacción con el ácido nitroso, ya que el extracto de antocianinas se decoloró completamente.

Grenby (1996) destaca que el aspartame y la sacarina, se usan en alimentos en concentraciones de 45 mg/L y 1 mg/L, respectivamente. Dichas concentraciones que fueron utilizadas para los experimentos y que no mostraron interacción con el extracto de antocianinas ni con el ácido nitroso.

En el segundo experimento (Tabla 5, experimentos 5-8) se hicieron mezclas de los edulcorantes con una concentración conocida de 10 mg/L de ciclamato, para identificar si las mezclas tenían un efecto sobre la determinación con el método propuesto, se determinó el ciclamato, obteniendo los resultados que se presentan en la Tabla 9.

**Tabla 9.** Resultados del análisis de mezclas de edulcorantes sinérgicos con ciclamato.

<b>Mezclas</b>	<b>[Ciclamato]*, mg/L</b>	<b>%Error relativo</b>	<b>Tipo de error</b>
<b>Ciclamato/aspartame/acesulfame K</b>	14.37±0.17	43.70	Por exceso
<b>Ciclamato/acesulfame K/aspartame/sucralosa</b>	15.87±0.055	58.70	Por exceso
<b>Ciclamato/acesulfame K/sucralosa</b>	13.11±0.052	31.10	Por exceso
<b>Ciclamato/sacarina</b>	9.36±0.0318	-6.40	Por defecto

\*Concentración determinada por el método propuesto.

De acuerdo a los resultados obtenidos (Tabla 9) puede observarse que en las mezclas en las que hay presencia de acesulfame K y sucralosa con el ciclamato, existen problemas de exactitud en la determinación (errores por exceso), debido a que estos edulcorantes presentan interacción con el ion nitrito.

Es importante resaltar que la presencia de sacarina tiene menor efecto en la exactitud del método propuesto, presentando un porcentaje de error relativo del 6.4%, el cual es alto; sin embargo, debido a que se partió de un sustituto de azúcar comercial, es probable que pudieran interferir los otros componentes (dextrosa y cremor tártaro) en la determinación, lo que provoca que haya presencia de errores sistemáticos de método que ocasionen esta diferencia (Miller & Miller, 2002).

De las mezclas analizadas, la que tiene mayor interés para el método, desde el punto de vista de análisis de edulcorantes, es la de sacarina con ciclamato, ya que es la más utilizada en edulcorantes de mesa (O'Donnell & Kearsley, 2012).

### **5.9. Muestras reales**

Una vez que se obtuvieron las condiciones experimentales idóneas para llevar a cabo la reacción para la determinación de ciclamato, se hicieron pruebas en muestras comerciales de edulcorantes de mesa.

Se determinó el contenido de ciclamato en edulcorantes bajos en calorías, que en su composición contienen ciclamato. Los resultados se muestran en la Tabla 10.

**Tabla 10.** Concentración de ciclamato en edulcorantes de mesa comerciales, determinada por el método propuesto.

<b>Edulcorante</b>	<b>Presentación</b>	<b>[Ciclamato]</b>
Natreen®	Líquido	16.95±0.31 g/L
Natreen Classic®	Comprimidos	256.44±0.069 mg/g
Natreen Especial®	Comprimidos	147.20±0.35 mg/g
Carrefour Discount®	Comprimidos	628.89±2.08

De los edulcorantes de mesa analizados, sólo el Carrefour Discount declara en la etiqueta el contenido de ciclamato, que es de 66%, presentando una diferencia con el obtenido por el método propuesto de aproximadamente 4.71%. No fue posible determinar el ciclamato por el método estándar debido a la cantidad de muestra que se requiere para ello; además de que presenta porcentajes de recuperación menores al método propuesto.

Las muestras de Natreen® presentan en su formulación taumatina como edulcorante sinérgico; sin embargo, ésta no interfiere en la determinación, ya que es un péptido que precipita a pH ácido (Alonso, 2010), al cual se lleva a cabo el método propuesto. Por ello, fue necesario filtrar las muestras, previo a su análisis.

## **6. Conclusiones**

Se desarrolló un método espectrofotométrico para la determinación de ciclamato en edulcorantes de mesa, haciendo uso de reacciones de degradación de antocianinas.

Se determinó que las reacciones de degradación de antocianinas son un método efectivo para determinar ciclamato en edulcorantes de mesa con sacarina y aspartame.

Se determinó la concentración de ciclamato en edulcorantes de mesa comerciales; por lo que, el método propuesto puede aplicarse a muestras reales, presentando resultados precisos y con mayor exactitud que el método oficial.

Se comparó el método propuesto con el método oficial de determinación de ciclamato, encontrando que el método propuesto es mejor que el método oficial, debido a que: 1) se reduce considerablemente el tiempo de determinación; 2) disminuye el límite de detección, lo que provoca que se necesite una cantidad menor de muestra para el análisis; 3) hace uso de menor cantidad de reactivos, lo que produce menor cantidad de residuos; y 4) es amable con el medio ambiente.

## Referencias

- Abou-Arab, A. E., Abou-Arab, A. A., & Abu-Salem, M. F. (2010). Physico-chemical assessment of natural sweeteners steviosides produced from *Stevia rebaudiana* bertonii plant. *Food Science*, 4(5), 269-281.
- Alonso, J. R. (2010). Edulcorantes naturales. *La Granja. Universidad Politécnica Salesiana*, 3-12.34
- AOAC Official Methods of Analysis. (1990) 1168-1169.
- Armenta, S., Garrigues, S., & De la Guardia, M. (2004). Sweeteners determination in table top formulations using FT-Raman spectrometry and chemometric analysis. *Analytical Chimical Acta*, 521(2), 149-155.
- Badui D. S. (2006). Química de los Alimentos. En S. Badui Dergal, *Química de los Alimentos* (Cuarta ed). Ciudad de México, México: Pearson.
- Borrego, F., Canales, I., & Costa-Batllo, P. (1993). Nuevas tendencias en aromatización de piensos: la aportación de Neohesperidina DC. *Mundo Ganadero*, 42-45.
- Cano Z., J. (2009). *El cultivo de jamaica orgánica (Hibiscus sabdariffa) en México*. Uruapan, Michoacan, México: Agroproductos y servicios orgánicos de Uruapan.
- Castañeda O., A., Galan-Vidal, C. A., Rodríguez, J. A., Contreras-López, E., & Ramírez G., J. (2010). Diseño de un método para la determinación de nitritos en embutidos utilizando extracto de flor de jamaica. *Memorias in extenso del XXIII Congreso Nacional de Química Analítica*.
- Castañeda-Ovando, A., Galán-Vidal, C. A., Rodríguez, J. A., Páez-Hernández, M. E., & Rangel-Vargas, E. (2010). Degradation kinetics of anthocyanins with nitrite ion. *Innovatios in Food Science an Food Biotechnology Developing Countries*, 26-47.
- Choi, M. M., Hsu, M. Y., & Wong, S. L. (2000). Determination of cyclamate in low calorie foods by high-performance liquid chromatographywith indirect visible photometry. *Analyst*, 217-220.

- Codex Alimentarius CX/FA 12/44/2. (16 de Marzo de 2012). Recuperado el 21/05/2014 de Mayo de 2015, de Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura: [ftp://ftp.fao.org/codex/meetings/ccfa/ccfa44/fa44\\_02s.pdf](ftp://ftp.fao.org/codex/meetings/ccfa/ccfa44/fa44_02s.pdf).
- Codex Alimentarius. (2014). Normas internacionales de los alimentos. *Norma general para los aditivos alimentarios*.
- Da-Costa-Rocha, I., Bonnlaender, B., Sievers, H., Pischel, I., & Heinrich, M. (2014). Hibiscus sabdariffaL. A phytochemical and pharmacological review. *Food Chemistry*, 165, 424-443.
- Echavarría A., S., & Velasco G., O. H. (2011). Edulcorantes Utilizados en Alimentos. *Instituto Politécnico Nacional*, 119-127.
- Farombi, E. O. (2003). African indigenous plants with chemotherapeutic potentials and biotechnological approach to the production of bioactive prophylactic agents. *African Journal of Biotechnology*, 4(1), 666-671.
- Fatibello, O., Da Cruz, I., Gouveia, S. T., & Califatti, S. A. (1996). Adocantes artificiais. *Qumica Nova* (3), 248-260.
- Forrest, J. C., & Pérez, B. S. (1979). *Fundamentos de Ciencia de la Carne: Ciencia y Tecnología de la Carne* (Segunda ed.). Zaragoza, España: Acribia.
- Galan-Vidal, C. A., Castañeda-Ovando, A., Páez-Hernández, M. E., & Contreras-López, E. (2014). Determination of Nitrites in Commercial Sausages by Anthocyanins Degradation. Experimental Design and Optimization. *Sociedad Química de México*, 58 (2), 180-184.
- Garzon, G. A. (2008). Lan antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: revisión. *Acta Biochemistry*, 13 (3), 27-36.
- Gayol, M. (2003). Un análisis del consumo de aspartamo desde la perspectiva de programas de investigación. *Problemas del conocimiento en ingeniería y Geología*, 99-113.
- Giannuzzi, L., & Molina O., S. E. (1995). Edulcorantes Naturales y Sintéticos: Aplicaciones y Aspectos Toxicológicos. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, 14(2), 119-131.

- Giusti, M. M., & Wrolstad, R. E. (2001). Anthocyanins Characterization and Measurement of Antocyanins by UV-Visible Spectroscopy. *John Wiley & Sons, Inc.*, Unit F1.2.2-13.
- Grenby, T. H. (1996). *Advances in Sweeteners* (Primera ed.). Glasgow, Escocia: Chapman & Hall.
- Harris, D. C. (2006). *Análisis Químico Cuantitativo* (Sexta ed.). Nueva York: Reverté.
- Hashemi, M., Habibi, A., & Jahanshahi, N. (2011). Determination of cyclamate in artificial sweeteners and beverages using headspace single-drop microextraction and gas chromatography flame-ionisation detection. *Food Chemistry*, 124(3), 1258-1263.
- International Sweeteners Association. (2010). *Cyclamate*. Recuperado el 24 de Enero de 2014, de Sucralosa: [http://www.info-edulcorants.org/pdf/E955\\_Sucralosa\\_SP.pdf](http://www.info-edulcorants.org/pdf/E955_Sucralosa_SP.pdf)
- Ishizawa, C., Shironoshita, M., & Lock de Ugaz, O. (1995). Mas sobre las moléculas que endulzan. *Revista de Química*, IX(2), 145-157.
- Llamas, N. E., Di Nezio, M. S., Palomeque, M. E., & Fernandez, B. S. (2005). Automated turbidimetric determination of cyclamate in low calorie soft drinks and sweeteners without pre-treatment. *Analytica Chimica Acta*, 539(1), 301-304.
- Malik, V. S., Popkin, B. M., Bray, G. A., Dreprés, J., & Hu, F. B. (2010). Sugar-Sweetened Beverages, Obesity, Type 2 Diabetes mellitus, And Cardiovascular Disease Risk. *Contemporary Reviews in Cardiovascular Medicine*, 1356-1364.
- Masao, H., Fusako, I., Mitsuo, O., Tetsuya, S., Akiko, Y., & Koichi, I. (2007). Rapid determination of cyclamate in foods by solid-phase extraction and capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 1154(2), 423-428.
- Medina-Carrillo, E. R., Sumaya-Martínez, M. T., Machuca-Sánchez, M. L., Sánchez-Herrera, L. M., Bolois-Morales, R., & Jiménez-Ruiz, E. I. (2013). Actividad antioxidante de extractos de cálices deshidratados de 64

- variedades de jamaica (hibiscus sabdariffa) en función de fenólicos y antocianinas totales. *Ciencias Técnicas Agropecuarias*, 22(1), 20-24.
- Miller, J. N., & Miller, J. C. (2002). *Estadística y Quimiometría para Química Analítica* (Cuarta ed.). Madrid, España: Prentice Hall.
- Mitchell, H. (2006). *Sweeteners a sugar alternatives in food technology*. Oxford, Reino Unido: Blackwell Publishing.
- Ni, Y., Xiao, W., & Kokot, S. (2009). A differential kinetic spectrophotometric method for determination of three sulphanilamide artificial sweeteners with the aid of chemometrics. *Food Chemistry* (113), 1339-1345.
- NOM-086-SSA1-1994. Bienes y servicios. Alimentos y bebidas no alcohólicas con modificaciones en su composición. Especificaciones nutrimentales.
- NOM-218-SSA1-2011. Productos y servicios. Bebidas saborizadas no alcohólicas, sus congelados, productos concentrados para prepararlas y bebidas adicionadas con cafeína. Especificaciones y disposiciones sanitarias. Métodos de prueba.
- O'Donnell, K. & Kearsley, M. W.(2012). *Sweeteners and Sugar Alternatives in Food Technology*.: Wiley Blackwell.
- O'Brien Nabors, L. (2012). *Alternative Sweeteners*. Florida, United States: CRC Press.
- Perez, T., Acosta, N., Gamboa, A., Mantilla, J., Montoya, M., Vásquez, J., y otros. (2011). *Revisión sistemática de la literatura - Ciclamatos*. Bogotá D.C.: Instituto Nacional de Salud.
- Raben, A., Vasilaras, T. H., Moller, A. C., & Astrup, A. (2002). Sucrose compared with artificial sweeteners: different effects on ad libitum food intake and body weight after 10 wk of supplementation subjects. *The American Journal of Clinical Nutrition*(76), 721-729.
- Ramos, L. A., Schmitt, C. C., & Gómez, É. T. (2006). Determinação de nitrito em águas utilizando extrato de flores. *Química Nova*, 29 (5), 1114-1120.

- Rocha, F. R., Ródenas-Torralla, E., Morales-Rubio, Á., & De la Guardia, M. (2005). A clean method for flow injection spectrophotometric determination of cyclamate in table sweeteners. *Analytica Chimica Acta*, 547(2), 204-208.
- Salazar-González, C., Vergara-Balderas, F. T., & Guerrero-Beltrán, J. A. (2009). Evaluación de agentes antioxidantes de un extracto de flor de jamaica microencapsulado. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 3(2), 14-25.
- Salazar-González, C., Vergara-Balderas, F. T., Ortega-Regules, A. E., & Guerrero-Beltrán, J. Á. (2012). Antioxidant properties and color of Hibiscus sabdariffa extracts. *Ciencia e Investigación Agraria*, 39(1), 79-90.
- Timberlake, C. F. (1980). Anthocyanins. Occurrence, Extraction and Chemistry. *Food Chemistry*, 5(1), 69-80.
- Zamarripa M., G., Castañeda O., A., & Pacheco H., M. D. (2006). Determinación de ciclamato por electroforesis capilar. *Memorias in extenso X simposio estudiantil*.
- Zygler, A., Wasik, A., Kot-Wasik, A., & Namiésnik, J. (2011). Determination of nine high-intensity sweeteners in various foods by high-performance liquid chromatography with mass spectrometric detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 400, 2159-2172