



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

ÁREA ACADÉMICA DE QUÍMICA

**DESARROLLO DE METODOLOGÍAS DE ANÁLISIS DE EDULCORANTES EN
BEBIDAS NO ALCOHÓLICAS MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR**

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:

QUÍMICO EN ALIMENTOS

PRESENTA:

JULIETA ALMAZÁN GUZMÁN

DIRECTORES DE TESIS:

DR. JOSÉ ANTONIO RODRÍGUEZ ÁVILA

DR. ISRAEL SAMUEL IBARRA ORTEGA

MINERAL DE LA REFORMA, HGO.

OCTUBRE 2013



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 Licenciatura en Química en Alimentos **Julieta Almazán Guzmán**, quien presenta el trabajo de tesis "**DESARROLLO DE METODOLOGÍAS DE ANÁLISIS DE EDULCORANTES EN BEBIDAS NO ALCOHOLICAS MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR**", 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 **Dr. Carlos Andrés Galán Vidal**

Primer vocal **Dr. José Antonio Rodríguez Ávila**

Segundo vocal **Dr. Javier Añorve Morga**

Tercer vocal **Dra. Elizabeth Contreras López**


Secretario **Dra. María Elena Páez Hernández**

Primer suplente **Dr. Joseantonio Godoy Reyes**

Segundo suplente **Dra. Irma Pérez Silva**

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

ATENTAMENTE
"Amor, Orden y Progreso"
Pachuca Hidalgo, 7 de octubre de 2013.


Dr. Carlos Alberto Gómez Aldapa
Coordinador Adjunto de la Licenciatura
en Química en Alimentos

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE HIDALGO



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





Este trabajo de investigación se realizó en los laboratorios 1 y 2 del Área Académica de Química de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

Parte de este trabajo ha sido presentado en:

XXIV Congreso Nacional de Química Analítica (2011), con el trabajo: *“Determinación de edulcorantes sintéticos mediante electroforesis capilar”*.

XXV Congreso Nacional de Química Analítica (2012), con el trabajo: *“Determinación de sucralosa en bebidas mediante electroforesis capilar con detección indirecta”*.

AGRADECIMIENTOS

Tengo tantas personas a quienes agradecer que siento que podría escribir un testamento.

Según la Real Academia Española, la **gratitud** es el sentimiento que nos obliga a estimar el favor que se nos ha hecho y a corresponder a él de alguna manera.

Me gustaría poder corresponder a cada uno de ustedes en una forma un poco más significativa que estas simples líneas. Algo más tangible y con un valor mucho mayor que solo una frase en papel. Todavía tengo la esperanza de algún día lograrlo... mientras me limitare con esta hojita.

¡¡GRACIAS!!

Primero, agradeceré **a mi familia**, **madre** puedes estar orgullosa y tranquila, lo logramos, gracias por tu apoyo y comprensión (la mayoría de las veces), te quiero y de aquí para adelante; **a mis hermanos**, les agradezco su apoyo, no, yo les agradezco, si yo pude seguro ustedes pueden no se rindan, es difícil, pero así son las cosas que valen la pena.

A mis muy queridos amigos, a los de la banda del carrisol que aunque extinto ahora, no dejamos que nuestra amistad desapareciera. **Marisol** gracias por el apoyo, los rays y los buenos ratos de risas, siempre es divertido platicar contigo, casada y todo te quiero amiga; **Isauro** gracias por escuchar en momentos donde no había nadie, aunque naco, es entretenido hablar contigo, te quiero amigo; **Beto** gracias por tus consejos y ayuda, el médico y maestro personal de la banda, que junto con Gaby explicaba lo complejo y aunque eras estresante en los días que pasabas filosofando, te quiero compañero; **Chino** (Genaro), aunque te cambiaste de carrera, nunca perdimos contacto, todas esas salidas y pláticas, te quiero manito; **Kari** gracias por la ayuda en todo, incluyendo tareas y trabajos, tu compañía en las clases y bueno esas tardes de chismes siempre relajantes, te quiero amiga.

A mis relampiamigos, los que compartieron conmigo un poco más en mis últimos años de universidad; **Gaby** sabes que eres mi amiba *la Maribel*, con quien siempre puedo contar y a quien le puedo decir cualquier cosa, te he llegado a apreciar tanto como si fueras mi hermana, con pleitos y hasta mandándonos al diablo aquí seguimos, no te desanimes por amor ni por escuela, eres muy inteligente así que tranquila, supongo que todo llega a su tiempo; **Joel**, chalan, compadre, hermano, sabes que eres, igual que todos, parte de mi corazón, al que siempre iba a visitar (molestar) en cada casa que rentaba, con quien podía hablar lo que sea, con quien hacia tareas y a quien acudía cuando no entendía algo, siempre nos acompañamos en nuestra soledad, al querer una cerveza o salir a cenar, muchos te subestimaron, ahora puedes reírte en sus caras, ganamos compadre!!

A todos esos compañeros que me echaron la mano en algún momento decisivo, con quien tuve buenas pláticas y a quienes llegue a apreciar: Brian y Chucho, amigos inseparables que aunque no estaban en el mismo semestre o las mismas clases que yo siempre tuvimos contacto, saludos a galleta. A Xochitl, Guadalupe, Nayeli y Miriam, quienes me acompañaron un rato en mi vida universitaria y me brindaron su amistad sin preguntar.

A mis maestros, específicamente a dos profesores que siempre estuvieron al pendiente de mí y de mi avance en la universidad. Al **Dr. Alejandro Álvarez**, mi querido tutor, siempre encontré en usted apoyo por más oscuro que veía el panorama, un amigo y una persona comprensiva que nunca dejó que me rindiera hasta en los peores momentos de mi carrera, le agradezco toda su ayuda. Y por último pero no menos importante, más bien lo contrario, una de las personas más relevantes en mi vida tanto personal como universitaria, al **Dr. José Antonio Rodríguez Ávila**, mi querido asesor de tesis, mi maestro de química II (en recurso), analítica I y II, mi asesor en los tres trabajos del Congreso Nacional de Química Analítica, mi amigo, creo que a ti es al que le debo la mayor parte de mi carrera.

Química II fue la primera materia que reprobé, claro, eso jamás me enorgullecerá, pero gracias a eso conocí a una de las mejores personas, a uno de los doctores más inteligentes que podre conocer en mi vida. Hace poco hablando contigo, me di cuenta que te conocí prácticamente al inicio de mi carrera, dirías tu bien chavita. Recuerdo que todos temían tener una clase contigo por ser tan estricto y cuando te conocí no fui la excepción, fue difícil al principio pero fueron las mejores clases, volviste a despertar mi amor por la química y en especial la analítica aun cuando fuera el peor obstáculo para todos, siempre fue mi favorita (when i grow up i want to be an analytical chemist, remember?). Aun no estoy segura de cuál fue la razón por la que me elegiste para trabajar contigo, pero te lo agradezco, todo el trabajo en laboratorio y las exposiciones de éstos, fueron experiencias que me ayudaron y ayudan mucho, esos viajes y compartir con los otros tesisistas me enseñaron muchas cosas. Gracias por esas oportunidades.

Y bueno, compartiendo tanto tiempo te convertiste en un buen amigo, que siempre me escucho y me apoyo; veía como regañabas a los demás estudiantes cuando iban por alguna asesoría pero nunca sentí que me regañaras, al contrario me aconsejabas y ayudabas cuando lo necesitaba, siempre estuviste al pendiente de mí. Esa similitud en nuestras historias supongo que nos acerca un poco más, se que entiendes por lo que pase, lo que sentí y lo que viví. Y aunque tenemos caracteres muy fuertes siempre fue fácil convivir contigo.

Recordar todo lo que ha pasado, desde el burro que apareció fuera de mi casa y no me dejaba salir, razón por la que llegue tarde a tu clase (y hay una foto como evidencia), toda la comida que me has dado cuando ni tiempo tenía de almorzar, acompañarme hasta que terminara mis corridas de todo el día en electroforesis, hasta las últimas revisiones de tesis, en serio y de corazón te agradezco infinitamente. Sin tu ayuda tal vez no hubiera terminado la carrera, siempre seguí adelante pensando que tú esperabas mi mejor desempeño, que debía terminar porque así, en cierta forma, expresaría mi gratitud hacia ti y estarías orgulloso de mí. Muchas, muchas gracias por todo el apoyo y la inspiración; **esto no es un adiós, es un hasta luego.** ☺

*Nuestras mayores tonterías pueden ser muy sabias.
Leonardo Da Vinci*

A mi padre

A mi asesor y amigo Pepe

A Dios

*Si una persona es perseverante, aunque sea dura de entendimiento, se hará inteligente;
y aunque sea débil se transformará en fuerte.*

Leonardo Da Vinci

1452-1519

Pintor, anatomista, arquitecto, botánico,
científico, escritor, filósofo, ingeniero, músico,
poeta, escultor e inventor italiano.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS	III
ÍNDICE DE TABLAS.....	IV
1 ANTECEDENTES.....	- 2 -
1.1 Edulcorantes.....	- 2 -
1.1.1 Historia	- 2 -
1.1.2 Clasificación	- 7 -
1.1.3 Propiedades fisicoquímicas de los edulcorantes de estudio	- 8 -
1.2 Determinación de edulcorantes.....	- 15 -
1.2.1 Espectrometría UltraVioleta-Visible (UV-Vis)	- 15 -
1.2.2 Cromatografía de líquidos de alta resolución	- 16 -
1.2.3 Métodos electroquímicos	- 19 -
1.2.4 Electroforesis capilar	- 20 -
2 OBJETIVOS.....	- 26 -
2.1 Objetivo general.....	- 26 -
2.2 Objetivos específicos	- 26 -
3 PARTE EXPERIMENTAL	- 28 -
3.1 Reactivos, soluciones estándar y preparación de muestras.....	- 28 -
3.2 Procedimiento de análisis en electroforesis.....	- 28 -
4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	- 31 -
4.1 Análisis de compuestos que absorben en la región UV	- 31 -
4.2 Análisis de sucralosa	- 38 -
4.3 Análisis conjunto.....	- 41 -
5 CONCLUSIONES	- 42 -
6 REFERENCIAS	- 42 -

ABREVIATURAS

AC	Acesulfame
DNBA	Ácido dinitrobenzónico
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos
AS	Aspartame
C	Cafeína
mM	Concentración milimolar
M	Concentración molar
pKa	Menos logaritmo de la constante de acidez
CCEM	Cromatografía capilar electrocinética micelar
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
DER	Desviación estándar relativa
DLZP	Diagrama lineal de zonas de predominio
D.I.	Diámetro interno
SDS	Dodecilsulfato de sodio
EC	Electroforesis capilar
HPCE	Electroforesis capilar de alta resolución
ECZ	Electroforesis capilar de zona
E.I.	Estándar interno
F	Fenilalanina
GRAS	Generalmente reconocidas como seguras
IDA	Ingesta diaria admisible

ESI-MS	Ionización por electrospray acoplado a espectrometría de masas
LOD	Limite de detección
µg	Microgramos
µL	Microlitros
µm	Micrómetros
N.R.	No reportado
FAO	Organización para la Agricultura y la Alimentación
WHO	Organización Mundial de la Salud
S	Sacarina
Suc	Sucralosa
Tris	Tris-hidroximetilaminometano
UV	Ultravioleta
UA	Unidades arbitrarias
UE	Unión europea

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Representación esquemática del ajuste AH/B y de los sitios donadores en los grupos funcionales de algunos edulcorantes.	4
2. Clasificación de edulcorantes.	7
3. Estructura del acesulfame.	8
4. Estructura del aspartame.	10
5. Estructura de la sacarina.	12
6. Estructura de la sucralosa.	13
7. Espectro de absorción de aspartame, acesulfame-K y sacarina (pH 1.3).	15
8. Diagrama lineal de zonas de predominio de los edulcorantes analizados en la primera fase.	31
9. Electroferogramas obtenidos del análisis de una solución estándar de 50 mg L ⁻¹ de: fenilalanina (F), aspartame (AS), sacarina (S), acesulfame K (AC) y cafeína (C) utilizando los electrolitos soporte: A) 1, B) 2 y C) 3.	34
10. Electroferogramas obtenidos del análisis de sucralosa (Suc) utilizando las los electrolitos: A) 1, B) 2, C) 3, D) muestra real analizada utilizando el electrolito 2.	39
11. Electroferograma de los edulcorantes de estudio en un análisis simultáneo utilizando el electrolito soporte de la segunda fase.	41

ÍNDICE DE TABLAS

1. Poder edulcorante de algunos compuestos alternativos a la sacarosa	2
2. Edulcorantes de estudio aprobados por FDA y UE	6
3. Determinación de diferentes edulcorantes en bebidas no alcohólicas mediante cromatografía de líquidos.	16
4. Determinación de algunos edulcorantes en bebidas no alcohólicas mediante métodos electroquímicos.	19
5. Determinación de algunos edulcorantes en bebidas no alcohólicas mediante electroforesis capilar de zona.	21
6. Determinación de sucralosa (edulcorante no cromóforo) en bebidas no alcohólicas mediante electroforesis capilar.	22
7. Determinación de algunos edulcorantes y aditivos en bebidas no alcohólicas y conservas mediante electroforesis capilar de zona y cromatografía capilar electrocinética micelar.	23
8. Electrolitos soporte evaluados para la separación de edulcorantes comerciales.	32
9. Movilidades aparentes ($\text{cm}^2 \text{ kV}^{-1} \text{ min}^{-1}$) de los edulcorantes analizados, con respecto a los diferentes electrolitos soporte utilizados.	33
10. Parámetros de regresión obtenidos del análisis de edulcorantes comerciales.	35
11. Contenido de edulcorantes (mg L^{-1} , %DER, $n=3$) en bebidas no alcohólicas comerciales determinado por el método de análisis propuesto y comparado con lo reportado por el fabricante.	36
12. Composición de los electrolitos soporte evaluados para la determinación de sucralosa.	38

13. Parámetros de regresión obtenidos para el análisis de sucralosa.	40
14. Contenido de sucralosa (mg por cada 100 mL, %DER, n=3) en bebidas comerciales determinado por el método de análisis propuesto.	40

ANTECEDENTES

1 ANTECEDENTES

1.1 Edulcorantes

1.1.1 Historia

Tanto la naturaleza como el hombre producen alimentos que son aceptados por su sabor dulce, siendo esta propiedad sensorial agradable para la mayoría de los individuos. A los agentes que producen este sabor se les designa con el nombre de edulcorantes. El poder edulcorante (Tabla 1) es un término que se refiere a la capacidad de una sustancia para causar dicho sabor y se mide subjetivamente tomando como base de comparación la sacarosa a la que se le da el valor de 1 [1]. Además de ser la base de la capacidad edulcorante, la sacarosa es el aditivo más utilizado en la dieta humana [2].

Tabla 1. Poder edulcorante relativo de algunos compuestos alternativos a la sacarosa [3].

Edulcorante	Poder Edulcorante aproximado (Sacarosa = 1)
Lactitol	0.4
Isomalt	0.45 – 0.65
Sorbitol	0.6
Manitol	0.7
Maltitol	0.9
Xilitol	1.0
Fructosa cristalina	1.2 – 1.7
Ciclamato	30
Aspartame	180
Acesulfame potásico	200
Sacarina	300
Esteviósido	300
Sucralosa	600
Neohesperidina dihidrochalcona	1800
Alitamo	2000
Taumatina	2000 – 3000
Neotamo	8000

El consumo de sacarosa debe ser regulado o restringido en algunos casos; como ejemplo se encuentran las personas diabéticas, debido a que aumenta la tasa de glucosa en la sangre, o las personas con sobrepeso. Este carbohidrato se ha sustituido en diversos productos con

edulcorantes no nutritivos naturales o sintéticos, que ofrecen el mismo sabor sin causar disminución de la calidad de vida de los individuos [2].

La sustitución de la sacarosa por edulcorantes sintéticos no siempre es sencilla, ya que éste azúcar no solo desempeña el papel de saborizante sino que también actúa, en muchos casos, como conservador o para conferir textura y consistencia al producto, esto se puede observar en mermeladas [1].

Los edulcorantes artificiales de alta intensidad juegan un rol importante en nuestra sociedad no solo para personas diabéticas sino también para personas que consumen alimentos bajos en calorías [4]. En la industria de alimentos son promovidos los productos con edulcorantes artificiales (frecuentemente llamados “de dieta” o “light”) debido a sus beneficios [5].

Idealmente, un edulcorante artificial debe ser incoloro e inodoro en solución, estable y soluble en soluciones acuosas, no tóxico, no debe dejar sabor residual y no debe metabolizarse o producir metabolitos que perjudiquen al organismo [2]. Hay un gran número de edulcorantes intensos conocidos, pero solo unos cuantos son permitidos para ser utilizados en la industria alimentaria [5]. Los más usados son acesulfame-K, aspartame, ciclamato, sacarina y sucralosa [4,6]. Su uso está dirigido principalmente a consumidores de cuatro áreas del mercado de alimentos y bebidas: 1) para tratamiento de la obesidad, 2) mantenimiento del peso corporal, 3) el manejo de la diabetes y 4) para la prevención y reducción de caries dental [6].

Los edulcorantes pueden ser usados por separado o combinados con otros edulcorantes sinérgicamente compatibles reportados como mezclas, esto para la reducción de costos y mejorar la calidad de sabor [5,6]. En estos días, lo más común en la industria alimentaria es el uso de mezclas de edulcorantes, porque muchos de estos imparten sabores alternos o residuales que pueden limitar sus aplicaciones en alimentos y bebidas. Se ha descrito que cada mezcla tiene un edulcorante problema que presenta diferentes rendimientos dependiendo de las proporciones en mezcla. Por ejemplo en la mezcla de sacarina-ciclamato, el regusto amargo de la sacarina es enmascarado por el ciclamato mientras que el desagradable regusto del ciclamato, sentido por algunas personas, es cubierto por la sacarina. Simultáneamente (debido al efecto sinérgico), el poder edulcorante de las mezclas se incrementa. Una buena formulación de mezclas de edulcorantes puede reproducir de manera precisa el perfil de textura y dulzura de los productos que contienen azúcar, creando nuevos productos caracterizados por un perfil de dulzura original y una estabilidad de sabor [5].

Estos edulcorantes artificiales (también llamados edulcorantes no nutritivos) forman una clase importante de aditivos alimentarios en todo el mundo, los cuales son comúnmente utilizados en alimentos, bebidas, confitería y productos farmacéuticos [5-7]. Son usados en medicamentos para enmascarar las características organolépticas de los fármacos [2] y en productos de higiene bucal para disminuir la incidencia de caries, pues no son metabolizados por la microflora encontrada en la boca [2,5].

Los edulcorantes pueden pertenecer a diversas clases químicas. Debido a esta diversidad estructural, muchos estudios han sido realizados con el objetivo de conocer la relación existente entre sus propiedades fisicoquímicas y el sabor presentado por estas sustancias [2].

En la literatura, existen diversas teorías sobre la relación que existe entre las propiedades fisicoquímicas de los edulcorantes y el sabor dulce presentado por éstos. Entre estas, se encuentra la teoría desarrollada por Shallenberger, mayormente conocido como concepto AH/B, y completada por Kier. Ésta se basa en la propiedad biológica de la estructura específica del edulcorante. La manifestación de sabor dulce depende principalmente del “ajuste” de los grupos funcionales presentes en el edulcorante al sitio receptor de las papilas gustativas en la lengua. Este “ajuste” (Figura 1) está relacionado con la formación de puentes de hidrógeno. Kier propone además de estas uniones, la formación de una tercera unión, estando relacionada con la región hidrofóbica del edulcorante con el sitio receptor. Esta teoría podría explicar el alto poder edulcorante de algunos compuestos pero para otros puede estar relacionado con propiedades macroscópicas todavía no definidas [2,7].

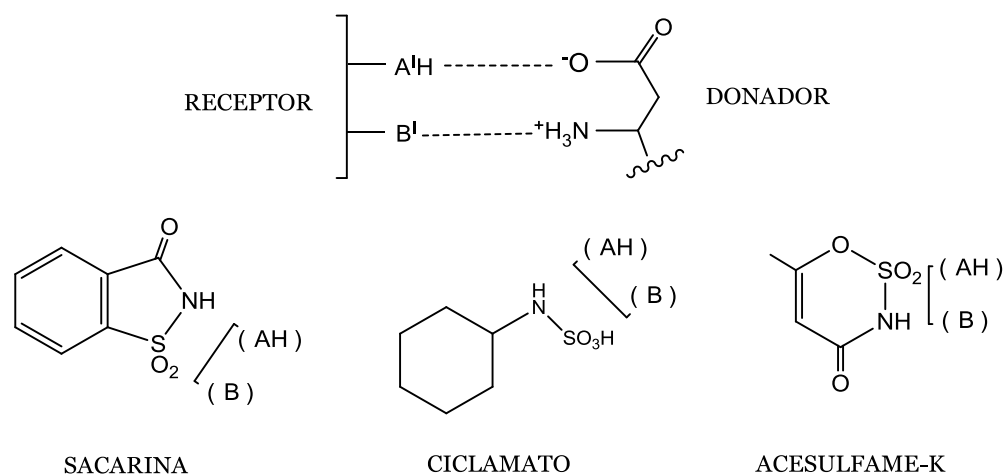


Figura 1. Representación esquemática del ajuste AH/B y de los sitios donadores en los grupos funcionales de algunos edulcorantes.

Existe una gran discusión sobre la seguridad de algunos edulcorantes. Debido a los aspectos médicos y legales, la determinación de estos edulcorantes artificiales en productos dietéticos y preparaciones farmacéuticas tiene una relevancia social y económica [6].

En las últimas dos décadas, el consumo de alimentos con pocas calorías por la población mundial ha aumentado drásticamente, así como la seguridad asociada con el alta ingesta de edulcorantes sintéticos [8]. Con respecto a la legislación y regulación de edulcorantes y sus combinaciones, existen diversos organismos tanto internacionales como de cada país, quienes aplican diferentes pruebas para la aprobación de edulcorantes y regulan las cantidades máximas permitidas que pueden ser agregadas a cada grupo específico de alimentos [3,8].

Entre los grupos internacionales se encuentran la Organización para la Agricultura y la Alimentación (FAO, por sus siglas en inglés), la Organización Mundial de la Salud (WHO, por sus siglas en inglés), la Comisión de Codex Alimentario y el Comité Científico para la Alimentación de la Comisión de la Unión Europea. El objetivo de los programas de aditivos alimentarios de la FAO y la WHO es hacer evaluaciones sistemáticas de estos y proveer ventaja a los países miembros de la FAO y la WHO en el control de aditivos y aspectos relacionados con la salud [3].

El propósito de estos programas es “proteger la salud de los consumidores y asegurar prácticas adecuadas en el mercado alimentario; promover la coordinación de todos los estándares alimenticios de trabajo emprendidos por las organizaciones internacionales gubernamentales y no gubernamentales; determinar las prioridades, iniciativas y guías de preparación de estándares a través de organizaciones apropiadas; finalizar los estándares y después publicarlos en un Codex Alimentario ya sea como estándares mundiales o regionales” [3].

La Unión Europea (UE) está de acuerdo en igualar las leyes de los aditivos de los países miembros, incluyendo edulcorantes. La dirección de edulcorantes, creada en 1994, permite el uso de acesulfame-K, aspartame, ciclamato, sacarina, taumatina y neohesperidina, así como sorbitol, manitol, isomalt, maltitol, lactitol y xilitol [3].

Los edulcorantes de bajas calorías, como son acesulfame-K, aspartame, sacarina y sucralosa, han sido aprobados para su uso en alimentos (Tabla 2) en los Estados Unidos por la Administración de Alimentos y Drogas (FDA por sus siglas en inglés), que actualmente está considerando las peticiones de aprobación de otros edulcorantes nuevos. Antes de ser

aprobados por la FDA, todos los edulcorantes deben ser sometidos a una extensa evaluación de seguridad con pruebas en humanos y animales. Los edulcorantes aprobados tienen el mismo estándar de seguridad para personas en general que para el consumo por mujeres embarazadas y niños [9].

Se utiliza la etiqueta de GRAS cuando se tiene la experiencia del uso común en alimentos y se basa con datos disponibles publicados en varios países extranjeros [3]. La determinación de GRAS para una sustancia, puede o no ser solicitada por la FDA, ya que no requiere la acción de ésta.

La denominación de “generalmente reconocido como seguro” (GRAS), debe reflejar los criterios de expertos calificados con entrenamiento científico y experiencia para evaluar la seguridad de las sustancias directa o indirectamente agregadas al alimento. Estos criterios deben basarse en procedimientos científicos, que incluyen estudios analíticos en humanos, animales y otros publicados o no, apropiados para establecer la seguridad del compuesto. El término “seguro” significa que existe certeza razonable por parte de los científicos competentes que la sustancia no es perjudicial bajo las condiciones de uso [3].

Tabla 2. Edulcorantes de este estudio aprobados por la FDA y UE.

Edulcorante	Aprobado por FDA [9]	Aprobado por UE [10]
Acesulfame	✓	✓
Aspartame	✓	✓
Ciclamato	X	✓
Sacarina	✓	✓
Sucralosa	✓	✓

En México, se siguen las regulaciones establecidas por la FDA, escritas en el Codex Alimentario (Codex Stan 192-1995). Muchas normas para la producción de alimentos y regulación de aditivos en nuestro país son basadas en este.

1.1.2 Clasificación

En términos generales se pueden dividir en nutritivos y no nutritivos, aunque también se clasifican en naturales y sintéticos. Entre los edulcorantes nutritivos se encuentra la sacarosa, que es el más utilizado tanto por la población como en la industria alimentaria [2]. Adicionalmente se encuentran monosacáridos y disacáridos como glucosa, fructosa, lactosa, miel de abeja y jarabes de maíz. Se utilizan algunos glucósidos (filodulcina, esteviósidos, osladina, glicirricina), alcoholes polihídricos (sorbitol, xilitol) y proteínas (taumatina, monelina, miralina) [1].

De los edulcorantes sintéticos destaca el uso en México del acesulfame-K, aspartame, sacarina y sucralosa [1]. En la Figura 2 se muestra la clasificación propuesta por Fatibello y col [2].

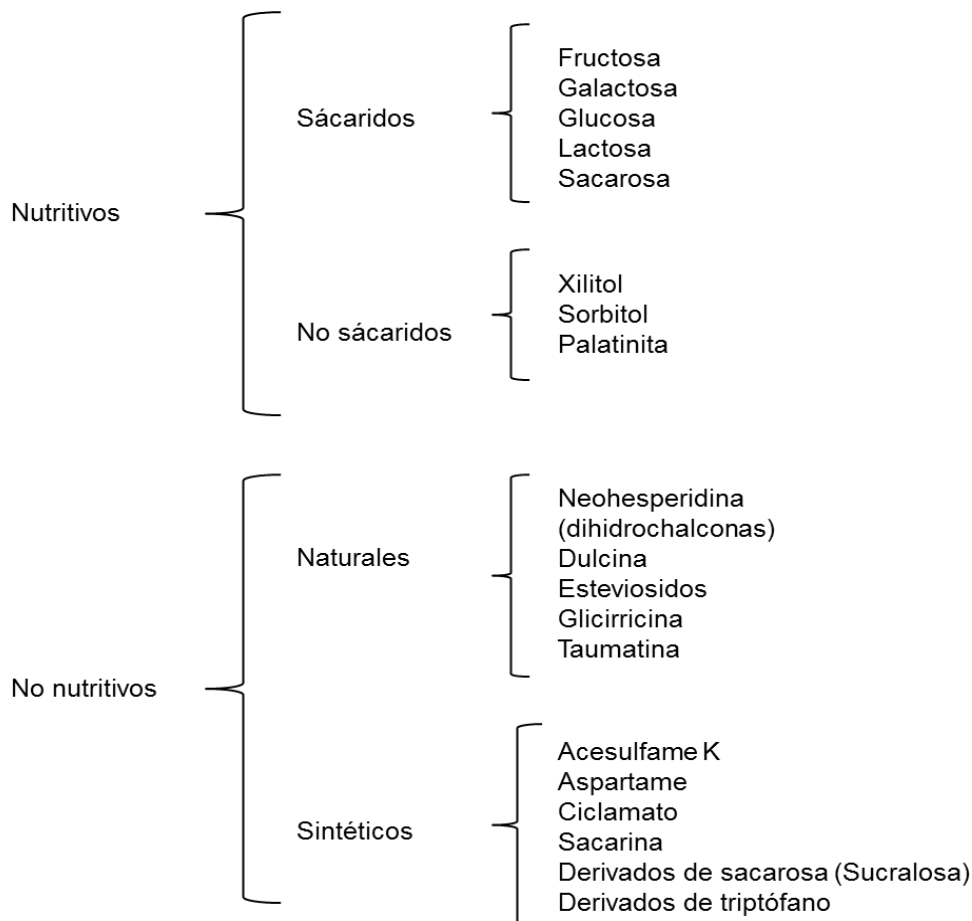


Figura 2. Clasificación de edulcorantes.

1.1.3 Propiedades fisicoquímicas de los edulcorantes de estudio

Los edulcorantes artificiales intensos, muy promovidos por la industria alimentaria, son los aditivos alimentarios más controversiales debido a lo sospechoso de los efectos adversos [5]. El análisis de los mismos está ligado a sus características fisicoquímicas. A continuación se resumen las características de los edulcorantes de estudio.

1.1.3.1 Acesulfame-K

El acesulfame-K o acesulfame potásico (Figura 3), fue descubierto accidentalmente en 1967 y hoy, es uno de los edulcorantes más importantes. Forma cristales desde incoloros a blancos; no es un compuesto higroscópico. Con una fórmula molecular de $C_4H_4KNO_4S$, tiene una densidad de 1.81 g cm^{-3} , un peso molecular de $163.15 \text{ g mol}^{-1}$ y un punto de fusión menor a 200°C [7,11]. La ingesta diaria aceptada (IDA) es de 15mg Kg^{-1} , esta afirmación incluye el consumo de niños y mujeres embarazadas. La IDA del acesulfame-K es equivalente al dulzor de aproximadamente 180g de azúcar por día para un adulto de 60Kg [11].

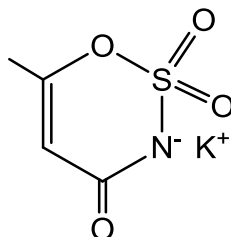


Figura 3. Estructura del acesulfame.

La constante de acidez de éste compuesto es de 2.0 [7]. Tiene un dulzor de aproximadamente 200 veces más que la sacarosa cuando es usado en las cantidades reguladas. El sabor dulce del acesulfame-K es percibido rápidamente y sin regustos no placenteros. Es fácilmente soluble en soluciones acuosas, soluciones alcohólicas-acuosas con mayor contenido de agua y es poco soluble en la mayoría de solventes orgánicos. Además de ser usado en forma de polvo, también puede ser usado en forma de soluciones concentradas [11].

Bajo condiciones normales de almacenamiento y procesamiento, el acesulfame-K es estable en alimentos líquidos y bebidas. Como polvo, el acesulfame-K puede ser almacenado por años sin sufrir cambios visibles o analíticamente detectables. También es estable en preparaciones en

seco como polvo para preparar bebidas o postres, aunque también es estable en productos con bajo contenido de agua como dulces macizos y goma de mascar. A niveles de pH comunes y condiciones de almacenamiento acostumbradas el dulzor de las bebidas con acesulfame-K permanece sin cambios. Todavía almacenado a 40°C resulta imperceptible la pérdida de dulzor, solo después de muchos meses a estas condiciones. A valores de pH ácidos y un largo periodo de almacenamiento continuo a altas temperaturas, puede perder ligeramente su dulzor de manera detectable analíticamente [11]. Es estable bajo condiciones de calentamiento usadas en el procesamiento de los alimentos. La pasteurización o la ultra pasteurización no producen pérdidas del acesulfame-K. También es posible utilizar los procesos de secado como el spray-dry sin tener pérdida. El blanqueado y esterilizado utilizado en productos frutales y vegetales, tampoco resulta en pérdidas de acesulfame-K cuando se realizan en condiciones acostumbradas. A temperaturas de panificación tampoco existe pérdida de acesulfame-K (estudios comprobaron que no existía pérdida en panes horneados al exceso, hasta que se quemó la superficie y quedó inaceptable). Aplicar microondas a alimentos con acesulfame-K es posible, pero con sus limitaciones. Para confitería, el acesulfame-K puede ser agregado antes en procesos comunes de cocción [11].

Como en los demás edulcorantes, las propiedades organolépticas del acesulfame-K son influenciadas por el alimento en el que es agregado. A bajas concentraciones su sabor dulce es puro, mientras que puede ser perceptible un regusto en ocasiones a elevadas concentraciones. En la práctica, estas cantidades tienen poca importancia, ya que normalmente se utilizan mezclas de acesulfame-K con otros edulcorantes para aumentar el dulzor [11].

Las mezclas binarias de acesulfame-K con aspartame, ciclamato y sucralosa tienen efectos sinérgicos sobre la intensidad del dulzor y proveen una calidad de sabor significativa. En mezclas ternarias con aspartame y ciclamato, el dulzor aumenta hasta un 90%. En mezclas binarias de acesulfame-K y aspartame puede llegar a rangos de 40-50%. En contraste, el sinergismo en mezclas con sucralosa es notablemente bajo [11].

En México está permitido el empleo de acesulfame-K como sustituto de azúcar con un límite máximo en el producto de 350mg L⁻¹ en alimentos, bebidas, congelados, polvos jarabes y concentrados [12].

1.1.3.2 Aspartame

El aspartame (Figura 4) es un edulcorante intenso, considerado no nutritivo, producido combinando los aminoácidos L-fenilalanina y L-ácido aspártico por un enlace éster. Fue descubierto en 1965 en los laboratorios G.D. Searle. Ha sido vigilado y analizado rigurosamente desde su primera aparición en el mercado estadounidense en 1981. Este compuesto fue fuertemente promocionado y constituyó un fenomenal éxito comercial del aspartame como reemplazo para el azúcar en las décadas de 1980 y 1990.

El aspartame ($C_{14}H_{18}N_2O_5$) es un polvo blanco; tiene un peso molecular de $294.31 \text{ g mol}^{-1}$. El aspartame puede ser comercializado como par iónico en mezcla con acesulfame-K. Esta mezcla no es higroscópica y se disuelve mejor que el aspartame, teniendo beneficios de estabilidad en diferentes aplicaciones. Se reportó un IDA del aspartame de 50 mg Kg^{-1} de peso corporal por día [3,7].

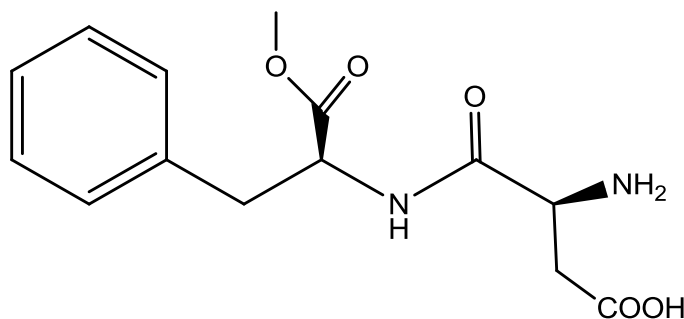


Figura 4. Estructura del aspartame.

La solubilidad del aspartame incrementa al aumentar la temperatura y disminuir el pH (aumentar acidez). Los valores de las constantes de acidez son de 3.19 y 7.87, su solubilidad es mínima en su punto isoeléctrico a pH de 5.4 y es ligeramente soluble en compuestos como los hidrocoloides [3,7].

En forma sólida y a temperatura ambiente, el aspartame tiene una excelente estabilidad (más de 5 años), aún en temperaturas altas. Su estabilidad mejora en sistemas con menos del 8% de humedad. El aspartame es menos estable en sistemas líquidos y su estabilidad depende principalmente del pH, la temperatura y el tiempo. La molécula de aspartame se hidroliza lentamente a bajos pH y produce la molécula sin sabor aspartil-fenilalanina y metanol; una ruta alternativa a pH 5 es que el aspartame tome forma cíclica y se produzca diceto-piperazina con

eliminación de metanol. Esta conversión de productos puede dar posteriormente la hidrólisis de la molécula en los aminoácidos fenilalanina y ácido aspártico. Su estabilidad es mayor en pH de 3 - 5. Su estabilidad disminuye con el aumento de temperatura. La degradación del aspartame en líquidos durante el tratamiento térmico es pequeña en un rango de pH óptimo. Su estabilidad también puede ser afectada por algunos sabores específicos; por ejemplo, el sabor a canela y algunos compuestos terpenoides parecen acelerar la degradación. Como muchos factores pueden afectar la estabilidad del aspartame en los alimentos, es apropiado el realizar pruebas de almacenamiento y aceptabilidad en los productos que se usará [9].

Tiene un sabor dulce y es aproximadamente 180 veces más dulce que la sacarosa; su perfil de dulzura es más parecido al de la sacarosa que el de otros edulcorantes. Se ha reportado un efecto sinérgico del aspartame con glucosa, sacarosa, fructosa, polioles, sacarina, ciclamato, acesulfame-K y estevia. Es interesante como la combinación de aspartame y sucralosa no parece tener efecto sinérgico con respecto a la intensidad de dulzura. El aspartame es frecuentemente mezclado con acesulfame-K o sacarina, en estas circunstancias es notorio el sinergismo en la intensidad de dulzura. Es igualmente importante en estas mezclas, los efectos de modificación de los gustos amargo/metálico del aspartame y el sabor del acesulfame-K y la sacarina [3].

En nuestro país, se permite el uso de aspartame como sustituto de azúcar con un límite máximo en el producto de 350 mg L^{-1} en alimentos, bebidas, congelados, polvos jarabes y concentrados [12].

1.1.3.3 Sacarina

Es el primer compuesto orgánico comercializado de sabor dulce y más potente que la sacarosa. El descubrimiento de la sacarina fue reportado en 1879. Está disponible comercialmente en forma de sales de sodio y calcio, las cuales son de color blanco y sin olor. La sacarina en su forma ácida es poco soluble en agua mientras que en forma de sales su solubilidad es elevada. La sacarina de sodio ($\text{C}_7\text{H}_4\text{NO}_3\text{SNa}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$) es la sal más utilizada; tiene un peso molecular de 241.20 g mol^{-1} , una solubilidad de 1200 g L^{-1} y un punto de fusión cercano a $300\text{ }^\circ\text{C}$. Tiene un IDA de 5 mg Kg^{-1} [3,11].

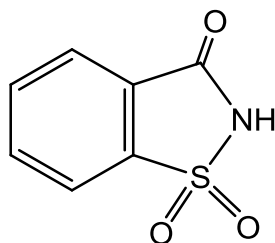


Figura 5. Estructura de la sacarina.

En solución acuosa tiene una constante de acidez de 2.2 (Figura 5). La sacarina es estable a muchas condiciones y su degradación depende del pH. Los compuestos de degradación se encuentran solo en trazas y no es un problema relevante. Como consecuencia de la alta estabilidad, no pierde el dulzor durante la vida útil del producto [3,11].

La sacarina es aproximadamente 300 veces más dulce que la sacarosa. El perfil de sabor de la sacarina es inferior al de la sacarosa, su sabor dulce está acompañado por un marcado regusto amargo y metálico. Entre más concentrada sea la solución estos regustos son más perceptibles. Se espera ausencia de sinergismo entre sacarina y acesulfame-K por similitud de estructuras ya que compiten por el mismo sitio receptor de enlace. Por otro lado, se encuentra fuerte sinergismo con el aspartame [3,11].

La sacarina actualmente se utiliza como endulzante de mesa. No se puede utilizar para otras aplicaciones debido a que no aporta las propiedades físicas necesarias que son provistas por la sacarosa. Además, el regusto amargo/metálico requiere que sea usado en mezclas con aspartame y ciclamato [3,11].

En México, se tiene establecido en normas un límite máximo permitido de 30mg de sacarina por porción en alimentos elaborados y 400mg de sacarina por Kg de producto en bebidas no alcohólicas [13].

1.1.3.4 Sucralosa

La sucralosa (C₁₂H₁₉Cl₃O₈) es uno de los edulcorantes más recientes utilizados en la industria alimentaria. Se obtiene a partir de la modificación de la sacarosa resultando un edulcorante intenso con una estructura estable y con un sabor parecido al azúcar. Es un polvo blanco, sin

olor y soluble en agua, no es higroscópico y no requiere condiciones especiales para su almacenamiento. Su peso molecular es de $397.64 \text{ g mol}^{-1}$, tiene un punto de fusión de 125°C , con una solubilidad 283 g L^{-1} de agua. La sucralosa tiene un placentero sabor dulce y no tiene regustos. Tiene una IDA de 15mg por Kg de peso corporal por día [11].

La cloración selectiva de la molécula de sacarosa (Figura 6) produce cambios remarcables en la intensidad de la dulzura y en la estabilidad, sin comprometer la calidad del sabor. El enlace glucosídico resultante de la sucralosa es mucho más resistente a la hidrólisis ácida y enzimática, esto lo hace no calórico y no carcinogénico. Es muy estable bajo condiciones de calentamiento y grandes intervalos de pH [5].

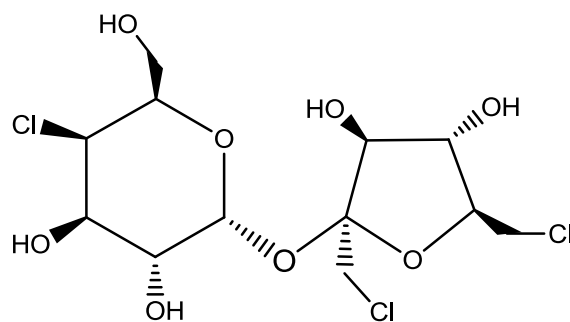


Figura 6. Estructura de la sucralosa.

En forma de polvo, es muy estable si se mantiene apropiadamente empacado a temperaturas adecuadas en su almacenamiento. Su gran estabilidad la hace adecuada para su uso en productos con pH neutro y bajo, así como en alimentos sometidos a procesos térmicos [11]. En su forma líquida es extremadamente estable química y microbiológicamente y compatible con muchas operaciones alimentarias.

Tiene un dulzor de aproximadamente 600 veces más que la sacarosa, pero a mayores concentraciones su dulzor disminuye. Puede funcionar solo o en mezcla, existe sinergismo con acesulfame-K, ciclamato y sacarina. También hay sinergismo con edulcorantes nutritivos como la fructosa pero no con la sacarosa [11]. Es un edulcorante muy versátil, que puede ser usado en una gran variedad de alimentos y bebidas [5].

La sucralosa ha sido aprobada en más de 60 países y las personas en el mundo la consumen diariamente. Las sospechas de la seguridad de la sucralosa corresponden mayormente a la presencia de tres átomos de cloro en su estructura, lo que lo hace un organoclorado. Debido a

que muchos organoclorados son tóxicos o carcinogénicos (como algunos pesticidas y las dioxinas), existe desconfianza de la sucralosa. Sin embargo, los estudios en seres humanos y animales han mostrado que este edulcorante no posee potencial carcinogénico, riesgo reproductivo o neuronal en las personas [5].

Para su uso en México, la sucralosa ya tiene límites máximos establecidos: 0.1% en cereales para desayuno, 0.025% en bebidas y postres, 0.065% en mezclas para hornear y panadería y 0.15% en jarabes de mesa [13].

1.2 Determinación de edulcorantes

1.2.1 Espectrometría UltraVioleta-Visible (UV-Vis)

La espectrofotometría es una de las técnicas más empleadas para el análisis de rutina de una gran cantidad de compuestos. La composición de la muestra es un factor determinante en la elección de la metodología de análisis. Para muestras de edulcorantes comerciales que contienen un solo analito, el análisis es más sencillo. Por ejemplo, se ha empleado la espectrofotometría en el análisis de sacarina en muestras simples mediante la formación de un cromóforo entre el p-cloranil y la sacarina en presencia de H_2O_2 . El compuesto rojo-violáceo formado se detecta a 550 nm, lográndose alcanzar límites de detección de 1.55×10^{-5} M [14].

En el caso de mezclas, se han evaluado estrategias de análisis multivariante. Llamas y colaboradores describen el análisis de sacarina y acesulfame K en presencia de aspartame como interferente. Aprovechando que los compuestos tienen coeficientes de absorción molar diferentes en la región UV (Figura 7), se realiza un análisis mediante calibración multivariada utilizando los espectros obtenidos en el intervalo de 190 a 310 nm utilizando soluciones estándar a pH de 1.3. Los límites de detección alcanzados son de 0.32 y 0.09 mg L^{-1} para sacarina y acesulfame K, respectivamente. El método fue aplicado a muestras sencillas de edulcorantes comerciales [15].

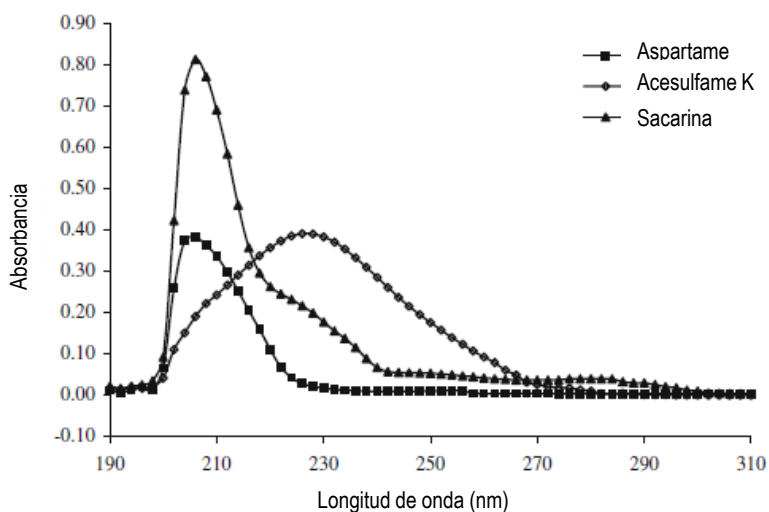


Figura 7. Espectro de absorción de aspartame, acesulfame-K y sacarina (pH 1.3) [15].

Otra técnica de análisis multivariante para la determinación de acesulfame-K y sacarina se basa en la reacción de oxidación utilizando permanganato de potasio en medio alcalino que da lugar al ion manganato de color verde. Este método depende de las diferentes cinéticas de oxidación de los analitos registradas a 608 nm. Los límites de detección alcanzados son de 0.2 y 0.08 mg L⁻¹ para sacarina y acesulfame-K, respectivamente [16].

1.2.2 Cromatografía de líquidos de alta resolución

Para el análisis de edulcorantes, ya sea de manera individual o en forma de mezclas, el método mayormente reportado ha sido la cromatografía de líquidos de alta resolución y la cromatografía iónica, en combinación con diferentes detectores, siendo el ultravioleta el más usado [17].

Debido a que las propiedades fisicoquímicas, electroquímicas y espectrales de cada edulcorante son distintas, un método para la determinación simultánea siempre tendrá restricciones para la separación y detección de alguno de los analitos de manera simultánea.

Para ciertos edulcorantes la detección UV no es adecuada debido que no presentan absorción en la región UV/Visible. Como los edulcorantes frecuentemente se usan en combinación, se necesita un método adecuado para su determinación conjunta [17]. Algunas estrategias de análisis en bebidas no alcohólicas se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3. Determinación de diferentes edulcorantes en bebidas no alcohólicas mediante cromatografía de líquidos.

Analito	Fase móvil	Columna	Detección	LOD	Referencia
Aspartame, Sacarina	Isocrática utilizando trietilamina, tampón fosfato (pH 3), metanol y tetrahidrofurano	C-18 (10 µm, 250 X 4 mm)	UV 220, 270nm	N.R.	17

Tabla 3. Continuación.

Analito	Fase móvil	Columna	Detección	LOD	Referencia
Sacarina, acesulfame-K, ácido benzoico y sórbico	Isocrática, metanol: tampón fosfato (pH 6.7) 8:92 v/v	C-18 (5µm, 250 X 4.6 mm)	UV 227 nm	1.0 mg L ⁻¹	18
Acesulfame-K, aspartame, sacarina, ácido benzoico, ácido sórbico, ponceau 4R, amarillo ocaso y tartrazina	Gradiente, metanol: tampón fosfato (pH 4.0) 5:95	C-18 (10µm, 250 X 4.6 mm)	UV 235, 210, 210nm	0.1-3.0 mg L ⁻¹	19
Acesulfame-K, aspartame, sacarina, vainillina, ácido benzoico y ácido sórbico	Gradiente de acetonitrilo y tampón de acetato de amonio (pH 4)	C18, YMC-ODS (5µm, 250 X 4 mm)	UV 203, 220 y 230 nm	0.2-3.1 mg kg ⁻¹	20
Acesulfame-K, sacarina, ciclamato, aspartame, sucralosa, dulcina, alitamo, neotamo, neohesperidina dihidrochalcona.	Gradiente utilizando trietilamina, ácido fórmico, metanol y acetona	C-18 Nucleodur C18 pyramid (5µm, 250 X 3 mm)	Detector evaporativo de luz dispersa	15.0 mg kg ⁻¹	21

Tabla 3. Continuación.

Analito	Fase móvil	Columna	Detección	LOD	Referencia
Acesulfame-K, sacarina, ciclamato, aspartame, sucralosa, alitamo, neotamo, esteviósidos	Gradiente utilizando tampón de formiato, metanol y acetonitrilo	C-18 (5µm, 250 X 4.5 mm)	ESI-MS	Menor a 0.10 µg mL ⁻¹	22
Sacarina, acesulfame-K, dulcina, conservadores, antioxidantes	Gradiente usando acetonitrilo – solución acuosa α- ácido hidroxisobutirico que contiene bromuro de hexadeciltrimetilamonio	C-18 (5µm, 250 X 4.6 mm)	UV 233nm	0.15-3 µg g ⁻¹	23
Acesulfame-K, sacarina, aspartame, ácido benzoico y sórbico, cafeína, teobromina, teofilina	Isocrática con fosfato diácido de sodio (pH 8.2) – acetonitrilo	Shim-pack IC-A3 (5µm, 150 X 4.6 mm)	UV 205, 227 nm	4-30 mg L ⁻¹	24
Acesulfame-K, sacarina, ciclamato, aspartame	Hidróxido de sodio	Dionex AS11 (250 X 2 mm)	Conductividad	0.019-0.89 mg L ⁻¹	25

1.2.3 Métodos electroquímicos

Se han reportado métodos amperométricos y potenciométricos, incluyendo la valoración del aspartame y detección del punto de equivalencia con diferentes tipos de electrodos. También se han descrito varios sistemas de biosensores como alternativas para el análisis de aspartame en productos dietéticos. Los electrodos se basan en la determinación de especies electroactivas o mediante la construcción de electrodos selectivos de iones basados en electrodos de segunda especie o modificados con membranas selectivas. La Tabla 4 muestra algunos de los métodos electroquímicos empleados en el análisis de aspartame y sacarina en bebidas y edulcorantes de mesa.

Tabla 4. Determinación de algunos edulcorantes en bebidas no alcohólicas mediante métodos electroquímicos.

Edulcorantes	Electrodo	LOD	Referencia
Aspartame	Biosensor potenciométrico basado en carboxil estearasa y alcohol oxidasa. Electrodo de oxígeno disuelto.	5×10^{-8} M	26
Aspartame	Biosensor amperométrico. Electrodo compuesto grafito epoxy modificado con carboxil estearasa y alcohol oxidasa.	2.5×10^{-6} M	27
Sacarina	Valoración potenciométrica con Ag^+ utilizando electrodo indicador de plata	2.5 mg L^{-1}	28
Sacarina	Electrodo potenciométrico de membrana usando aliquat 336S-sacarinato como ionóforo	5.0×10^{-5} M	29
Sacarina	Electrodo potenciométrico de segunda especie $\text{Hg Hg}_2(\text{Sac})_2$	3.9×10^{-7} M	30
Sacarina	Electrodo potenciométrico basado en una membrana de polipirrol	3.6×10^{-4} M	31

1.2.4 Electroforesis capilar

La electroforesis capilar es una técnica analítica de separación y determinación de diferentes compuestos. Su alta eficiencia en la separación, corto tiempo de análisis, sensibilidad, automatización y pequeñas cantidades de muestra, han permitido que sea utilizada en diversas áreas [32]. Las modalidades más utilizadas en la determinación de edulcorantes son la electroforesis capilar de zona (ECZ) y la cromatografía capilar electrocinética micelar (CCEM) [5].

La necesidad de optimizar separaciones para una gran variedad de compuestos tiene como resultado diferentes modalidades de trabajo. El desarrollo de aplicaciones de esta técnica tiene como ventaja el uso de un solo equipo. Ya que los productos alimenticios están compuestos de una gran variedad de moléculas con distintas propiedades químicas, la electroforesis capilar ofrece flexibilidad y versatilidad para realizar el análisis en alimentos y llevar a cabo el control de calidad en productos alimenticios [32]. Su capacidad de separar diversas clases de compuestos en un solo análisis la hace una técnica ideal para su aplicación en bebidas [33]. Los electrolitos utilizados en estos análisis son generalmente tampones de fosfato, borato, benzoato o glicinato con valores de pH en rango de 6 - 9 [5].

La ECZ es por mucho la técnica electroforética más utilizada como método de separación, debido a la simplicidad de operación y de versatilidad. En ECZ el capilar es llenado solo con un electrolito soporte y la migración de los analitos se da en zonas discretas a diferentes velocidades. La separación de mezclas de aniones y cationes es posible por la influencia del flujo electroosmótico y la atracción electrostática; los analitos neutros no migran por sí solos y migran de manera conjunta con este flujo [32].

La detección espectrofotométrica en la región UV es la más usada como método de detección en EC. Para el caso de la determinación de edulcorantes, es utilizada aunque presenta limitaciones debido a que solo algunos de los edulcorantes pueden detectarse de manera directa como el aspartame, acesulfame-K y la sacarina. Algunos ejemplos de la aplicación de ECZ se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5. Determinación de algunos edulcorantes en bebidas no alcohólicas mediante electroforesis capilar de zona.

Edulcorante	Electrolito soporte	Especificaciones	LOD mg L ⁻¹	Referencia
Aspartame, ciclamato, sacarina y acesulfame-K	Tampón de tris hidroximetil aminometano 100mM e histidina 10mM pH 9.4	Capilar de sílica (70cm X 75µm) 30 KV CE-C4D	4.2 2.5 1.5 1.4	8
Aspartame	Tampón 30mM de fosfato con 19mM tris hidroximetil aminometano pH 2.14	211nm 30 KV 30°C HPCE	25	34
Aspartame, ácido benzóico y cafeína	Tampón de glicina 20mM pH 9.0	Capilar de sílica (44cm X 50µm) 215nm 20KV 35°C	1.5	35

El análisis de sucralosa en la región UV se dificulta debido a la ausencia de grupos cromóforos en su estructura [36]. Debido a que la sucralosa es un derivado de la sacarosa, presenta propiedades similares respecto a los edulcorantes naturales como fructosa, glucosa y sacarosa [37]. Se han descrito procedimientos rápidos y simples para la determinación de carbohidratos y ácidos orgánicos en EC utilizando detección indirecta en la región UV, lo que se logra utilizando electrolitos soporte que contengan compuestos cromóforos [36].

La determinación de carbohidratos mediante EC no parece ser una técnica apropiada debido a que carecen tanto de carga (un requisito para la separación electroforética) como de grupos cromóforos (necesario para la detección UV) [38]. Para poder analizar este tipo de compuestos,

se tienen las siguientes opciones: 1) ionización de los grupos hidroxil utilizando valores de $\text{pH} > 13.0$, 2) complejación de borato para la formación de complejos aniónicos, 3) derivatización del compuesto y 4) detección indirecta [38].

El fundamento principal de los métodos de detección indirecta es el hecho de que los carbohidratos son ácidos débiles con pKa generalmente mayores a 12, que pueden ser separados en ambientes alcalinos, donde se necesita un electrolito soporte que asegure la formación de moléculas de azúcar cargadas negativamente [36]. Además, el electrolito soporte debe presentar una alta absorbancia molar lo que permitirá sensibilidades de detección adecuadas [38].

Stroka et al. reportaron (véase Tabla 6) que, en la ionización de los grupos hidroxil de los carbohidratos y de la sucralosa, fue adecuado el uso de un electrolito de trabajo que contiene ácido dinitrobenzónico (DNBA) como agente cromóforo, permitiendo la detección indirecta de sucralosa a 238 nm. El principio de esta detección indirecta se basa en el paso del ion analito a través de la ventana de detección UV desplazando las moléculas de DNBA, resultando en una reducción de la alta señal continua de fondo del electrolito soporte activo, obteniéndose picos negativos [37].

Tabla 6. Determinación de sucralosa (edulcorante no cromóforo) en bebidas no alcohólicas mediante electroforesis capilar

Edulcorante	Electrolito soporte	Especificaciones	LOD	Referencia
Sucralosa	Tampón de ácido dinitrobenzónico 3mM e hidróxido de sodio 20mM pH 12.1	Capilar de sílica (112cm X 50 μm) 238nm 20KV 22°C	30 mg Kg ⁻¹	36,37

Se han reportado diversos compuestos que absorben en la región UV y que pueden ser utilizados en la detección indirecta en EC como por ejemplo: naftaleno, dicromato de potasio y salicilato de sodio [32].

Las separaciones mediante cromatografía capilar electrocinética micelar, son métodos híbridos de la electroforesis y la cromatografía. En este método, se adicionan al electrolito soporte

surfactantes o tensoactivos en concentraciones tales que forman micelas, las cuales ayudan a la separación de especies neutras y cargadas. Estas micelas generalmente de naturaleza aniónica, tienen en su superficie cargas negativas lo que hace que su movilidad sea hacia el electrodo positivo.

La mayor parte de los electrolitos soporte usados presentan un flujo electroosmótico hacia el electrodo negativo, las micelas aniónicas son arrastradas aunque con una velocidad menor a la de dicho flujo. Por esto, la solución del electrolito soporte se forma por una fase acuosa que se mueve rápidamente y una fase micelar que lo hace con lentitud [32]. El dodecilsulfato de sodio es el tensoactivo más utilizado en el análisis de edulcorantes, sin embargo ha sido aplicado únicamente al análisis de edulcorantes que absorben en la región UV, como se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7. Determinación de algunos edulcorantes y aditivos en bebidas no alcohólicas y conservas mediante electroforesis capilar de zona y cromatografía capilar electrocinética micelar.

Edulcorante/ Aditivo	Electrolito soporte	Especificaciones	LOD	Referencia
Aspartame, acesulfame-K, sacarina, conservadores, colorantes	Tampón de carbonato 20mM (fase acuosa) y dodecilsulfato de sodio 62mM (fase micelar) pH 9.5	Capilar de sílica (48.5cm X 50µm) 200nm 20KV 25°C ECZ/CCEM	0.01- 1.0 mg mL ⁻¹	33
Aspartame, acesulfame-K, sacarina, dulcina y conservadores	Tampón de desoxicolato de sodio 0.05M, tampón de fosfato-borato 0.02M y acetonitrilo 5% pH 8.6	Capilar de sílica (57cm) 214nm	10-25 µg g ⁻¹	39

Tabla 7. Continuación.

Edulcorante/ Aditivo	Electrolito soporte	Especificaciones	LOD	Referencia
Acesulfame-K, sacarina, aspartame, dulcina, alitamo, cafeína, ácido benzónico y sorbico	Tampón de desoxicolato de sodio, fosfato de sodio y borato de sodio pH 8.6	Capilar de sílica (75cm X 75µm) CCEM-UV	N.R.	40
Acesulfame-K, sacarina, aspartame, conservadores y antioxidantes	Tampón de borato 20mM, colato de sodio 35mM, dodecilsulfato de sodio 15mM y metanol 10% pH 9.3	Capilar de sílica (52cm X 75µm) 214nm 20KV 25°C CCEM-UV	N.R.	41

La electroforesis capilar es por tanto una herramienta útil para el análisis de alimentos debido a su alto poder de resolución, el bajo consumo en solventes y su fácil manipulación, esto la hace una alternativa viable en comparación con HPLC para la determinación de los edulcorantes usados en la industria alimentaria. El presente trabajo tiene como fin desarrollar métodos para la determinación de edulcorantes en bebidas comerciales.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Desarrollar un método electroforético para la separación de acesulfame-K, aspartame, fenilalanina, sacarina y sucralosa, mediante la optimización de las variables instrumentales que permita ser aplicado al análisis de bebidas no alcohólicas.

2.2 Objetivos específicos

Evaluar y seleccionar los parámetros adecuados que intervienen en la separación de acesulfame-K, aspartame, fenilalanina y sacarina mediante electroforesis capilar de zona con detección UV.

Evaluar y seleccionar los parámetros adecuados que intervienen en la separación de sucralosa y sacarina mediante electroforesis capilar de zona con detección indirecta.

Aplicar el método desarrollado al análisis de edulcorantes en muestras de bebidas no alcohólicas comerciales.

PARTE EXPERIMENTAL

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Reactivos, soluciones estándar y preparación de muestras.

Todas las soluciones se preparan disolviendo el respectivo reactivo de grado analítico en agua desionizada. Las distintas soluciones estándar se preparan mediante dilución de una solución madre acuosa de cada edulcorante: acesulfame K, aspartame, fenilalanina, sacarina y sucralosa con una concentración individual de 1 g L^{-1} . Estas soluciones se almacenan a 4°C y fueron renovadas semanalmente, con excepción de la solución de sucralosa, que se prepara diariamente.

Para la determinación de los edulcorantes cromóforos (acesulfame-K, aspartame y fenilalanina) se utiliza como electrolito soporte óptimo una solución que contiene tetraborato de sodio ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) de concentración 40mM y 3% (v/v) de metanol, ajustado a $\text{pH} = 9.4$. Para el análisis de la sucralosa se usa el mismo electrolito soporte agregando benzoato de sodio 1.0 mM como agente cromóforo, ajustando el valor de pH a 9.6 ; en ambos casos se utiliza como estándar interno sacarina con concentración de 50 mg L^{-1} y 25 mg L^{-1} , respectivamente.

Las muestras analizadas se adquieren en establecimientos comerciales. Para el análisis de muestras de bebidas carbonatadas se toman alícuotas de 15 ml y se desgasifican en baño de ultrasonido durante 15 min . Para el análisis de edulcorantes que absorben en la región UV, se toma 1.0 ml de cada muestra y se afora a 10.0 ml con agua desionizada. Las muestras diluidas se filtran para su análisis mediante EC utilizando filtros de nylon de $0.45 \mu\text{m}$. Las muestras de bebidas sin gas únicamente se diluyen diez veces y se filtran. Las muestras que contienen sucralosa se tratan de manera similar, pero se diluyen 5 veces previo a su filtración.

3.2 Procedimiento de análisis en electroforesis.

Los análisis se realizan en un equipo Beckman Coulter P/ACE 5500, con un detector UV. Los datos obtenidos se adquieren y analizan mediante el software P/ACE MDQ versión 2.3. Al inicio del análisis, el capilar se activa mediante el paso de $\text{NaOH } 1\text{M}$ durante 15 min a 35°C , seguido por $\text{NaOH } 0.1\text{M}$ por 10 min , agua desionizada por 10 min a 25°C y finalmente el electrolito soporte durante 10 min . El capilar se lava entre cada análisis haciéndole pasar: $\text{NaOH } 1\text{M}$ por 4

min, NaOH 0.1M por 2 min, agua desionizada por 2 min y electrolito soporte durante 4 min. Todos los lavados se realizaron a una presión de 20 Psi.

Las condiciones de separación de edulcorantes son las siguientes: capilar de sílice fundida de (41.7 cm x 50 μ m D.I.), longitud de onda del detector 200 nm, las muestras se inyectan en modo hidrodinámico 0.5 Psi por 5 s, temperatura de 25°C, voltaje de separación de 18 KV, separación de polaridad normal. Los analitos se identificaron empleando del tiempo de migración de los mismos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Análisis de compuestos que absorben en la región UV

Para comenzar el análisis de los edulcorantes que absorben en la región UV, primero se determinó la composición del electrolito soporte más adecuada. Los compuestos de estudio de esta primera fase son: acesulfame-K (AC), aspartame (AS), fenilalanina (F), sacarina (S) y cafeína (C, interferente). Con base en las constantes de acidez de cada uno de los analitos se construyeron los diagramas lineales de zonas de predominio (Figura 8). A partir de los DLZP se puede observar que a un pH superior a 9.12 todos los compuestos están en forma iónica.

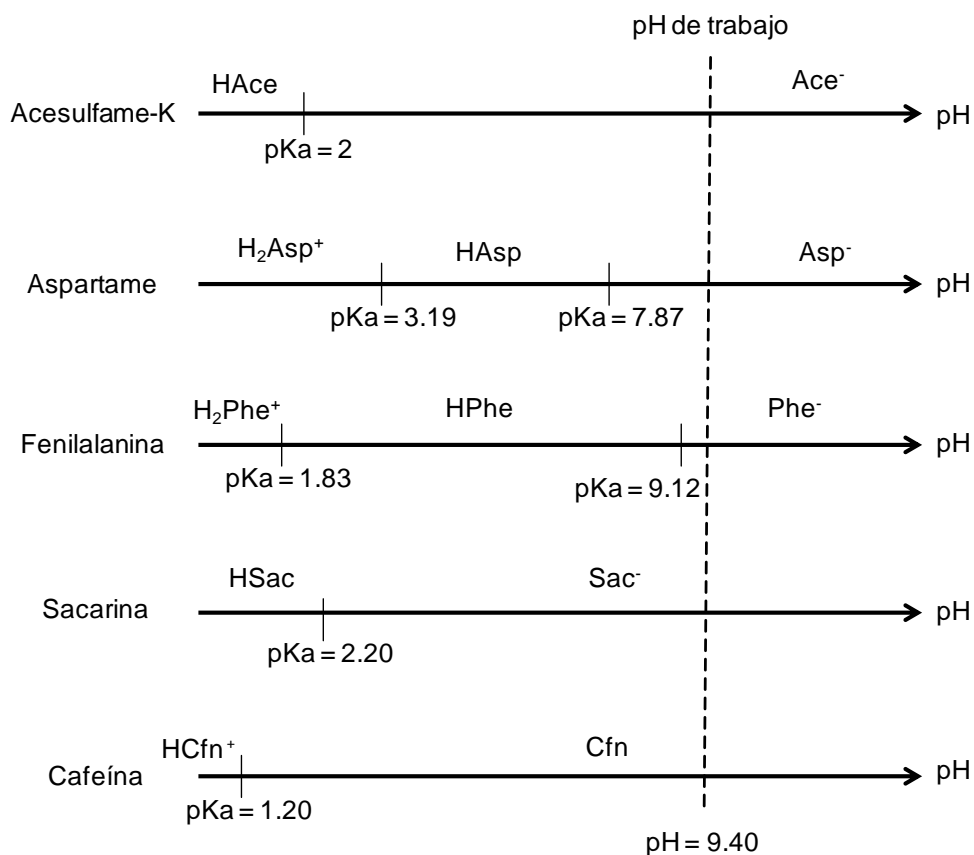


Figura 8. Diagrama lineal de zonas de predominio de los edulcorantes analizados en la primera fase.

Debido a que la composición del electrolito soporte es la variable crítica en la separación de los analitos mediante electroforesis capilar, se realizaron pruebas utilizando los que se presentan en la Tabla 8. Para verificar la eficiencia en la separación utilizando los electrolitos soporte, se

realizó una evaluación empleando una solución estándar que contenía los edulcorantes cromóforos nombrados anteriormente a una concentración de 50 mg L⁻¹ de cada analito.

Tabla 8. Electrolitos soporte evaluados para la separación de edulcorantes comerciales.

Electrolito	Composición	Referencia
1	Tris (hidroximetil) aminometano 100 mM-Histidina 10 mM	[8]
2	Tetraborato 40 mM-Dodecilsulfato de sodio 20 mM	[5]
3	Tetraborato 40 mM-Metanol 3.0% (v/v)	Este trabajo

Los tiempos de migración obtenidos en la primera fase del análisis se muestran más adelante (Tabla 9) junto con la respectiva movilidad aparente (μ_a), calculada a partir de la siguiente fórmula:

$$\mu_a = \frac{L l}{t V}$$

Donde l es la longitud efectiva del capilar al detector y L es la longitud total del capilar ambas en cm, t es el tiempo de migración en min y V es el voltaje aplicado en kV.

Con mayores movilidades aparentes se tiene menor tiempo de migración, que se traduce en menores tiempos de análisis y al tener movilidades aparentes diferentes, tienen tiempos de migración diferentes.

Tabla 9. Movilidades aparentes ($\text{cm}^2 \text{kV}^{-1} \text{min}^{-1}$) de los edulcorantes analizados, a partir de los diferentes electrolitos soporte utilizados.

Edulcorante	Tris - Histidina	Tetraborato - SDS	Tetraborato - Metanol
Acesulfame-K	12.5	8.2	7.2
Aspartame	53.4	25.6	25.1
Cafeína	10.3	5.9	6.1
Fenilalanina	147.5	34.1	39.2
Sacarina	12.8	10.2	8.4

$$t \text{ calculada} = 0.32, t \text{ crítica} = 2.78$$

Puede observarse, con el primer electrolito soporte Tris – histidina que, aunque tiene las movilidades aparentes mayores, existe un solapamiento en las señales de la sacarina y el acesulfame-K debido a que sus movilidades son similares. Con los electrolitos restantes existe una separación adecuada de todos los analitos.

La Figura 9 muestra los electroferogramas obtenidos con los diferentes electrolitos. Se reportan diferentes composiciones donde el electrolito 1 (Figura 9.A) presenta una separación adecuada de la mayoría de analitos con excepción de la sacarina y el acesulfame K. Por su parte las movilidades de los analitos se compararon mediante una prueba t de pares de valores, encontrándose que no hay diferencia significativa entre ambos electrolitos ($t_{\text{calc}} < t_{\text{crítica}}$). Sin embargo, el electrolito 3 (Figura 9.C) se seleccionó ya que tiene mejor resolución de las señales, además de que la señal correspondiente al acesulfame-K es mayor, lo que puede traducirse en una mayor sensibilidad analítica.

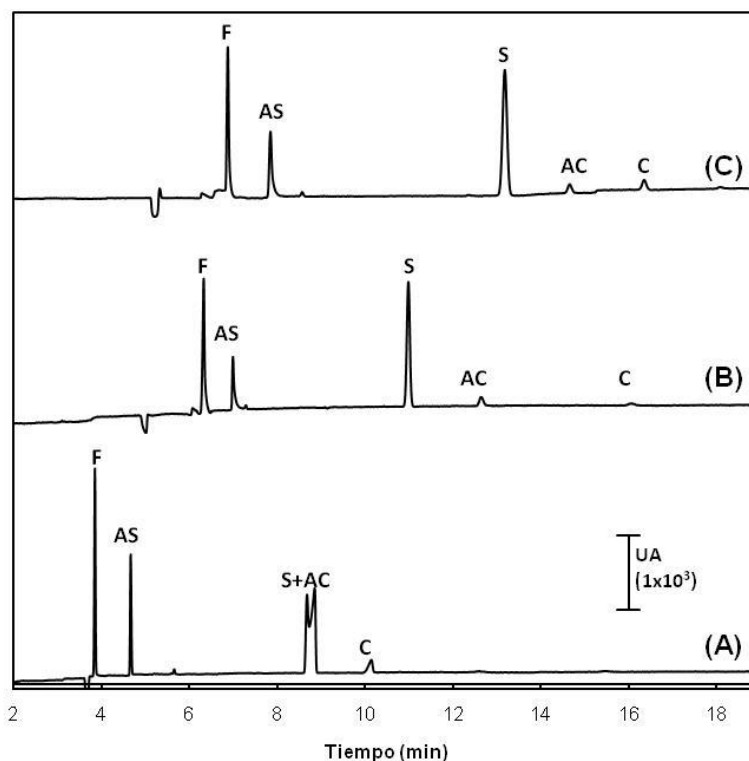


Figura 9. Electroferogramas obtenidos del análisis de una solución estándar de 50 mg L^{-1} de: fenilalanina (F), aspartame (AS), sacarina (S), acesulfame K (AC) y cafeína (C) utilizando los electrolitos soporte: A) 1, B) 2 y C) 3.

Utilizando el electrolito soporte 3, se realizaron las líneas de calibrado empleando soluciones estándar en el intervalo de concentraciones entre 20 y 200 mg L^{-1} y como estándar interno sacarina (50 mg L^{-1}). Se decidió utilizar a la sacarina como estándar interno debido a que es el analito que tiene mayor señal y porque en México ya no es utilizada en alimentos, lo que evita interferencias en la interpretación de los resultados; la cafeína fue evaluada únicamente como posible interferencia durante el análisis de bebidas carbonatadas. La altura de la señal obtenida (u.a.) se midió por triplicado, construyéndose las líneas de calibrado a partir de las alturas medias. Las líneas de calibrado muestran una dependencia lineal entre la intensidad de la señal y la concentración de acesulfame-K, aspartame y fenilalanina en la solución estándar, la cafeína no representa interferencia en ningún caso debido a los diferentes tiempos de migración.

Los parámetros de regresión de las líneas de calibrado se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Parámetros de regresión obtenidos del análisis de edulcorantes comerciales.

Parámetro	Valor		
	Fenilalanina	Aspartame	Acesulfame K
Coeficiente de correlación, r^2	0.9997	0.9996	0.9996
Ordenada en el origen, b_0	0.0588±0.0407	0.0261±0.0297	0.0059±0.0091
Sensibilidad analítica, b_1	0.5512±0.0003	0.3536±0.0002	0.1004±0.0001
Intervalo lineal (mg L ⁻¹)	12.9-200	14.7-200	15.9-200
Límite de detección (mg L ⁻¹)	4.3	4.9	5.3
Límite de cuantificación (mg L ⁻¹)	12.9	14.7	15.9

El método desarrollado se aplicó al análisis de bebidas comerciales no alcohólicas. Los resultados obtenidos para cada una de las 7 muestras se resumen en la Tabla 11. La concentración determinada se presenta como la media de 3 determinaciones independientes. La precisión de las determinaciones se evaluó por medio del %DER, el cual es menor al 5 % en todos los casos.

Tabla 11. Contenido de edulcorantes (mg L⁻¹, %DER, n=3) en bebidas no alcohólicas comerciales determinado por el método de análisis propuesto y comparado con lo reportado por el fabricante.

Muestra	Reportado por fabricante	Fenilalanina	Aspartame	Acesulfame-K
Agua sabor mango	Mezcla de aspartame y acesulfame 40mg/100g	13.9 (1.7)	21.67 (2.8)	7.6 (1.4)
Refresco de cola light	Mezcla de aspartame y acesulfame 40mg/100g	31.7 (2.7)	35.2 (3.1)	6.3 (2.6)
Jugo de naranja con soya	Acesulfame 1mg/100g	<L.D	<L.D	5.4 (0.8)
Refresco de dieta	Mezcla de sucralosa y acesulfame 25.7mg/100g	<L.D	<L.D	6.3 (2.0)
Agua gasificada sabor manzana	Mezcla de aspartame y acesulfame 31mg/100g	20.2 (2.5)	32.2 (1.4)	<L.D
Refresco de cola	Mezcla de aspartame y acesulfame 62mg/100g	<L.D	26.8 (1.9)	9.4 (1.7)
Refresco de cola light	Mezcla de aspartame y acesulfame 43.4mg/100g	13.9 (1.0)	31.4 (1.2)	5.8 (0.9)

Las concentraciones resultantes fueron comparadas con lo reportado por el fabricante en el envase, para algunas las cantidades fueron similares y en algunos casos las excedieron. Teniendo en cuenta que en México se tiene un límite máximo para acesulfame y aspartame de 350 mg L^{-1} , los resultados obtenidos indican que las cantidades añadidas en las muestras están dentro del límite establecido en las normas mexicanas para bebidas no alcohólicas [12].

4.2 Análisis de sucralosa

Para poder realizar posteriormente el análisis conjunto de todos los edulcorantes, se evaluó la eficiencia en la separación de sucralosa tomando como base el electrolito soporte de la primera parte y sus mezclas de diferentes compuestos (Tabla 12). El electrolito 1 se utilizó anteriormente para la determinación de una mezcla de edulcorantes que pueden ser determinados en la región UV sin necesidad de ningún tipo de derivatización [7]. Con respecto a los electrolitos 2 y 3 se eligieron el benzoato de sodio y el ácido pícrico como compuestos que absorben en la región UV a 200 y 360 nm, respectivamente. El uso de éste tipo de compuestos en el electrolito soporte permite determinar de manera indirecta aquellos componentes que no poseen en su estructura grupos cromóforos como la sucralosa. Adicionalmente el uso de borato en el electrolito soporte favorece la formación de complejos aniónicos que permite mejorar la resolución de este tipo de analitos.

Tabla 12. Composición de los electrolitos soporte evaluados para la determinación de sucralosa.

Electrolito soporte	Composición
A	Tetraborato de sodio 40 mM – Metanol 3% (v/v)
B	Tetraborato de sodio 40 mM – Metanol 3% (v/v) – Benzoato de sodio 1 mM
C	Tetraborato de sodio 40 mM – Metanol 3% (v/v) – Ácido Pícrico 1 mM

A partir de los electroferogramas obtenidos es posible concluir que el electrolito 1 (Figura 10.A) no es adecuado ya que solo se observa la señal correspondiente al estándar interno, un resultado esperado por la falta de grupos cromóforos en la estructura de la sucralosa, mientras que el electrolito 2 (Figura 10.B) es el que proporciona una altura de señal de sucralosa mayor con respecto a la obtenida con el electrolito 3 (Figura 10.C). En el electroferograma la señal (D) corresponde al análisis de una muestra real con el electrolito soporte 2, realizado para comprobar la separación con ese electrolito.

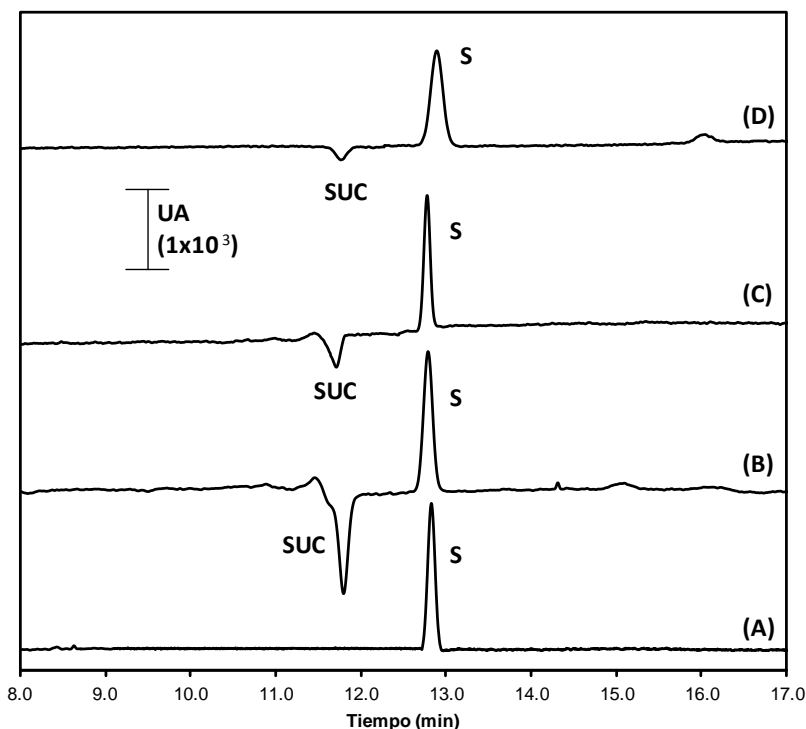


Figura 10. Electroferogramas obtenidos del análisis de sucralosa (Suc) utilizando los los electrolitos: A), B) , C) , D) muestra real analizada utilizando el electrolito B.

Elegido el electrolito 2, se realizó la curva de calibrado utilizando la solución estándar de sucralosa en un intervalo de 10 a 40 mg L⁻¹ y al igual que en el estudio anterior, como estándar interno sacarina 25 mg L⁻¹. La altura de cada señal se midió por triplicado, construyéndose la línea de calibrado con el promedio de las señales. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 13.

Tabla 13. Parámetros de regresión obtenidos para el análisis de sucralosa.

Parámetro	Valor
Coefficiente de correlación r^2	0.999
Ordenada en el origen. b_0	-0.2829±0.0019
Sensibilidad analítica. b_1	0.011±0.001
Intervalo lineal (mg L ⁻¹)	3.6-40.0
Límite de detección (mg L ⁻¹)	1.2
Límite de cuantificación (mg L ⁻¹)	3.6

Utilizando esta metodología se determinó sucralosa en muestras de bebidas mediante el método interpolación en la línea de calibrado. Las concentraciones resultantes se encuentran en la Tabla 14. Los valores obtenidos son congruentes con los reportados por el proveedor, adicionalmente los %DER menores al 5% indican una buena precisión del método desarrollado.

Tabla 14. Contenido de sucralosa (mg por cada 100 mL, %DER, n=3) en bebidas comerciales determinado por el método de análisis propuesto.

Muestra	Reportado por el fabricante	Sucralosa
Refresco de toronja de dieta	Mezcla de acesulfame y sucralosa 25.7mg/100g	16.4 (0.4)
Jugo de durazno con soya	3mg/100g	3.3 (3.7)
Agua sabor jamaica	Mezcla de acesulfame y sucralosa 18mg/100g	5.0 (0.5)
Jugo de manzana con soya	3mg/100g	2.7 (4.1)

4.3 Análisis conjunto

En la tercera fase se realizó un análisis en conjunto de edulcorantes con grupos cromóforos (acesulfame-K, aspartame, sacarina y fenilalanina como producto de degradación) y no cromóforos (sucralosa) utilizando el electrolito soporte usado para la determinación de sucralosa, compuesto por tetraborato de sodio 40 mM, metanol 3% (v/v) y benzoato de sodio 1 mM. Se utilizó debido a que éste electrolito soporte se empleó en la determinación de edulcorantes con grupos cromóforos, y al modificarlo se pudo determinar exitosamente la sucralosa.

Al realizarse los análisis se encontró que las movilidades electroforéticas se veían afectadas, no lográndose una separación adecuada de las señales de interés de los edulcorantes nombrados anteriormente (Fig. 11). La presencia del benzoato de sodio produce un aumento de la fuerza iónica, aumentando la participación del electrolito soporte en la conducción de corriente, lo que conduce a una disminución en la velocidad de migración de los analitos [32]. Con la finalidad de mejorar la resolución de las señales se modificaron las condiciones de separación (potencial, composición del electrolito soporte), sin embargo no fue posible realizar un análisis simultáneo de los edulcorantes. Se concluye que se requieren de dos análisis independientes para poder analizar a los edulcorantes de estudio.

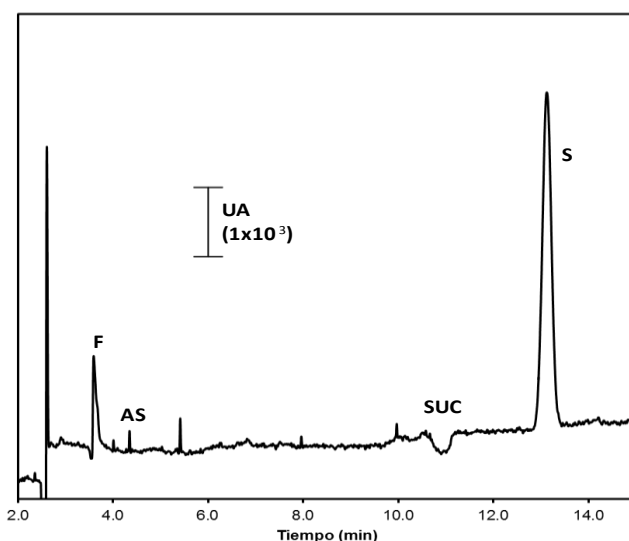


Figura 11. Electroferograma de los edulcorantes de estudio en un análisis simultáneo utilizando el electrolito soporte modificado con benzoato de sodio.

CONCLUSIONES

5 CONCLUSIONES

Se plantearon dos métodos para la determinación de edulcorantes artificiales en bebidas comerciales no alcohólicas.

Se desarrollo un primer método electroforético para la determinación de edulcorantes con grupos cromóforos (acesulfame-K, aspartame, fenilalanina como producto de degradación y sacarina usado como estándar interno) que tomó en cuenta la presencia de cafeína en algunas de las muestras donde se encontró que no existía interferencia en el análisis propuesto.

Se desarrollo un segundo método electroforético únicamente para la determinación de la sucralosa como edulcorante sin grupos cromóforos, modificando el electrolito soporte utilizado en el primer método.

Se evaluó el electrolito soporte en la determinación simultánea de todos los edulcorantes de estudio, donde no se logró un buen análisis debido a una segunda modificación del electrolito soporte ya que este presentaba absorción en la región ultravioleta.

Al emplear la electroforesis capilar como método de análisis se utiliza una cantidad mínima de soluciones lo que permite reducir los desechos. El tratamiento sencillo de las muestras usadas les proporciona una ventaja adicional en comparación con otras metodologías propuestas que requieren de técnicas de extracción y limpieza más complejas.

REFERENCIAS

6 REFERENCIAS

- [1] Badui, S. (1990) Química de los alimentos. Segunda edición, editorial Alhambra Mexicana S.A. de C.V., México, D.F.
- [2] Fatibello, O., Da Cruz, I., Gouveia, S. T., Calafatti, S. A. (1996) Adoçantes artificiais. Química Nova, 19 (3), 248-260.
- [3] Mitchell, H. (2006) Sweeteners and sugar alternatives in food technology. Blackwell Publishing. Oxford, Reino Unido.
- [4] Choi, M. M., Hsu, M. Y., Wong, S. L. (2000) Determination of cyclamate in low-calorie foods by high-performance liquid chromatography with indirect visible photometry. Analyst, 125, 217-220.
- [5] Zyglar, A., Wasik, A., Namiesnik, J. (2009) Analytical methodologies for determination of artificial sweeteners in foodstuffs. Trends in Analytical Chemistry, 28 (9), 1082-1102.
- [6] Yebra-Biurrun, M.C. (2000) Flow injection determinations of artificial sweeteners: a review. Food Additives and Contaminants, 17 (9), 733-738.
- [7] Lange, F. T., Scheurer, M., Brauch, H. J. (2012) Artificial sweeteners-a recently recognized class of emerging environmental contaminants: a review. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 403, 2503-2518.
- [8] Bergamo, A. B., Fracassi, J. A., Pereira, D. (2011) Simultaneous determination of aspartame, cyclamate, saccharin and acesulfame-K in soft drinks and tabletop sweetener formulations by capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection. Food Chemistry, 124, 1714-1717.
- [9] International Food Information Council Foundation (IFIC) Review. (2009) Low-calorie sweeteners and health. Washington, Estados Unidos.
- [10] Official Journal of the European Union (2011) Legislation. Publications Office of the European Union. Luxemburgo, Luxemburgo.

- [11] O'Brien, L. (2001) *Alternative sweeteners*. Marcel Dekker, Inc. Nueva York, Estados Unidos.
- [12] 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.
- [13] NOM-086-SSA1-1994. Bienes y servicios. Alimentos y bebidas no alcohólicas con modificaciones en su composición. Especificaciones nutrimentales.
- [14] Los Weinert, P., Redigolo, H., De Oliveira, J. E., Pezza, L. (2004) A simplified spectrophotometric method for routine analysis of saccharin in commercial noncaloric sweeteners. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7788-7792.
- [15] Llamas, N. E., Di Nezio, M. S., Palomeque, M. E., Fernández, B. S. (2008) Direct determination of saccharin and acesulfame-K in sweeteners and fruit juices powders. *Food Analytical Methods*, 1, 43-48.
- [16] Ni, Y., Xiao, W., Kokot, S. (2009) A different kinetic spectrophotometric method for determination of three sulphanilamide artificial sweeteners with the aid of chemometrics. *Food Chemistry*, 113, 1339-1345.
- [17] Di Pietra, A. M., Cavrini, V., Bonazzi, D., Benefenati, L. (1990) HPLC analysis of aspartame and saccharin in pharmaceutical and dietary formulations. *Chromatographia*, 30 (3/4) 215-219.
- [18] Hannisdal, A. (1992) Analysis of acesulfame-K, saccharin and preservatives in beverages and jams by HPLC. *Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, 194, 517-519.
- [19] Dossi, N., Toniolo, R., Susmel, S., Pizarriello, A., Bontempelli, G. (2006) Simultaneous RP-LC determination of additives in soft drinks, *Chromatographia*, 63, 557-562.
- [20] Çubuk, E., Özkan, G., Guzel-Seydim, Z. (2006) Isocratic separation of some food additives by reversed phase liquid chromatography. *Chromatographia*, 63, 91-96.
- [21] Wasik, A., McCourt, J., Buchgraber, M. (2007) Simultaneous determination of nine intense sweeteners in foodstuffs by high performance liquid chromatography and evaporative light

scattering detection-Development and single-laboratory validation. *Journal of Chromatography A*, 1157, 187-196.

[22] Yang, D., Chen, B. (2009) Simultaneous determination of nonnutritive sweeteners in foods by HPLC/ESI-MS. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 57, 3022-3027.

[23] Chen, B. H., Fu, S. C. (1995) Simultaneous determination of preservatives, sweeteners and antioxidants in foods by paired-ion liquid chromatography. *Chromatographia*, 41 (1/2), 43-50.

[24] Chen, Q., Wang, J. (2001) Simultaneous determination of artificial sweeteners, preservatives, caffeine, theobromine and theophylline in food and pharmaceutical preparations by ion chromatography. *Journal of Chromatography A*, 937, 57-64.

[25] Zhu, Y., Guo, Y., Ye, M., James, F. (2005) Separation and simultaneous determination of four artificial sweeteners in food and beverages by ion chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1085, 143-146.

[26] Odaci, D., Timur, S., Telefoncu, A. (2004) Carboxyl esterase-alcohol oxidase based Biosensor for the aspartame determination. *Food Chemistry*, 84, 493-496.

[27] Kirgöz, U. A., Odaci, D., Timur, S., Merkoçi, A., Alegret, S., Besün, N., Telefoncu, A. (2006) A biosensor based on graphite epoxy composite electrode for aspartame and ethanol detection. *Analytica Chimica Acta*, 570, 165-169.

[28] Carloni, J., Oppermann, A., Nasser, A. L., Rediogoło, H., De Oliveira, J. E., Bladimirov, C., Pezza, L. (2003) Potentiometric determination of saccharin in commercial artificial sweeteners using a silver electrode. *Food Chemistry*, 83, 297-301.

[29] Elmosallamy, M. A., Ghoneim, M. M., Killa, H. M., Saber, A. L. (2005) Potentiometric membrane sensor for determination of saccharin. *Microchimica Acta*, 151, 109-113.

[30] Santini, A.O., Lemos, S. C., Pezza, H.R., Caolini-Filho, J., Pezza, L. (2008) Development of a potentiometric sensor for the determination of saccharin in instant tea powders, diet soft drinks and strawberry dietetic jam. *Microchemical Journal*, 90 (2), 124-128.

- [31] Álvarez, G. A., Lozada, S. M., Rodríguez, J. A., Galán, C. A., Páez, M. E. (2010) Potentiometric quantification of saccharin by using a selective membrane formed by pyrrole electropolymerization. *Food Chemistry*, 120, 1250-1254.
- [32] Castillo, M. A., Revilla, A. L., Lopez, R., Rivera, P. (2005) *Fundamentos de electroforesis capilar*. Primera edición, Universidad Nacional Autónoma de México.
- [33] Frazier, R. A., Inns, E. L., Dossi, N., Ames, J., Nursten, H. E. (2000) Development of a capillary electrophoresis method for the simultaneous analysis of artificial sweeteners, preservatives and colours in soft drinks. *Journal of Chromatography A*, 876, 213-220.
- [34] Pesek, J., Matyska, M. T. (1997) Determination of aspartame by high-performance capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 781, 423-428.
- [35] Walker, J. C., Zaugg, S. E., Walker, E. B. (1997) Analysis of beverages by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 781, 481-485.
- [36] Stroka, J., Dossi, N., Anklam, E. (2003) Determination of the artificial sweetener sucralosa by capillary electrophoresis. *Food Additives and Contaminants*, 20 (6), 524-527.
- [37] McCourt, J., Stroka, J., Anklam, E. (2005) Experimental design-based development and single laboratory validation of a capillary zone electrophoresis method for the determination of the artificial sweetener sucralosa in food matrices. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 382, 1269-1278.
- [38] Klockow, A., Paulus, A., Figueiredo, V., Amado, R., Widmer, H. M. (1994) Determination of carbohydrates in fruit juices by capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 680, 187-200.
- [39] Lin, Y. H., Chou, S. S., Sheu, F., Shyu, Y. T. (2000) Simultaneous determination of sweeteners and preservatives in preserved fruits by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Journal of Chromatographic Science*, 38, 345-352.
- [40] Thompson, C.O., Trenerry, V.C., Kemmery, B. (1995) Micellar electrokinetic capillary chromatographic determination of artificial sweeteners in low-joule soft drinks and other foods. *Journal of Chromatography A*, 694 (2), 507-514.

[41] Boyce, M. (1999) Simultaneous determination of antioxidants, preservatives and sweeteners permitted as additives in food by mixed micellar electrokinetic chromatography. *Journal of Chromatography A*, 847, 369-375.

He ofendido a Dios y a la humanidad porque mi trabajo no tuvo la calidad que debía haber tenido, ..., Una obra de arte nunca se termina, solo se abandona.

Leonardo Da Vinci